(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-540085
(P2024-540085A)
(43)公表日　令和6年10月31日(2024.10.31)

(51)国際特許分類		ＦＩ			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/57　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/57		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ　15/113(2010.01)		Ｃ１２Ｎ	15/113	１３０Ｚ	４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ　15/63　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ ＺＮＡ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ　15/864(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ	４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ　15/88　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ	４Ｃ０８７

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全376頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-525344(P2024-525344)
(86)(22)出願日　令和4年10月27日(2022.10.27)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月31日(2024.5.31)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/078798
(87)国際公開番号　WO2023/077012
(87)国際公開日　令和5年5月4日(2023.5.4)
(31)優先権主張番号　63/272,324
(32)優先日　令和3年10月27日(2021.10.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/306,037
(32)優先日　令和4年2月2日(2022.2.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/369,864
最終頁に続く

(71)出願人　597160510
リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
ＲＥＧＥＮＥＲＯＮ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国１０５９１－６７０７ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード７７７番
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　血友病Ｂ療法のための第ＩＸ因子を発現させるための組成物及び方法

(57)【要約】
内因性ＡＬＢ遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座へのＦＩＸコード配列の挿入及び／又はＦＩＸコード配列の発現を可能にする核酸構築物及び組成物が提供される。核酸構築物及び組成物は、Ｆ９核酸を細胞に導入する方法、Ｆ９核酸を標的ゲノム遺伝子座に組み込む方法、細胞におけるＦＩＸの発現方法、及び対象における血友病Ｂ又はＦＩＸ欠乏症を治療する方法において使用することができる。

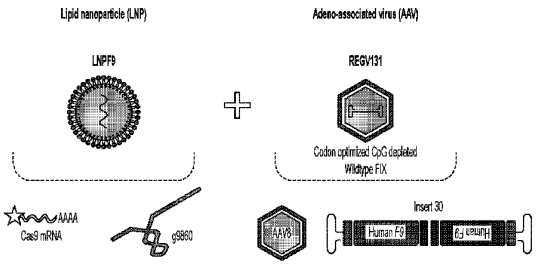


FIG. 3

【特許請求の範囲】
【請求項１】
第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列又は前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む核酸構築物を含む、組成物。
【請求項２】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、
（Ｉ）配列番号１６６、１６５、１６４、及び１６７～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％同一であり、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は
（ＩＩ）配列番号１５９、１６０、及び１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、若しくは（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、
（Ｉ）配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、
（ＩＩ）配列番号１６５に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は
（ＩＩＩ）配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項１又は２に記載の組成物。
【請求項４】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、
（Ｉ）配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は
（ＩＩ）配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項１～３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している、請求項１～６のいずれか一項

に記載の組成物。
【請求項８】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項１～７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードする、請求項１～８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６、１６５、又は１５９を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１１】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６、１６５、又は１５９からなる、請求項１０に記載の組成物。
【請求項１２】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６又は１５９を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１３】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６又は１５９からなる、請求項１２に記載の組成物。
【請求項１４】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１５】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６からなる、請求項１４に記載の組成物。
【請求項１６】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１７】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９からなる、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１８】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の上流にスプライスアクセプターを含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１９】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の下流にポリアデニル化シグナルを含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の下流にポリアデニル化シグナルを含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１】
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項１～２０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２】
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含む、請求項１～２０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３】

前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まない、請求項１～２２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２４】
前記核酸構築物が、双方向性構築物である、請求項１～２３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２５】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含むか、又は前記核酸構築物が、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体を含む、請求項２４に記載の組成物。
【請求項２６】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、異なっているが、同じ第ＩＸ因子タンパク質配列をコードし、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２５に記載の組成物。
【請求項２７】
（Ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、又は（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、
（ＩＩ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９５％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２５又は２６に記載の組成物。
【請求項２８】
（Ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、
（ＩＩ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２５～２７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇しており、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している、請求項２５～２８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２５～２９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードし、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードする、請求項２５～３０のいずれか一項に記載の組成物

。
【請求項３２】
（Ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
（ＩＩ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項２５～３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３】
（Ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９からなり、
（ＩＩ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６からなる、請求項２５～３２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４】
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含むか、又は前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含む、請求項２４～３３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、異なっているが、前記同じ第ＩＸ因子タンパク質配列をコードし、前記第１のポリアデニル化シグナル及び前記第２のポリアデニル化シグナルが、異なっている、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３６】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、
（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項１～３５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７】
前記核酸構築物が、配列番号２１０、若しくは１８０、又はそれらの逆相補体を含む、請求項１～３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３８】
前記核酸構築物が、一本鎖ＤＮＡ又は二本鎖ＤＮＡである、請求項１～３７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３９】
前記核酸構築物が、一本鎖ＤＮＡである、請求項３８に記載の組成物。
【請求項４０】
前記核酸構築物が、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある、請求項１～３９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４１】

前記核酸構築物が、前記核酸ベクター内にあり、任意選択的に、前記核酸ベクターが、ウイルスベクターである、請求項４０に記載の組成物。
【請求項４２】
前記核酸ベクターが、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項４１に記載の組成物。
【請求項４３】
前記ＡＡＶベクターが、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである、請求項４２に記載の組成物。
【請求項４４】
前記ＡＡＶベクターが、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する、請求項４２又は４３に記載の組成物。
【請求項４５】
前記ＡＡＶベクターが、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである、請求項４４に記載の組成物。
【請求項４６】
前記ＡＡＶベクターが、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである、請求項４５に記載の組成物。
【請求項４７】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、
（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、
前記核酸構築物が、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１～４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４８】
前記核酸構築物が、一方向性構築物である、請求項１～２２のいずれか一項に記載の組

成物。
【請求項４９】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、スプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項４８に記載の組成物。
【請求項５０】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５１】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５２】
前記核酸構築物が、一本鎖ＤＮＡ又は二本鎖ＤＮＡである、請求項４８～５１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５３】
前記核酸構築物が、一本鎖ＤＮＡである、請求項５２に記載の組成物。
【請求項５４】
前記核酸構築物が、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある、請求項４８～５３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５５】
前記核酸構築物が、前記核酸ベクター内にある、請求項５４に記載の組成物。
【請求項５６】
前記核酸ベクターが、ウイルスベクターである、請求項５５に記載の組成物。
【請求項５７】
前記核酸ベクターが、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項５５又は５６に記載の組成物。
【請求項５８】
前記ＡＡＶベクターが、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである、請求項５７に記載の組成物。
【請求項５９】
前記ＡＡＶベクターが、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する、請求項５７又は５８に記載の組成物。
【請求項６０】
前記ＡＡＶベクターが、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである、請求項５９に記載の組成物。
【請求項６１】

前記ＡＡＶベクターが、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである、請求項６０に記載の組成物。
【請求項６２】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、スプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、
前記核酸構築物が、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項４８～６１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６３】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項６２に記載の組成物。
【請求項６４】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項６２に記載の組成物。
【請求項６５】
標的遺伝子におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とするヌクレアーゼ剤を更に含む、請求項１～６４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６６】
前記標的遺伝子が、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子である、請求項６５に記載の組成物。
【請求項６７】
前記ヌクレアーゼ剤が、
（ａ）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、
（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、又は
（ｃ）（ｉ）Ｃａｓタンパク質若しくは前記Ｃａｓタンパク質をコードする核酸、及び
（ｉｉ）ガイドＲＮＡ若しくは前記ガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、前記ガイドＲＮＡが、前記Ｃａｓタンパク質に結合し、前記Ｃａｓタンパク質に前記ガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる、請求項６５又は６６に記載の組成物。
【請求項６８】
前記ヌクレアーゼ剤が、
（ａ）Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする核酸、及び
（ｂ）ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、アルブミン遺伝子のイントロン１におけるガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、前記ガイドＲＮＡが、前記Ｃａｓタンパク質に結合し、前記Ｃａｓタンパク質に前記ガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる、請求項６５に記載の組成物。

【請求項６９】
前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子である、請求項６８に記載の組成物。
【請求項７０】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、若しくは少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、任意選択的に、前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される前記配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、若しくは少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される前記配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、任意選択的に、前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される前記配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である、請求項６８又は６９に記載の組成物。
【請求項７１】
前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つを含み、任意選択的に、前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つを含む、請求項６８～７０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７２】
前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つからなり、任意選択的に、前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つからなる、請求項６８～７１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７３】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号６２～１２５のうちのいずれか１つを含み、任意選択的に、前記ガイドＲＮＡが、配列番号６８、１００、６２、９４、６５、９７、７３、及び１０５のうちのいずれか１つを含む、請求項６８～７２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７４】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、若しくは少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である、請求項６８～７３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７５】
前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６を含む、請求項６８～７４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７６】
前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６からなる、請求項６８～７５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７７】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号６８又は１００を含む、請求項６８～７６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７８】
前記組成物が、ＲＮＡの形態で前記ガイドＲＮＡを含む、請求項６８～７７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７９】
前記ガイドＲＮＡが、少なくとも１つの修飾を含む、請求項６８～７８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８０】
前記少なくとも１つの修飾が、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項７９に記載の組成物。

【請求項８１】
前記少なくとも１つの修飾が、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項７９又は８０に記載の組成物。
【請求項８２】
前記少なくとも１つの修飾が、前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の最初の５つのヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾を含む、請求項７９～８１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８３】
前記少なくとも１つの修飾が、前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の最後の５つのヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾を含む、請求項７９～８２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８４】
前記少なくとも１つの修飾が、前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項７９～８３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８５】
前記少なくとも１つの修飾が、前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項７９～８４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８６】
前記少なくとも１つの修飾が、前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項７９～８５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８７】
前記少なくとも１つの修飾が、前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項７９～８６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８８】
前記少なくとも１つの修飾が、（ｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含む、請求項７９～８７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８９】
前記ガイドＲＮＡが、単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、請求項６８～８８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９０】
前記組成物が、ＲＮＡの前記形態で前記ガイドＲＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、配列番号１００を含み、前記ガイドＲＮＡが、（ｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含む、請求項６８～８９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９１】
前記Ｃａｓタンパク質が、Ｃａｓ９タンパク質である、請求項６８～９０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項９２】
前記Ｃａｓタンパク質が、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する、請求項９１に記載の組成物。
【請求項９３】
前記Ｃａｓタンパク質が、配列番号１１に示される配列を含む、請求項６８～９２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９４】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸が、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項６８～９３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９５】
前記組成物が、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む、請求項６８～９４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９６】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、少なくとも１つの修飾を含む、請求項９５に記載の組成物。
【請求項９７】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、１つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている、請求項９５又は９６に記載の組成物。
【請求項９８】
前記修飾ウリジンが、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンである、請求項９７に記載の組成物。
【請求項９９】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されている、請求項９７又は９８に記載の組成物。
【請求項１００】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、５’キャップを含む、請求項９５～９９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０１】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、ポリ（Ａ）テールを含む、請求項９５～１００のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０２】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される配列を含む、請求項９５～１０１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０３】
前記組成物が、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される前記配列を含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む、請求項６８～１０２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０４】
前記組成物が、ＲＮＡの前記形態で前記ガイドＲＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、配列番号６８又は１００を含み、
前記組成物が、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される前記配列を含む、請求項６８～１０２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１０５】
前記組成物が、ＲＮＡの前記形態で前記ガイドＲＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、配列番号１００を含み、前記ガイドＲＮＡが、（ｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、
前記組成物が、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される前記配列を含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む、請求項６８～１０２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０６】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、
（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項１０４に記載の組成物。
【請求項１０７】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、スプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項１０４に記載の組成物。
【請求項１０８】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項１０７に記載の組成物。
【請求項１０９】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項１０７に記載の組成物。
【請求項１１０】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグ

ナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、
（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項１０５に記載の組成物。
【請求項１１１】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、スプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項１０５に記載の組成物。
【請求項１１２】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項１１１に記載の組成物。
【請求項１１３】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項１１１に記載の組成物。
【請求項１１４】
前記Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸、及び前記ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする前記１つ以上のＤＮＡが、脂質ナノ粒子と会合している、請求項６８～１１３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１５】
前記脂質ナノ粒子が、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含む、請求項１１４に記載の組成物。
【請求項１１６】
前記カチオン性脂質が、脂質Ａである、請求項１１５に記載の組成物。
【請求項１１７】
前記中性脂質が、ＤＳＰＣである、請求項１１５又は１１６に記載の組成物。
【請求項１１８】
前記ヘルパー脂質が、コレステロールである、請求項１１５～１１７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１９】
前記ステルス脂質が、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００（ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ）である、請求項１１５～１１８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２０】
前記カチオン性脂質が脂質Ａであり、前記中性脂質がＤＳＰＣであり、前記ヘルパー脂質がコレステロールであり、前記ステルス脂質がＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである、請求項１１５～１１９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２１】
前記脂質ナノ粒子が、以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで４つの

脂質を含む、請求項１１５～１２０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２２】
前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子であり、
前記組成物が、ＲＮＡの前記形態で前記ガイドＲＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、配列番号６８又は１００を含み、
前記組成物が、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される前記配列を含み、
前記ガイドＲＮＡ及び前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している、請求項６８～１２１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２３】
前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子であり、
前記組成物が、ＲＮＡの前記形態で前記ガイドＲＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、配列番号１００を含み、前記ガイドＲＮＡが、（ｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、
前記組成物が、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を含み、前記核酸が、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される前記配列を含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、
前記ガイドＲＮＡ及び前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している、請求項６８～１２１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２４】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、
（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、
前記核酸構築物が、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、

それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１２２に記載の組成物。

【請求項１２５】

前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、

前記核酸構築物が、５’から３’に、スプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、

前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、

前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、

任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１２２に記載の組成物。

【請求項１２６】

前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項１２５に記載の組成物。

【請求項１２７】

前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項１２５に記載の組成物。

【請求項１２８】

前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、

前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、

（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、

前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、

任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、

又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１２３に記載の組成物。

【請求項１２９】

前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、

前記核酸構築物が、５’から３’に、スプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、

前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、

前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、

前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、

前記核酸構築物が、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、

任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１２３に記載の組成物。

【請求項１３０】

前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項１２９に記載の組成物。

【請求項１３１】

前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項１２９に記載の組成物。

【請求項１３２】

第９因子核酸を細胞に導入する方法、第９因子核酸構築物を細胞内の標的遺伝子に組み込む方法、又は第ＩＸ因子を細胞内で発現させる方法における使用のための、請求項１～１３１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１３３】

前記細胞が、新生児細胞である、請求項１３２に記載の使用のための組成物。

【請求項１３４】

前記新生児細胞が、出生後２４週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項１３３に記載の使用のための組成物。

【請求項１３５】

前記新生児細胞が、出生後１２週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項１３３に記載の使用のための組成物。

【請求項１３６】

前記新生児細胞が、出生後８週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項１３３に記載の使用のための組成物。

【請求項１３７】

前記新生児細胞が、出生後４週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項１３３に記載の使用のための組成物。

【請求項１３８】

前記細胞が、新生児細胞ではない、請求項１３２に記載の使用のための組成物。

【請求項１３９】

対象における第ＩＸ因子欠乏症を治療する方法における使用のための、請求項１～１３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４０】
対象における血友病Ｂを治療する方法における使用のための、請求項１～１３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４１】
前記対象が、新生児対象である、請求項１３９又は１４０に記載の使用のための組成物。
【請求項１４２】
前記新生児対象が、出生後２４週間以内のヒト新生児対象である、請求項１４１に記載の使用のための組成物。
【請求項１４３】
前記新生児対象が、出生後１２週間以内のヒト新生児対象である、請求項１４１に記載の使用のための組成物。
【請求項１４４】
前記新生児対象が、出生後８週間以内のヒト新生児対象である、請求項１４１に記載の使用のための組成物。
【請求項１４５】
前記新生児対象が、出生後４週間以内のヒト新生児対象である、請求項１４１に記載の使用のための組成物。
【請求項１４６】
前記対象が、新生児対象ではない、請求項１３９又は１４０に記載の使用のための組成物。
【請求項１４７】
請求項１～１４６のいずれか一項に記載の組成物を含む、細胞。
【請求項１４８】
前記核酸構築物が、内因性標的遺伝子遺伝子座に組み込まれ、第ＩＸ因子タンパク質が、前記内因性標的遺伝子遺伝子座から発現されるか、又は前記核酸構築物が、内因性アルブミン遺伝子座のイントロン１に組み込まれ、第ＩＸ因子タンパク質が、前記内因性アルブミン遺伝子座から発現される、請求項１４７に記載の細胞。
【請求項１４９】
前記細胞が、ヒト細胞である、請求項１４７又は１４８に記載の細胞。
【請求項１５０】
前記細胞が、肝臓細胞である、請求項１４７～１４９のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項１５１】
前記肝臓細胞が、肝細胞である、請求項１５０に記載の細胞。
【請求項１５２】
前記細胞が、新生児細胞である、請求項１４７～１５１のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項１５３】
前記新生児細胞が、出生後２４週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項１５２に記載の細胞。
【請求項１５４】
前記新生児細胞が、出生後１２週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項１５２に記載の細胞。
【請求項１５５】
前記新生児細胞が、出生後８週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項１５２に記載の細胞。
【請求項１５６】
前記新生児細胞が、出生後４週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項１５２に記載の細胞。

【請求項１５７】
前記細胞が、新生児細胞ではない、請求項１４７～１５１のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項１５８】
前記細胞が、エクスビボ又はインビトロである、請求項１４７～１５７のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項１５９】
前記細胞が、インビボである、請求項１４７～１５７のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項１６０】
第９因子核酸を細胞に導入する方法であって、請求項１～１３１のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞に投与することを含む、方法。
【請求項１６１】
第９因子核酸構築物を細胞内の標的遺伝子に組み込む方法であって、請求項６５～１３１のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞に投与することを含み、
前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的遺伝子におけるヌクレアーゼ標的部位を切断して切断部位を作製し、前記核酸構築物が、前記切断部位に挿入されて、修飾された標的遺伝子を作製し、第ＩＸ因子タンパク質が、前記修飾された標的遺伝子から発現される、方法。
【請求項１６２】
第ＩＸ因子を細胞内で発現させる方法であって、請求項６５～１３１のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞に投与することを含み、
前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的遺伝子におけるヌクレアーゼ標的部位を切断して切断部位を作製し、前記核酸構築物が、前記切断部位に挿入されて、修飾された標的遺伝子を作製し、第ＩＸ因子タンパク質が、前記修飾された標的遺伝子から発現される、方法。
【請求項１６３】
前記ヌクレアーゼ剤が、
（ａ）Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする核酸、及び
（ｂ）ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、前記ガイドＲＮＡが、前記Ｃａｓタンパク質に結合し、前記Ｃａｓタンパク質に前記ガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる、請求項１６１又は１６２に記載の方法。
【請求項１６４】
前記核酸構築物、前記Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸、及び前記ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする前記１つ以上のＤＮＡが、同時に投与される、請求項１６３に記載の方法。
【請求項１６５】
前記核酸構築物が、前記Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸、及び前記ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする前記１つ以上のＤＮＡと同時に投与されない、請求項１６３に記載の方法。
【請求項１６６】
前記標的遺伝子が、アルブミン遺伝子であり、前記ヌクレアーゼ標的部位が、前記アルブミン遺伝子のイントロン１内にある、請求項１６１～１６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６７】
前記細胞が、肝臓細胞である、請求項１６０～１６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６８】
前記細胞が、肝細胞である、請求項１６０～１６７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６９】
前記細胞が、ヒト細胞である、請求項１６０～１６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７０】
前記細胞が、新生児細胞である、請求項１６０～１６９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１７１】
前記新生児細胞が、出生後２４週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項１７０に記載の方法。
【請求項１７２】
前記新生児細胞が、出生後１２週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項１７０に記載の方法。
【請求項１７３】
前記新生児細胞が、出生後８週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項１７０に記載の方法。
【請求項１７４】
前記新生児細胞が、出生後４週間以内のヒト新生児対象からのものである、請求項１７０に記載の方法。
【請求項１７５】
前記細胞が、新生児細胞ではない、請求項１６０～１６９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７６】
前記細胞が、インビボである、請求項１６０～１７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７７】
前記細胞が、インビトロ又はエクスビボである、請求項１６０～１７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７８】
対象における第ＩＸ因子欠乏症を治療する方法であって、請求項６５～１３１のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。
【請求項１７９】
対象における血友病Ｂを治療する方法であって、請求項６５～１３１のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。
【請求項１８０】
血友病Ｂを有する対象における自然出血を予防又は阻害する方法であって、請求項６５～１３１のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。
【請求項１８１】
前記血友病Ｂが、軽度の血友病Ｂである、請求項１７９又は１８０に記載の方法。
【請求項１８２】
前記血友病Ｂが、中程度の血友病Ｂである、請求項１７９又は１８０に記載の方法。
【請求項１８３】
前記血友病Ｂが、重度の血友病Ｂである、請求項１７９又は１８０に記載の方法。
【請求項１８４】
前記ヌクレアーゼ剤が、
（ａ）Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする核酸、及び
（ｂ）ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、前記ガイドＲＮＡが、前記Ｃａｓタンパク質に結合し、前記Ｃａｓタンパク質に前記ガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる、請求項１７８～１８３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８５】
前記ガイドＲＮＡ標的配列が、アルブミン遺伝子のイントロン１内にある、請求項１８４に記載の方法。
【請求項１８６】
前記核酸構築物、前記Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸、及び前記ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする前記１つ以上のＤＮＡが、同時に投与される、請求項１８４又は１８５に記載の方法。
【請求項１８７】

前記核酸構築物が、前記Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸、及び前記ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする前記１つ以上のＤＮＡと同時に投与されない、請求項１８４又は１８５に記載の方法。

【請求項１８８】

前記対象が、新生児対象である、請求項１７８～１８７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８９】

前記新生児対象が、出生後２４週間以内のヒト新生児対象である、請求項１８８に記載の方法。

【請求項１９０】

前記新生児対象ヒト新生児対象が、出生後１２週間以内である、請求項１８８に記載の方法。

【請求項１９１】

前記新生児対象が、出生後８週間以内のヒト新生児対象である、請求項１８８に記載の方法。

【請求項１９２】

前記新生児対象が、出生後４週間以内のヒト新生児対象である、請求項１８８に記載の方法。

【請求項１９３】

前記対象が、新生児対象ではない、請求項１７８～１８７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９４】

前記対象が、ヒト対象である、請求項１７８～１９３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９５】

前記方法が、前記対象において治療有効レベルの循環第ＩＸ因子タンパク質をもたらす、請求項１７８～１９４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９６】

前記方法が、前記対象において治療有効レベルの循環第ＩＸ因子凝固活性をもたらす、請求項１７８～１９５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９７】

前記方法が、前記第ＩＸ因子タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、前記対象における前記第ＩＸ因子タンパク質の発現の増加をもたらす、請求項１７８～１９６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９８】

前記方法が、前記第ＩＸ因子タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、前記対象における前記第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルの増加をもたらす、請求項１７８～１９７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９９】

前記方法が、少なくとも約１μｇ／ｍＬ、少なくとも約２μｇ／ｍＬ、少なくとも約３μｇ／ｍＬ、少なくとも約４μｇ／ｍＬ、又は少なくとも約５μｇ／ｍＬの前記対象における前記第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項１７８～１９８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２００】

前記方法が、少なくとも約５μｇ／ｍＬの前記対象における前記第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項１７８～１９９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０１】

前記方法が、約１μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬの前記対象における前記第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項１７８～２００のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０２】

前記方法が、正常の少なくとも約１％、正常の少なくとも約５％、正常の少なくとも約１０％、正常の少なくとも約１５％、正常の少なくとも約２０％、正常の少なくとも約２

５％、正常の少なくとも約３０％、正常の少なくとも約３５％、正常の少なくとも約４０％、正常の少なくとも約４５％、又は正常の少なくとも約５０％の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成し、任意選択的に、前記方法が、正常の約４０％～約１５０％又は約４０％～約１００％の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する、請求項１７８～２０１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０３】

（Ｉ）前記対象が重度の血友病を有し、前記方法が正常の少なくとも約１％若しくは約１％超の循環第ＩＸ因子タンパク質若しくは凝固活性レベルを達成するか、

（ＩＩ）前記対象が中程度の血友病を有し、前記方法が正常の少なくとも約５％若しくは約５％超の循環第ＩＸ因子タンパク質若しくは凝固活性レベルを達成するか、又は

（ＩＩＩ）前記対象が軽度の血友病を有し、前記方法が正常の少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、約１０％超、約１５％超、約２０％超、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、若しくは約５０％超の循環第ＩＸ因子タンパク質若しくは凝固活性レベルを達成する、請求項２０２に記載の方法。

【請求項２０４】

前記方法が、正常の少なくとも約１５％の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する、請求項２０２又は２０３に記載の方法。

【請求項２０５】

前記方法が、正常の約３００％未満、約２５０％未満、約２００％未満、又は約１５０％未満の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する、請求項１７８～２０４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０６】

前記方法が、前記対象のベースラインの第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルよりも、循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを少なくとも約１％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％増加させる、請求項１７８～２０５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０７】

前記循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルが、前記組成物の投与後、少なくとも約１ヶ月間、少なくとも約２ヶ月間、少なくとも約３ヶ月間、少なくとも約６ヶ月間、少なくとも約１年間、又は少なくとも約２年間持続する、請求項１７８～２０６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０８】

前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性が、前記投与することの６ヶ月後で前記ヒト対象について測定された発現のピークレベルでの前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性の少なくとも５０％である、請求項１７８～２０７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０９】

前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性が、前記投与することの１年後で前記ヒト対象について測定された発現のピークレベルでの前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性の少なくとも５０％である、請求項１７８～２０８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２１０】

前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性が、前記投与することの６ヶ月後で前記ヒト対象について測定された発現のピークレベルでの前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性の少なくとも６０％である、請求項１７８～２０９のいずれか一項に記載の方

法。
【請求項２１１】
前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性が、前記投与することの２年後で前記ヒト対象について測定された発現のピークレベルでの前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性の少なくとも５０％である、請求項１７８～２１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１２】
前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性が、前記投与することの２年後で前記ヒト対象について測定された発現のピークレベルでの前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性の少なくとも６０％である、請求項１７８～２１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１３】
前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性が、前記投与することの６ヶ月後で前記ヒト対象について測定された発現のピークレベルでの前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性の少なくとも６０％である、請求項１７８～２１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１４】
前記方法が、前記対象に前記組成物を投与する前に、前記対象における既存のＡＡＶ免疫力を評価することを更に含む、請求項１７８～２１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１５】
前記既存のＡＡＶ免疫力が、既存のＡＡＶ８免疫力である、請求項２１４に記載の方法。
【請求項２１６】
既存のＡＡＶ免疫力を評価することが、全抗体免疫アッセイ又は中和抗体アッセイを使用して免疫原性を評価することを含む、請求項２１４又は２１５に記載の方法。
【請求項２１７】
第ＩＸ因子タンパク質をコードする核酸を、新生児細胞又は新生児細胞の集団における標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団に、
（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び
（ｂ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、
前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。
【請求項２１８】
標的ゲノム遺伝子座から第ＩＸ因子タンパク質を、新生児細胞又は新生児細胞の集団において発現させる方法であって、前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団に、
（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び
（ｂ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、
前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記第ＩＸ因子タンパク質が、前記修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。
【請求項２１９】
前記新生児細胞が、肝臓細胞であるか、又は前記新生児細胞の集団が、肝臓細胞の集団である、請求項２１７又は２１８に記載の方法。
【請求項２２０】
前記新生児細胞が、肝細胞であるか、又は前記新生児細胞の集団が、肝細胞の集団であ

る、請求項２１７～２１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２１】
前記新生児細胞が、ヒト細胞であるか、又は前記新生児細胞の集団が、ヒト細胞の集団である、請求項２１７～２２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２２】
前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後２４週間以内の新生児対象からのものである、請求項２２１に記載の方法。
【請求項２２３】
前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後１２週間以内の新生児対象からのものである、請求項２２１に記載の方法。
【請求項２２４】
前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後８週間以内の新生児対象からのものである、請求項２２１に記載の方法。
【請求項２２５】
前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後４週間以内の新生児対象からのものである、請求項２２１に記載の方法。
【請求項２２６】
前記新生児細胞が、インビトロ若しくはエクスビボであるか、又は前記新生児細胞の集団が、インビトロ若しくはエクスビボである、請求項２１７～２２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２７】
前記新生児細胞が、新生児対象におけるインビボであるか、又は前記新生児細胞の集団が、新生児対象におけるインビボである、請求項２１７～２２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２８】
第ＩＸ因子タンパク質をコードする核酸を、新生児対象における新生児細胞内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法であって、前記新生児対象に、
（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び
（ｂ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、
前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、方法。
【請求項２２９】
標的ゲノム遺伝子座から第ＩＸ因子タンパク質を、新生児対象における新生児細胞において発現させる方法であって、前記新生児対象に、
（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び
（ｂ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、前記標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、
前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記第ＩＸ因子タンパク質が、前記修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。
【請求項２３０】
前記新生児細胞が、肝臓細胞である、請求項２２８又は２２９に記載の方法。
【請求項２３１】
前記新生児細胞が、肝細胞である、請求項２２８～２３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３２】
前記新生児細胞が、ヒト細胞である、請求項２２８～２３１のいずれか一項に記載の方

法。
【請求項２３３】
第ＩＸ因子欠乏症の治療を必要とする新生児対象においてそれを行う方法であって、前記新生児対象に、
（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び
（ｂ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、
前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記第ＩＸ因子タンパク質が、前記修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現される、方法。
【請求項２３４】
血友病Ｂを有する新生児対象における自然出血を予防又は阻害する方法であって、前記新生児対象に、
（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び
（ｂ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、
前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記第ＩＸ因子タンパク質が、前記修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現され、前記新生児対象における自然出血を予防又は阻害する、方法。
【請求項２３５】
前記対象が、血友病Ｂを有する、請求項２２７～２３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３６】
血友病Ｂの治療を必要とする新生児対象においてそれを行う方法であって、前記新生児対象に、
（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び
（ｂ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、前記ヌクレアーゼ剤が、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、
前記ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物が、前記標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製し、前記第ＩＸ因子タンパク質が、前記修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって前記血友病Ｂを治療する、方法。
【請求項２３７】
前記対象が、軽度の血友病Ｂを有する、請求項２３５又は２３６に記載の方法。
【請求項２３８】
前記対象が、中程度の血友病Ｂを有する、請求項２３５又は２３６に記載の方法。
【請求項２３９】
前記対象が、重度の血友病Ｂを有する、請求項２３５又は２３６に記載の方法。
【請求項２４０】
前記対象が、ヒト対象である、請求項２２７～２３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４１】
前記新生児対象が、出生後２４週間以内のヒト新生児対象である、請求項２４０に記載の方法。
【請求項２４２】
前記新生児対象が、出生後１２週間以内のヒト新生児対象である、請求項２４０に記載の方法。
【請求項２４３】

前記新生児対象が、出生後８週間以内のヒト新生児対象である、請求項２４０に記載の方法。
【請求項２４４】
前記新生児対象が、出生後４週間以内のヒト新生児対象である、請求項２４０に記載の方法。
【請求項２４５】
前記方法が、前記第ＩＸ因子タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、前記対象における前記第ＩＸ因子タンパク質の発現の増加をもたらす、請求項２２７～２４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４６】
前記方法が、前記第ＩＸ因子タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、前記対象における前記第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルの増加をもたらす、請求項２２７～２４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４７】
前記方法が、少なくとも約１μｇ／ｍＬ、少なくとも約２μｇ／ｍＬ、少なくとも約３μｇ／ｍＬ、少なくとも約４μｇ／ｍＬ、又は少なくとも約５μｇ／ｍＬの前記対象における前記第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項２２７～２４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４８】
前記方法が、少なくとも約５μｇ／ｍＬの前記対象における前記第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項２２７～２４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４９】
前記方法が、約１μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬの前記対象における前記第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルをもたらす、請求項２２７～２４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５０】
前記方法が、前記対象のベースラインの第ＩＸ因子タンパク質の発現よりも、第ＩＸ因子タンパク質の発現を少なくとも約１％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％増加させる、請求項２２７～２４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５１】
前記方法が、前記対象のベースラインの第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルよりも、血清中の第ＩＸ因子タンパク質のレベルを少なくとも約１％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％増加させる、請求項２２７～２５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５２】
前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性が、前記投与することの６ヶ月後で前記ヒト対象について測定された発現のピークレベルでの前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性の少なくとも５０％である、請求項２２７～２５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５３】
前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性が、前記投与することの１年後で前記ヒト対象について測定された発現のピークレベルでの前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性の少なくとも５０％である、請求項２２７～２５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５４】

前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性が、前記投与することの６ヶ月後で前記ヒト対象について測定された発現のピークレベルでの前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性の少なくとも６０％である、請求項２２７～２５３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５５】

前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性が、前記投与することの２年後で前記ヒト対象について測定された発現のピークレベルでの前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性の少なくとも５０％である、請求項２２７～２５４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５６】

前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性が、前記投与することの２年後で前記ヒト対象について測定された発現のピークレベルでの前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性の少なくとも６０％である、請求項２２７～２５５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５７】

前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性が、前記投与することの６ヶ月後で前記ヒト対象について測定された発現のピークレベルでの前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現又は活性の少なくとも６０％である、請求項２２７～２５６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５８】

前記方法が、前記対象において治療有効レベルの循環第ＩＸ因子タンパク質をもたらす、請求項２２７～２５７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５９】

前記方法が、前記対象において治療有効レベルの循環第ＩＸ因子凝固活性をもたらす、請求項２２７～２５８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６０】

前記方法が、正常の少なくとも約１％、正常の少なくとも約５％、正常の少なくとも約１０％、正常の少なくとも約１５％、正常の少なくとも約２０％、正常の少なくとも約２５％、正常の少なくとも約３０％、正常の少なくとも約３５％、正常の少なくとも約４０％、正常の少なくとも約４５％、又は正常の少なくとも約５０％の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成し、任意選択的に、前記方法が、正常の約４０％～約１５０％又は約４０％～約１００％の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する、請求項２２７～２５９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６１】

（Ｉ）前記対象が重度の血友病を有し、前記方法が正常の少なくとも約１％若しくは約１％超の循環第ＩＸ因子タンパク質若しくは凝固活性レベルを達成するか、

（ＩＩ）前記対象が中程度の血友病を有し、前記方法が正常の少なくとも約５％若しくは約５％超の循環第ＩＸ因子タンパク質若しくは凝固活性レベルを達成するか、又は

（ＩＩＩ）前記対象が軽度の血友病を有し、前記方法が正常の少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、約１０％超、約１５％超、約２０％超、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、若しくは約５０％超の循環第ＩＸ因子タンパク質若しくは凝固活性レベルを達成する、請求項２６０に記載の方法。

【請求項２６２】

前記方法が、正常の少なくとも約１５％の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する、請求項２６０又は２６１に記載の方法。

【請求項２６３】

前記方法が、正常の約３００％未満、約２５０％未満、約２００％未満、又は約１５０％未満の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する、請求項２２７～２６

２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６４】
前記方法が、前記対象のベースラインの第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルよりも、循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを少なくとも約１％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％増加させる、請求項２２７～２６３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６５】
前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記１つ以上の核酸と同時に投与される、請求項２１７～２６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６６】
前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記１つ以上の核酸と同時に投与されない、請求項２１７～２６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６７】
前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記１つ以上の核酸の前に投与される、請求項２６６に記載の方法。
【請求項２６８】
前記核酸構築物が、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記１つ以上の核酸の後に投与される、請求項２６６に記載の方法。
【請求項２６９】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２１７～２６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７０】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードする、請求項２１７～２６９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７１】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、
（Ｉ）配列番号１６６、１６５、１６４、及び１６７～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％同一であり、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は
（ＩＩ）配列番号１５９、１６０、及び１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、若しくは（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２１７～２７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７２】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、
（Ｉ）配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、
（ＩＩ）配列番号１６５に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は
（ＩＩＩ）配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇してお

り、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２１７～２７１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７３】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、
（Ｉ）配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は
（ＩＩ）配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２１７～２７２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７４】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２１７～２７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７５】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２１７～２７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７６】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している、請求項２１７～２７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７７】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６、１６５、又は１５９を含む、請求項２１７～２７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７８】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６、１６５、又は１５９からなる、請求項２７７に記載の方法。
【請求項２７９】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６又は１５９を含む、請求項２１７～２７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８０】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６又は１５９からなる、請求項２７９に記載の方法。
【請求項２８１】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項２１７～２７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８２】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６からなる、請求項２８１に記載の方法。
【請求項２８３】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項２１７～２７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８４】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９からなる、請求項２８３に記載の方法。

【請求項２８５】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列の上流にスプライスアクセプターを含む、請求項２１７～２８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８６】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列の下流にポリアデニル化シグナルを含む、請求項２１７～２８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８７】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列の下流にポリアデニル化シグナルを含む、請求項２１７～２８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８８】
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項２１７～２８７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８９】
前記核酸構築物が、非相同末端結合を介して前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、請求項２８８に記載の方法。
【請求項２９０】
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含む、請求項２１７～２８７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９１】
前記核酸構築物が、相同組換え修復を介して前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、請求項２９０に記載の方法。
【請求項２９２】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まない、請求項２１７～２９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９３】
前記核酸構築物が、双方向性構築物であり、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列である、請求項２１７～２９２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９４】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む、請求項２９３に記載の方法。
【請求項２９５】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、異なっているが、同じ第ＩＸ因子タンパク質配列をコードし、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２９４に記載の方法。
【請求項２９６】
（Ｉ）（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、若しくは（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９５％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は
（ＩＩ）（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９５％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（

ｉｉ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、若しくは（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２９４又は２９５に記載の方法。

【請求項２９７】

（Ｉ）（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は

（ＩＩ）（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２９４～２９６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２９８】

前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇しており、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している、請求項２９４～２９７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２９９】

前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項２９４～２９８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３００】

前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードし、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードする、請求項２９４～２９９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０１】

（Ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は

（ＩＩ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項２９４～３００のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０２】

（Ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９からなり、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６からなるか、又は

（ＩＩ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６からなり、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９からなる、請求項２９４～

３０１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０３】
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含む、請求項２９４～３０２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０４】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、異なっているが、前記同じ第ＩＸ因子タンパク質配列をコードし、前記第１のポリアデニル化シグナル及び前記第２のポリアデニル化シグナルが、異なっている、請求項３０３に記載の方法。
【請求項３０５】
前記核酸構築物が、双方向性構築物であり、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、前記双方向性構築物が、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、
（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項２１７～３０４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０６】
前記核酸構築物が、配列番号２１０、若しくは１８０、又はそれらの逆相補体を含む、請求項２１７～３０５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０７】
前記核酸構築物が、一本鎖ＤＮＡ又は二本鎖ＤＮＡである、請求項２１７～３０６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０８】
前記核酸構築物が、一本鎖ＤＮＡである、請求項３０７に記載の方法。
【請求項３０９】
前記核酸構築物が、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある、請求項２１７～３０８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１０】
前記核酸構築物が、前記核酸ベクター内にある、請求項３０９に記載の方法。
【請求項３１１】
前記核酸ベクターが、ウイルスベクターである、請求項３１０に記載の方法。
【請求項３１２】
前記核酸ベクターが、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含む

か、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項３１０又は３１１に記載の方法。
【請求項３１３】
前記ＡＡＶベクターが、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである、請求項３１２に記載の方法。
【請求項３１４】
前記ＡＡＶベクターが、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する、請求項３１２又は３１３に記載の方法。
【請求項３１５】
前記ＡＡＶベクターが、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである、請求項３１４に記載の方法。
【請求項３１６】
前記ＡＡＶベクターが、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである、請求項３１５に記載の方法。
【請求項３１７】
前記核酸構築物が、双方向性構築物であり、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、前記双方向性構築物が、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、
（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、
前記核酸構築物が、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項２１７～３１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１８】
前記核酸構築物が、一方向性構築物である、請求項２１７～２９２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１９】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、スプライスアクセプター、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含

まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項３１８に記載の方法。
【請求項３２０】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項３１９に記載の方法。
【請求項３２１】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項３１９に記載の方法。
【請求項３２２】
前記核酸構築物が、一本鎖ＤＮＡ又は二本鎖ＤＮＡである、請求項３１８～３２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２３】
前記核酸構築物が、一本鎖ＤＮＡである、請求項３２２に記載の方法。
【請求項３２４】
前記核酸構築物が、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある、請求項３１８～３２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２５】
前記核酸構築物が、前記核酸ベクター内にある、請求項３２４に記載の方法。
【請求項３２６】
前記核酸ベクターが、ウイルスベクターである、請求項３２５に記載の方法。
【請求項３２７】
前記核酸ベクターが、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項３２５又は３２６に記載の方法。
【請求項３２８】
前記ＡＡＶベクターが、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである、請求項３２７に記載の方法。
【請求項３２９】
前記ＡＡＶベクターが、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する、請求項３２７又は３２８に記載の方法。
【請求項３３０】
前記ＡＡＶベクターが、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである、請求項３２９に記載の方法。
【請求項３３１】
前記ＡＡＶベクターが、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである、請求項３３０に記載の方法。
【請求項３３２】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、スプライスアクセプター、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含

まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、
前記核酸構築物が、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項３１８～３３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３３】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項３３２に記載の方法。
【請求項３３４】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項３３２に記載の方法。
【請求項３３５】
前記標的ゲノム遺伝子座が、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子である、請求項２１７～３３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３６】
前記ヌクレアーゼ標的部位が、前記アルブミン遺伝子のイントロン１内にある、請求項３３５に記載の方法。
【請求項３３７】
前記ヌクレアーゼ剤が、
（ａ）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、
（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、又は
（ｃ）（ｉ）Ｃａｓタンパク質若しくは前記Ｃａｓタンパク質をコードする核酸、及び
（ｉｉ）ガイドＲＮＡ若しくは前記ガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、前記ガイドＲＮＡが、前記Ｃａｓタンパク質に結合し、前記Ｃａｓタンパク質に前記ガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる、請求項２１７～３３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３８】
前記ヌクレアーゼ剤が、
（ａ）Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする核酸、及び
（ｂ）ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、前記ガイドＲＮＡが、前記Ｃａｓタンパク質に結合し、前記Ｃａｓタンパク質に前記ガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる、請求項２１７～３３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３９】
前記ガイドＲＮＡ標的配列が、アルブミン遺伝子のイントロン１内にある、請求項３３８に記載の方法。
【請求項３４０】
前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子である、請求項３３９に記載の方法。
【請求項３４１】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、若しくは少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、任意選択的に、前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列

番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される前記配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、若しくは少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、かつ／又は

（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される前記配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、任意選択的に、前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される前記配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である、請求項３３８～３４０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４２】

前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つを含み、任意選択的に、前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つを含む、請求項３３８～３４１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４３】

前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つからなり、任意選択的に、前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つからなる、請求項３３８～３４２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４４】

前記ガイドＲＮＡが、配列番号６２～１２５のうちのいずれか１つを含み、任意選択的に、前記ガイドＲＮＡが、配列番号６８、１００、６２、９４、６５、９７、７３、及び１０５のうちのいずれか１つを含む、請求項３３８～３４３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４５】

（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、若しくは少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、かつ／又は

（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である、請求項３３８～３４４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４６】

前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６を含む、請求項３３８～３４５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４７】

前記ＤＮＡ標的化セグメントが、配列番号３６からなる、請求項３３８～３４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４８】

前記ガイドＲＮＡが、配列番号６８又は１００を含む、請求項３３８～３４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４９】

前記方法が、ＲＮＡの形態で前記ガイドＲＮＡを投与することを含む、請求項３３８～３４８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３５０】

前記ガイドＲＮＡが、少なくとも１つの修飾を含む、請求項３３８～３４９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３５１】

前記少なくとも１つの修飾が、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項３５０に記載の方法。

【請求項３５２】

前記少なくとも１つの修飾が、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項３５０又は３５１に記載の方法。

【請求項３５３】

前記少なくとも１つの修飾が、前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の最初の５つのヌクレ

オチドのうちの１つ以上での修飾を含む、請求項３５０～３５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５４】
前記少なくとも１つの修飾が、前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の最後の５つのヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾を含む、請求項３５０～３５３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５５】
前記少なくとも１つの修飾が、前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項３５０～３５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５６】
前記少なくとも１つの修飾が、前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項３５０～３５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５７】
前記少なくとも１つの修飾が、前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項３５０～３５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５８】
前記少なくとも１つの修飾が、前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項３５０～３５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５９】
前記少なくとも１つの修飾が、（ｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含む、請求項３５０～３５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６０】
前記ガイドＲＮＡが、単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、請求項３３８～３５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６１】
前記方法が、ＲＮＡの前記形態で前記ガイドＲＮＡを投与することを含み、前記ガイドＲＮＡが、配列番号１００を含み、前記ガイドＲＮＡが、（ｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含む、請求項３３８～３６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６２】
前記Ｃａｓタンパク質が、Ｃａｓ９タンパク質である、請求項３３８～３６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６３】
前記Ｃａｓ９タンパク質が、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、又はＮｅｉｓｓｅｒｉａ ｍ

ｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ　Ｃａｓ９タンパク質に由来する、請求項３６２に記載の方法。
【請求項３６４】
前記Ｃａｓタンパク質が、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質に由来する、請求項３６２に記載の方法。
【請求項３６５】
前記Ｃａｓタンパク質が、配列番号１１に示される配列を含む、請求項３３８～３６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６６】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸が、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項３３８～３６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６７】
前記方法が、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を投与することを含み、前記核酸が、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む、請求項３３８～３６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６８】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、少なくとも１つの修飾を含む、請求項３６７に記載の方法。
【請求項３６９】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、１つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている、請求項３６７又は３６８に記載の方法。
【請求項３７０】
前記修飾ウリジンが、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンである、請求項３６９に記載の方法。
【請求項３７１】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されている、請求項３６９又は３７０に記載の方法。
【請求項３７２】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、５’キャップを含む、請求項３６７～３７１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７３】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、ポリ（Ａ）テールを含む、請求項３６７～３７２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７４】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される配列を含む、請求項３６７～３７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７５】
前記方法が、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を投与することを含み、前記核酸が、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される前記配列を含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む、請求項３３８～３７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７６】
前記方法が、ＲＮＡの前記形態で前記ガイドＲＮＡを投与することを含み、前記ガイドＲＮＡが、配列番号６８又は１００を含み、
前記方法が、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を投与することを含み、前記核酸が、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、前記Ｃａｓタンパク質をコ

ードする前記ｍＲＮＡが、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される前記配列を含む、請求項３３８～３７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７７】
前記方法が、ＲＮＡの前記形態で前記ガイドＲＮＡを投与することを含み、前記ガイドＲＮＡが、配列番号１００を含み、前記ガイドＲＮＡが、（ｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、
前記方法が、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を投与することを含み、前記核酸が、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される前記配列を含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む、請求項３３８～３７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７８】
前記核酸構築物が、双方向性構築物であり、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、前記双方向性構築物が、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、
（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項３７６に記載の方法。
【請求項３７９】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、スプライスアクセプター、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項３７６に記載の方法。
【請求項３８０】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項３７９に記載の方法。
【請求項３８１】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項３７９に記載の方法。
【請求項３８２】
前記核酸構築物が、双方向性構築物であり、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、前記双方向性構築物が、第２の第ＩＸ因

子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、
（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項３７７に記載の方法。
【請求項３８３】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、スプライスアクセプター、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まない、請求項３７７に記載の方法。
【請求項３８４】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項３８３に記載の方法。
【請求項３８５】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項３８３に記載の方法。
【請求項３８６】
前記Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸、及び前記ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする前記１つ以上のＤＮＡが、脂質ナノ粒子と会合している、請求項３３８～３８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８７】
前記脂質ナノ粒子が、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含む、請求項３８６に記載の方法。
【請求項３８８】
前記カチオン性脂質が、脂質Ａ（（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアート）である、請求項３８７に記載の方法。
【請求項３８９】
前記中性脂質が、ジステアロイルホスファチジルコリン又は１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）である、請求項３８７又は３８８に記載の方法。
【請求項３９０】
前記ヘルパー脂質が、コレステロールである、請求項３８７～３８９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９１】
前記ステルス脂質が、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００である、請求項３８７～３９０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３９２】
前記カチオン性脂質が脂質Ａであり、前記中性脂質がＤＳＰＣであり、前記ヘルパー脂質がコレステロールであり、前記ステルス脂質がＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである、請求項３８７～３９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９３】
前記脂質ナノ粒子が、以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで４つの脂質を含む、請求項３８７～３９２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９４】
前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子であり、
前記方法が、ＲＮＡの前記形態で前記ガイドＲＮＡを投与することを含み、前記ガイドＲＮＡが、配列番号６８又は１００を含み、
前記方法が、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を投与することを含み、前記核酸が、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される前記配列を含み、
前記ガイドＲＮＡ及び前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している、請求項３３８～３９３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９５】
前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子であり、
前記方法が、ＲＮＡの前記形態で前記ガイドＲＮＡを投与することを含み、前記ガイドＲＮＡが、配列番号１００を含み、前記ガイドＲＮＡが、（ｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）前記ガイドＲＮＡの前記５’末端の前記最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）前記ガイドＲＮＡの前記３’末端の前記最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、
前記方法が、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を投与することを含み、前記核酸が、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される前記配列を含み、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、
前記ガイドＲＮＡ及び前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡが、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している、請求項３３８～３９３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９６】
前記核酸構築物が、双方向性構築物であり、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、前記双方向性構築物が、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、
（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第

２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、
前記核酸構築物が、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項３９４に記載の方法。
【請求項３９７】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、スプライスアクセプター、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、
前記核酸構築物が、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項３９４に記載の方法。
【請求項３９８】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項３９７に記載の方法。
【請求項３９９】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項３９７に記載の方法。
【請求項４００】
前記核酸構築物が、双方向性構築物であり、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、前記双方向性構築物が、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、
（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子

タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、
前記核酸構築物が、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項３９５に記載の方法。
【請求項４０１】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、
前記核酸構築物が、５’から３’に、スプライスアクセプター、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、
前記核酸構築物が、ホモロジーアームを含まず、
前記核酸構築物が、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、
任意選択的に、前記核酸構築物が、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端における前記ＩＴＲが、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項３９５に記載の方法。
【請求項４０２】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項４０１に記載の方法。
【請求項４０３】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項４０１に記載の方法。
【請求項４０４】
前記方法が、前記対象に前記核酸構築物を投与する前に、前記新生児対象における既存のＡＡＶ免疫力を評価することを更に含む、請求項２２８～４０３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０５】
前記既存のＡＡＶ免疫力が、既存のＡＡＶ８免疫力である、請求項４０４に記載の方法。
【請求項４０６】
既存のＡＡＶ免疫力を評価することが、全抗体免疫アッセイ又は中和抗体アッセイを使用して免疫原性を評価することを含む、請求項４０４又は４０５に記載の方法。
【請求項４０７】
請求項２１７～２２７及び２６５～４０６のいずれか一項に記載の方法によって作製された、新生児細胞又は新生児細胞の集団。

【請求項４０８】
標的ゲノム遺伝子座に挿入された第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物を含む、新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４０９】
前記新生児細胞が、肝臓細胞であるか、又は前記新生児細胞の集団が、肝臓細胞の集団である、請求項４０７又は４０８に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４１０】
前記新生児細胞が、肝細胞であるか、又は前記新生児細胞の集団が、肝細胞の集団である、請求項４０７～４０９のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４１１】
前記新生児細胞が、ヒト細胞であるか、又は前記新生児細胞の集団が、ヒト細胞の集団である、請求項４０７～４１０のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４１２】
前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後２４週間以内の新生児対象からのものである、請求項４１１に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４１３】
前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後１２週間以内の新生児対象からのものである、請求項４１１に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４１４】
前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後８週間以内の新生児対象からのものである、請求項４１１に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４１５】
前記新生児細胞又は前記新生児細胞の集団が、出生後４週間以内の新生児対象からのものである、請求項４１１に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４１６】
前記新生児細胞が、インビトロ若しくはエクスビボであるか、又は前記新生児細胞の集団が、インビトロ若しくはエクスビボである、請求項４０７～４１５のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４１７】
前記新生児細胞が、対象におけるインビボであるか、又は前記新生児細胞の集団が、インビボである、請求項４０７～４１５のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４１８】
前記第ＩＸ因子タンパク質が発現されている、請求項４０７～４１７のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４１９】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項４０７～４１８のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４２０】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードする、請求項４０７～４１９のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４２１】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、
（Ｉ）配列番号１６６、１６５、１６４、及び１６７～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％同一であり、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子

タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は
（ＩＩ）配列番号１５９、１６０、及び１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、若しくは（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項４０７～４２０のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４２２】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、
（Ｉ）配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、
（ＩＩ）配列番号１６５に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は
（ＩＩＩ）配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項４０７～４２１のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４２３】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、
（Ｉ）配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は
（ＩＩ）配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項４０７～４２２のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４２４】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項４０７～４２３のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４２５】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項４０７～４２３のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４２６】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している、請求項４０７～４２５のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４２７】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６、１６５、又は１５９を含む、請求項４０７～４２６のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４２８】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６、１６５、又は１５９からなる、請求項４２７に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４２９】

前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６又は１５９を含む、請求項４０７～４２０のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４３０】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６又は１５９からなる、請求項４２９に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４３１】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含む、請求項４０７～４２０のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４３２】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６からなる、請求項４３１に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４３３】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項４０７～４２０のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４３４】
前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９からなる、請求項４３３に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４３５】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列の上流にスプライスアクセプターを含む、請求項４０７～４３４のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４３６】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列の下流にポリアデニル化シグナルを含む、請求項４０７～４３５のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４３７】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列の下流にポリアデニル化シグナルを含む、請求項４０７～４３６のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４３８】
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、前記標的ゲノム遺伝子座において内因性プロモーターに作動可能に連結されている、請求項４０７～４３７のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４３９】
前記核酸構築物が、双方向性構築物であり、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列である、請求項４０７～４３８のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４４０】
前記核酸構築物が、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む、請求項４３９に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４４１】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、異なっているが、同じ第ＩＸ因子タンパク質配列をコードし、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項４４０に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４４２】
（Ｉ）（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して

少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、若しくは（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９５％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は

（ＩＩ）（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９５％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、若しくは（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項４４０又は４４１に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。

【請求項４４３】

（Ｉ）（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は

（ＩＩ）（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項４４０～４４２のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。

【請求項４４４】

前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇しており、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している、請求項４４０～４４３のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。

【請求項４４５】

前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、前記第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない、請求項４４０～４４４のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。

【請求項４４６】

前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードし、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１９５を含

む第ＩＸ因子タンパク質をコードする、請求項４４０～４４５のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４４７】
（Ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は
（ＩＩ）前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含む、請求項４４０～４４６のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４４８】
（Ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９からなり、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６からなるか、又は
（ＩＩ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６からなり、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９からなる、請求項４４０～４４７のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４４９】
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含む、請求項４４０～４４８のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４５０】
前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、異なっているが、前記同じ第ＩＸ因子タンパク質配列をコードし、前記第１のポリアデニル化シグナル及び前記第２のポリアデニル化シグナルが、異なっている、請求項４４９に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４５１】
前記核酸構築物が、双方向性構築物であり、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、前記双方向性構築物が、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、
前記核酸構築物が、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の前記逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、
（ｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）前記第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１６６を含み、前記第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、配列番号１５９を含み、
前記核酸構築物が、前記第ＩＸ因子タンパク質の前記発現を駆動するプロモーターを含まず、前記第ＩＸ因子タンパク質コード配列が、前記標的ゲノム遺伝子座において内因性プロモーターに作動可能に連結されている、請求項４０７～４５０のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４５２】
前記核酸構築物が、配列番号２１０、若しくは１８０、又はそれらの逆相補体を含む、請求項４０７～４５１のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４５３】
前記標的ゲノム遺伝子座が、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、前記アルブミン遺伝子が、ヒトアルブミン遺伝子である、請求項４０７～４５２のいずれか一項に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【請求項４５４】
前記ヌクレアーゼ標的部位が、前記アルブミン遺伝子のイントロン１内にある、請求項

４５３に記載の新生児細胞又は新生児細胞の集団。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２１年１０月２７日に出願された米国出願第６３／２７２，３２４号、２０２２年２月２日に出願された米国出願第６３／３０６，０３７号、及び２０２２年７月２９日に出願された米国出願第６３／３６９，８６４号の利益を主張し、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
ＥＦＳ Ｗｅｂを介したテキストファイルとして提出された配列表への参照
ファイル０５７７６６－５８６３６９．ｘｍｌに記載された配列表は５１６キロバイトであり、２０２２年１０月２６日に作成され、参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００３】
血友病Ｂは、凝固第ＩＸ因子（factor IX、ＦＩＸ）の欠乏症又は不在によって特徴付けられる稀な先天性遺伝性障害であり、出血素因をもたらす。これは、欠損又は欠陥ＦＩＸタンパク質をもたらす第９因子（factor 9、Ｆ９）遺伝子の遺伝性又は自然発生的なＸ連鎖劣性変異によって引き起こされる。血友病Ｂの世界的な発生率は、２５，０００人の男児出生においておよそ１人である。２０１９年付けの最新の世界中の血友病調査では、米国において４，０９３人の血友病Ｂを有して生活している患者が報告され、世界中で合計３１，９９７人の血友病Ｂ患者が報告された。Ｗｏｒｌｄ Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ，「Ｒｅｐｏｒｔ ｏｎ ｔｈｅ Ａｎｎｕａｌ Ｇｌｏｂａｌ Ｓｕｒｖｅｙ ２０１９」Ｗｏｒｌｄ Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ（２０２０）。
【０００４】
Ｘ連鎖劣性変異に起因して、血友病Ｂは主に男性に影響を及ぼすが、女性保因者も影響を受ける可能性がある。血友病Ｂの出血傾向は、因子の測定された濃度に関連し、軽度、中程度、又は重度として分類される。血友病Ｂの重度の症例及び中程度に重度の症例では、頻繁な自然出血エピソードが最も一般的な症状である。そのような出血エピソードは、筋肉及び関節において起こり得、疼痛及び運動制限を引き起こし、治療されないままである場合、滑膜炎、関節症、及び筋力低下を伴う関節の長期損傷をもたらし得る。
【０００５】
米国における現在の標準治療は、組換え又は血液ドナーの血漿由来のいずれかの凝血因子濃縮物（clotting factor concentrate、ＣＦＣ）による出血エピソードの予防及び治療である。しかしながら、アレルギー反応がＣＦＣ注入の３～４％で起こる可能性があり、患者のうちの約５％が反復投与後にＦＩＸ中和抗体を発生する。Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ ｅｔ ａｌ.「ＷＦＨ Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ，」Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ ２６．６：１－１５８（２０２０）。因子置き換えはまた、厄介であり（頻繁な静脈内投与を必要とする）、費用がかかり、出血エピソードを低減させるが、排除せず、依然として関節疾患及び障害の進行を引き起こす。
【発明の概要】
【０００６】
第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列又は第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む核酸構築物を含む組成物、組成物を含むセル、並びにそのような核酸構築物を使用する方法、例えば、第９因子核酸を細胞に導入する方法、第９因子核酸構築物を細胞内の標的遺伝子に組み込む方法、第ＩＸ因子を細胞内で発現させる方法、対象における第ＩＸ因子欠乏症を治療する方法、対象における血友病Ｂを治療する方法、及び血友病Ｂを有する対象における自然出血を予防又は阻害する方法が提供される。

【０００７】
一態様では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列又は第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む核酸構築物を含む、組成物が提供される。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、（Ｉ）配列番号１６６、１６５、１６４、及び１６７～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％同一であり、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は（ＩＩ）配列番号１５９、１６０、及び１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、若しくは（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。
【０００８】
いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、（Ｉ）配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、（ＩＩ）配列番号１６５に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は（ＩＩＩ）配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。
【０００９】
いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、（Ｉ）配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は（ＩＩ）配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。
【００１０】
いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードする。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６、１６５、又は１５９を含む。いくつかのそのような組成

物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６、１６５、又は１５９からなる。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６又は１５９を含む。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６又は１５９からなる。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６からなる。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５からなる。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９からなる。

【００１１】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の上流にスプライスアクセプターを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の下流にポリアデニル化シグナルを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の下流にポリアデニル化シグナルを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まない。

【００１２】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、双方向性構築物である。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含むか、又は核酸構築物は、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、異なっているが、同じ第ＩＸ因子タンパク質配列をコードし、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質は、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。

【００１３】

いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、又は（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ＩＩ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９５％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。

【００１４】

いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、又は（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ＩＩ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９５％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。

【００１５】
いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ＩＩ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。
【００１６】
いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ＩＩ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。
【００１７】
いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇しており、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している。
【００１８】
いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードし、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードする。
【００１９】
いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、（ＩＩ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９からなり、（ＩＩ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６からなる。
【００２０】
いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、（ＩＩ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９からなり、（ＩＩ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５からなる。
【００２１】
いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含むか、又は核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第１の第Ｉ

Ｘ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含む。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、異なっているが、同じ第ＩＸ因子タンパク質配列をコードし、第１のポリアデニル化シグナル及び第２のポリアデニル化シグナルは、異なっている。

【００２２】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。

【００２３】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、配列番号２１０、若しくは１８０、又はそれらの逆相補体を含む。

【００２４】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。

【００２５】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、配列番号２０９、若しくは１７９、又はそれらの逆相補体を含む。

【００２６】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡ又は二本鎖ＤＮＡである。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡである。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス（adeno-associated viral、ＡＡＶ）ベクターであり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（inverted terminal repeat、ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、一本

鎖ＡＡＶ（single-stranded AAV、ｓｓＡＡＶ）ベクターである。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、組換えＡＡＶ８（recombinant AAV8、ｒＡＡＶ８）ベクターである。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである。

【００２７】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。

【００２８】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。

【００２９】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一方向性構築物である。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子

タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００３０】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一方向性構築物である。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００３１】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡ又は二本鎖ＤＮＡである。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡである。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである。

【００３２】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかの

そのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００３３】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。いくつかのそのような組成物では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００３４】

いくつかのそのような組成物は、標的遺伝子におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とするヌクレアーゼ剤を更に含む。いくつかのそのような組成物では、標的遺伝子は、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような組成物では、ヌクレアーゼ剤は、（ａ）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（zinc finger nuclease、ＺＦＮ）、（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（transcription activator-like effector nuclease、ＴＡＬＥＮ）、又は（ｃ）（ｉ）Ｃａｓタンパク質若しくはＣａｓタンパク質をコードする核酸、及び（ｉｉ）ガイドＲＮＡ若しくはガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる。いくつかのそのような組成物では、ヌクレアーゼ剤は、（ａ）Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及び（ｂ）ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、アルブミン遺伝子のイントロン１におけるガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。

【００３５】

いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、若しくは少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、任意選択的に、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、若しくは少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、任意選択的に、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つを含み、任意選択的に、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つを含む。

いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つからなり、任意選択的に、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つからなる。いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡは、配列番号６２～１２５のうちのいずれか１つを含み、任意選択的に、ガイドＲＮＡは、配列番号６８、１００、６２、９４、６５、９７、７３、及び１０５のうちのいずれか１つを含む。

【００３６】

いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、若しくは少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６を含む。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６からなる。いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含む。

【００３７】

いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３０の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、若しくは少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３０に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３０を含む。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３０からなる。いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含む。

【００３８】

いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３３の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、若しくは少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３３に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３３を含む。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３３からなる。いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含む。

【００３９】

いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４１の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、若しくは少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４１に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４１を含む。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４１からなる。いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含む。

【００４０】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含む。いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡは、少なくとも１つの修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも１つの修飾は、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも１つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも１つの修飾は、ガイドＲＮＡの５’末端の最初の５つのヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも１つの修飾は、ガイドＲＮＡの３’末端の最後の５つのヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも１つの修飾は、ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも１つの修飾は、ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチ

オエート結合を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも１つの修飾は、ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも１つの修飾は、ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも１つの修飾は、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含む。

【００４１】

いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡは、単一のガイドＲＮＡ（single guide RNA、ｓｇＲＮＡ）である。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含む。

【００４２】

いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡは、単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含む。

【００４３】

いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡは、単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含む。

【００４４】

いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡは、単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含む。

【００４５】

いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質である。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質であるか、又はそれに由来する。いくつかのその

ような組成物では、Ｃａｓタンパク質は、配列番号１１に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化される。いくつかのそのような組成物では、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、少なくとも１つの修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、１つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている。いくつかのそのような組成物では、修飾ウリジンは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンである。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されている。いくつかのそのような組成物では、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されている。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’キャップを含む。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含む。

【００４６】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。

【００４７】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。

【００４８】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコード

する核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。

【００４９】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００５０】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００５１】
いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００５２】
いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００５３】
いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質

をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００５４】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００５５】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第

１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００５６】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００５７】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを

含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００５８】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テ

ールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００５９】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアー

ムを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００６０】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００６１】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガ

イドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００６２】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含

む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００６３】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テ

ールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００６４】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジー

アームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００６５】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００６６】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第

ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００６７】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００６８】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００６９】
いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００７０】
いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００７１】
いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク

質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００７２】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００７３】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核

酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００７４】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－

メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００７５】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は

、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００７６】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タン

パク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００７７】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００７８】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸

は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００７９】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－

メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００８０】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配

列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００８１】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００８２】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかの

そのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００８３】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００８４】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第Ｉ

Ｘ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００８５】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００８６】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００８７】
いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００８８】
いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００８９】
いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３

’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００９０】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５

’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００９１】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構

築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００９２】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプ

ライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００９３】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００９４】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’

末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００９５】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５

’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００９６】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向

性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００９７】

いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及びガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡは、脂質ナノ粒子と会合している。いくつかのそのような組成物では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含む。いくつかのそのような組成物では、カチオン性脂質は、脂質Ａである。いくつかのそのような組成物では、中性脂質は、ＤＳＰＣである。いくつかのそのような組成物では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかのそのような組成物では、ステルス脂質は、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００（1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ）である。いくつかのそのような組成物では、カチオン性脂質は脂質Ａであり、中性脂質はＤＳＰＣであり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、ステルス脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである。いくつかのそのような組成物では、脂質ナノ粒子は、以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで４つの脂質を含む。

【００９８】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含ま

ず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【００９９】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’

から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１００】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９

６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１０１】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１０２】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号

１２に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１０３】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプ

ターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１０４】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本

質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１０５】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖

ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１０６】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒ

ＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１０７】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレ

ステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１０８】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約

９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１０９】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり

、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核

酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１１０】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は

、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１１１】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュ

ードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１１２】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタ

ンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１１３】
いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセ

プター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１１４】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１

９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１１５】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１１６】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号

２２５に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１１７】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセ

プターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１１８】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本

質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１１９】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖

ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１２０】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１２１】
いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１２２】
いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコード

するｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから

本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１２３】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番

号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１２４】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に

、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１２５】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の

最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１２６】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の

最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番

号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１２７】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末

端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１２８】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組

成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１２９】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイド

ＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２５に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１３０】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番

号２２６に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１３１】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアク

セプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１３２】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本

質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１３３】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖

ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１３４】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１３５】
いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１３６】
いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している

。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１３７】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タ

ンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１３８】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを

含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１３９】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２

ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１４０】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、

第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１４１】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９４を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タ

ンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１４２】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは

、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１４３】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換

されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号９７を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第Ｉ

Ｘ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。
【０１４４】
いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパ

ク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１４５】

いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１０５を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む双方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含

み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６５を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６５を含む。任意選択的に、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１４６】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、第９因子核酸を細胞に導入する方法、第９因子核酸構築物を細胞内の標的遺伝子に組み込む方法、又は第ＩＸ因子を細胞内で発現させる方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、対象における第ＩＸ因子欠乏症を治療する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、対象における血友病Ｂを治療する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような組成物では、細胞は、新生児細胞である。いくつかのそのような組成物では、新生児細胞は、出生後２４週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような組成物では、新生児細胞は、出生後１２週間以内のヒト新生児対象からのものである。新生児細胞は、出生後８週間以内のヒト新生児対象からのものである。新生児細胞は、出生後４週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような組成物では、細胞は、新生児細胞ではない。いくつかのそのような組成物では、対象は、新生児対象である。いくつかのそのような組成物では、新生児対象は、出生後２４週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような組成物では、新生児対象は、出生後１２週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような組成物では、新生児対象は、出生後８週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような組成物では、新生児対象は、出生後４週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような組成物では、対象は、新生児対象ではない。

【０１４７】

別の態様では、上記の組成物のいずれかを含む細胞が提供される。いくつかのそのような細胞では、核酸構築物は、内因性標的遺伝子遺伝子座に組み込まれ、第ＩＸ因子タンパク質は、内因性標的遺伝子遺伝子座から発現されるか、又は核酸構築物は、内因性アルブミン遺伝子座のイントロン１に組み込まれ、第ＩＸ因子タンパク質は、内因性アルブミン

遺伝子座から発現される。いくつかのそのような細胞は、ヒト細胞である。いくつかのそのような細胞は、肝臓細胞（例えば、ヒト肝臓細胞）である。任意選択的に、肝臓細は、肝細胞である。いくつかのそのような細胞では、細胞は、新生児細胞である。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後２４週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後１２週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後８週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、新生児細胞は、出生後４週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような細胞では、細胞は、新生児細胞ではない。いくつかのそのような細胞では、細胞は、エクスビボ又はインビトロである。いくつかのそのような細胞では、細胞は、インビボである。

【０１４８】

別の態様では、第９因子核酸を細胞に導入する方法、第９因子核酸構築物を細胞内の標的遺伝子に組み込む方法、及び第ＩＸ因子を細胞内で発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、第９因子核酸を細胞に導入するためのものであり、上記組成物のいずれかを細胞に投与することを含む。いくつかのそのような方法は、第９因子核酸構築物を細胞内の標的遺伝子に組み込むためのものであり、上記組成物のいずれかを細胞に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的遺伝子におけるヌクレアーゼ標的部位を切断して切断部位を作製し、核酸構築物は、切断部位に挿入されて、修飾された標的遺伝子を作製し、第ＩＸ因子タンパク質は、修飾された標的遺伝子から発現される。いくつかのそのような方法は、第ＩＸ因子を細胞内で発現させるためのものであり、上記組成物のいずれかを細胞に投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的遺伝子におけるヌクレアーゼ標的部位を切断して切断部位を作製し、核酸構築物は、切断部位に挿入されて、修飾された標的遺伝子を作製し、第ＩＸ因子タンパク質は、修飾された標的遺伝子から発現される。

【０１４９】

いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ剤は、（ａ）Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及び（ｂ）ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる。

【０１５０】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物、Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及びガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡは、同時に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及びガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡと同時に投与されない。

【０１５１】

いくつかのそのような方法では、標的遺伝子は、アルブミン遺伝子であり、ヌクレアーゼ標的部位は、アルブミン遺伝子のイントロン１内にある。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝臓細胞である。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝細胞である。いくつかのそのような方法では、細胞は、ヒト細胞（例えば、ヒト肝臓細胞）である。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、出生後２４週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、出生後１２週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、出生後８週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、出生後４週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、細胞は、新生児細胞ではない。いくつかのそのような方法では、細胞は、インビボである。いくつかのそのような方法では、組織は、インビトロ又はエクスビボである。

【０１５２】

別の態様では、対象における第ＩＸ因子欠乏症を治療する方法、対象における血友病Ｂを治療する方法、及び血友病Ｂを有する対象における自然出血を予防又は阻害する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、対象における第ＩＸ因子欠乏症を治療するためのものであり、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含む。いくつかの方法は、対象における血友病Ｂを治療するためのものであり、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含む。いくつかの方法は、血友病Ｂを有する対象における自然出血を予防又は阻害するためのものであり、上記組成物のいずれかを対象に投与することを含む。

【０１５３】

いくつかのそのような方法では、血友病Ｂは、軽度の血友病Ｂである。いくつかのそのような方法では、血友病Ｂは、中程度の血友病Ｂである。いくつかのそのような方法では、血友病Ｂは、重度の血友病Ｂである。

【０１５４】

いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ剤は、（ａ）Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及び（ｂ）ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる。いくつかのそのような方法では、ガイドＲＮＡ標的配列は、アルブミン遺伝子のイントロン１内にある。

【０１５５】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物、Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及びガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡは、同時に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及びガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡと同時に投与されない。

【０１５６】

いくつかのそのような方法では、対象は、ヒト対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後２４週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後１２週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後８週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後４週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような方法では、対象は、新生児対象ではない。

【０１５７】

いくつかのそのような方法では、方法は、対象において治療有効レベルの循環第ＩＸ因子タンパク質をもたらす。いくつかのそのような方法では、方法は、対象において治療有効レベルの循環第ＩＸ因子凝固活性をもたらす。いくつかのそのような方法では、方法は、第ＩＸ因子タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象における第ＩＸ因子タンパク質の発現の増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、方法は、第ＩＸ因子タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象における第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルの増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、方法は、少なくとも約１μｇ／ｍＬ、少なくとも約２μｇ／ｍＬ、少なくとも約３μｇ／ｍＬ、少なくとも約４μｇ／ｍＬ、又は少なくとも約５μｇ／ｍＬの対象における第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、方法は、少なくとも約５μｇ／ｍＬの対象における第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、方法は、約１μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬの対象における第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルをもたらす。

【０１５８】

いくつかのそのような方法では、方法は、正常の少なくとも約１％、正常の少なくとも約５％、正常の少なくとも約１０％、正常の少なくとも約１５％、正常の少なくとも約２

０％、正常の少なくとも約２５％、正常の少なくとも約３０％、正常の少なくとも約３５％、正常の少なくとも約４０％、正常の少なくとも約４５％、又は正常の少なくとも約５０％の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、方法は、正常の約４０％～約１５０％又は約４０％～約１００％の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する。

【０１５９】

いくつかのそのような方法では、（Ｉ）対象は、重度の血友病を有し、方法は、正常の少なくとも約１％若しくは約１％超の循環第ＩＸ因子タンパク質若しくは凝固活性レベルを達成するか、（ＩＩ）対象は、中程度の血友病を有し、方法は、正常の少なくとも約５％若しくは約５％超の循環第ＩＸ因子タンパク質若しくは凝固活性レベルを達成するか、又は（ＩＩＩ）対象は、軽度の血友病を有し、方法は、正常の少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、約１０％超、約１５％超、約２０％超、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、若しくは約５０％超の循環第ＩＸ因子タンパク質若しくは凝固活性レベルを達成する。

【０１６０】

いくつかのそのような方法では、方法は、正常の少なくとも約１５％の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する。

【０１６１】

いくつかのそのような方法では、方法は、正常の約３００％未満、約２５０％未満、約２００％未満、又は約１５０％未満の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する。

【０１６２】

いくつかのそのような方法では、方法は、対象のベースラインの第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルよりも、循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを少なくとも約１％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％増加させる。

【０１６３】

いくつかのそのような方法では、循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルは、組成物の投与後、少なくとも約１ヶ月間、少なくとも約２ヶ月間、少なくとも約３ヶ月間、少なくとも約６ヶ月間、少なくとも約１年間、又は少なくとも約２年間持続する。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性は、投与することの６ヶ月後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでの第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性の少なくとも５０％である。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性は、投与することの１年後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでの第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性の少なくとも５０％である。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性は、投与することの６ヶ月後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでの第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性の少なくとも６０％である。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性は、投与することの２年後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでの第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性の少なくとも５０％である。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性は、投与することの２年後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでの第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性の少なくとも６０％である。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性は、投与することの６ヶ月後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでの第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性の少なくとも６０％である。

【０１６４】
いくつかのそのような方法では、方法は、対象に組成物を投与する前に、対象における既存のＡＡＶ免疫力を評価することを更に含む。いくつかのそのような方法では、既存のＡＡＶ免疫力は、既存のＡＡＶ８免疫力である。いくつかのそのような方法では、既存のＡＡＶ免疫力を評価することは、全抗体免疫アッセイ又は中和抗体アッセイを使用して免疫原性を評価することを含む。
【０１６５】
第ＩＸ因子タンパク質をコードする核酸を、新生児細胞、新生児細胞の集団、若しくは新生児対象における標的ゲノム遺伝子座に挿入するため、又は第ＩＸ因子タンパク質をコードする核酸を、新生児細胞、新生児細胞の集団、若しくは新生児対象における標的ゲノム遺伝子座から発現させるための組成物及び方法も提供される。対象（例えば、新生児対象における第ＩＸ因子欠乏症を治療する方法、自然出血を予防又は阻害する方法、及び血友病Ｂを治療する方法も提供される。標的ゲノム遺伝子座に挿入された第ＩＸ因子タンパク質をコードする核酸を含む新生児細胞又は新生児細胞の集団も提供される。
【０１６６】
一態様では、第ＩＸ因子タンパク質をコードする核酸を、新生児細胞又は新生児細胞の集団内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児細胞又は新生児細胞の集団に、（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び（ｂ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様では、標的ゲノム遺伝子座から第ＩＸ因子タンパク質を、新生児細胞又は新生児細胞の集団において発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児細胞又は新生児細胞の集団に、（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び（ｂ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製し、第ＩＸ因子タンパク質は、修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、肝臓細胞であるか、又は新生児細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、肝細胞であるか、又は新生児細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、ヒト細胞であるか、又は新生児細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後２４週間以内の新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後１２週間以内の新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後８週間以内の新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後４週間以内の新生児対象からのものである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、インビトロ若しくはエクスビボであるか、又は新生児細胞の集団は、インビトロ若しくはエクスビボである。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、新生児対象におけるインビボであるか、又は新生児細胞の集団は、新生児対象におけるインビボである。
【０１６７】
別の態様では、第ＩＸ因子タンパク質をコードする核酸を、新生児対象における新生児細胞又は新生児細胞の集団内の標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び（ｂ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標

的ゲノム遺伝子座に挿入される。別の態様では、標的ゲノム遺伝子座から第ＩＸ因子タンパク質を、新生児対象における新生児細胞又は新生児細胞の集団において発現させる方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び（ｂ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製し、第ＩＸ因子タンパク質は、修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現される。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、肝臓細胞であるか、又は新生児細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、肝細胞であるか、又は新生児細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような方法では、新生児細胞は、ヒト細胞であるか、又は新生児細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。

【０１６８】

別の態様では、第ＩＸ因子欠乏症の治療を必要とする新生児対象においてそれを行う方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び（ｂ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製し、第ＩＸ因子タンパク質は、修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現される。別の態様では、血友病Ｂを有する新生児対象における自然出血を予防又は阻害する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び（ｂ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製し、第ＩＸ因子タンパク質は、修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現され、新生児対象における自然出血を予防又は阻害する。いくつかのそのような方法では、対象は、血友病Ｂを有する。別の態様では、血友病Ｂの治療を必要とする新生児対象においてそれを行う方法が提供される。いくつかのそのような方法は、新生児対象に、（ａ）第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物、及び（ｂ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製し、第ＩＸ因子タンパク質は、修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現され、それによって血友病Ｂを治療する。いくつかのそのような方法では、対象は、軽度の血友病Ｂを有する。いくつかのそのような方法では、対象は、中程度の血友病Ｂを有する。いくつかのそのような方法では、対象は、重度の血友病Ｂを有する。

【０１６９】

いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後２４週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後１２週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後８週間以内のヒト新生児対象である。いくつかのそのような方法では、新生児対象は、出生後４週間以内のヒト新生児対象である。

【０１７０】

いくつかのそのような方法では、方法は、第ＩＸ因子タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象における第ＩＸ因子タンパク質の発現の増加をもたらす。いくつかのそのような方法では、方法は、第ＩＸ因子タンパク質をコードするエピソーム発現ベクターを対照対象に投与することを含む方法と比較して、対象における第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルの増加をもたらす。いく

つかのそのような方法では、方法は、少なくとも約１μｇ／ｍＬ、少なくとも約２μｇ／ｍＬ、少なくとも約３μｇ／ｍＬ、少なくとも約４μｇ／ｍＬ、又は少なくとも約５μｇ／ｍＬの対象における第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、方法は、少なくとも約５μｇ／ｍＬの対象における第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、方法は、約１μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬの対象における第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルをもたらす。いくつかのそのような方法では、方法は、対象のベースラインの第ＩＸ因子タンパク質の発現よりも、第ＩＸ因子タンパク質の発現を少なくとも約１％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％増加させる。いくつかのそのような方法では、方法は、対象のベースラインの第ＩＸ因子タンパク質の血清レベルよりも、血清中の第ＩＸ因子タンパク質のレベルを少なくとも約１％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％増加させる。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性は、投与することの６ヶ月後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでの第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性の少なくとも５０％である。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性は、投与することの１年後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでの第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性の少なくとも５０％である。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性は、投与することの６ヶ月後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでの第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性の少なくとも６０％である。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性は、投与することの２年後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでの第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性の少なくとも５０％である。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性は、投与することの２年後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでの第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性の少なくとも６０％である。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性は、投与することの６ヶ月後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでの第ＩＸ因子タンパク質の発現又は活性の少なくとも６０％である。いくつかのそのような方法では、方法は、対象において治療有効レベルの循環第ＩＸ因子タンパク質をもたらす。いくつかのそのような方法では、方法は、対象において治療有効レベルの循環第ＩＸ因子凝固活性をもたらす。いくつかのそのような方法では、方法は、正常の少なくとも約１％、正常の少なくとも約５％、正常の少なくとも約１０％、正常の少なくとも約１５％、正常の少なくとも約２０％、正常の少なくとも約２５％、正常の少なくとも約３０％、正常の少なくとも約３５％、正常の少なくとも約４０％、正常の少なくとも約４５％、又は正常の少なくとも約５０％の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、方法は、正常の約４０％～約１５０％又は約４０％～約１００％の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、対象は、重度の血友病を有し、方法は、正常の少なくとも約１％若しくは約１％超の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、対象は、中程度の血友病を有し、方法は、正常の少なくとも約５％又は約５％超の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、対象は、軽度の血友病を有し、方法は、正常の少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、約１０％超、約１５％超、約２０％超、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、又は約５０％超の循環第Ｉ

Ｘ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、方法は、正常の少なくとも約１５％の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、方法は、正常の約３００％未満、約２５０％未満、約２００％未満、又は約１５０％未満の循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを達成する。いくつかのそのような方法では、方法は、対象のベースラインの第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルよりも、循環第ＩＸ因子タンパク質又は凝固活性レベルを少なくとも約１％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％増加させる。いくつかのそのような方法では、対象は、ヒト対象である。

【０１７１】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸と同時に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸と同時に投与されない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸の前に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸の後に投与される。

【０１７２】

いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質は、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードする。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、（Ｉ）配列番号１６６、１６５、１６４、及び１６７～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％同一であり、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は（ＩＩ）配列番号１５９、１６０、及び１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、若しくは（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、（Ｉ）配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、（ＩＩ）配列番号１６５に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は（ＩＩＩ）配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、（Ｉ）配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は（ＩＩ）配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選

択的に、第ＩＸ因子タンパク質は、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質は、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６、１６５、又は１５９を含む。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６、１６５、又は１５９からなる。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６又は１５９を含む。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６又は１５９からなる。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６からなる。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９からなる。

【０１７３】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列の上流にスプライスアクセプターを含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列の下流にポリアデニル化シグナルを含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列の下流にポリアデニル化シグナルを含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、非相同末端結合を介して標的ゲノム遺伝子座に挿入される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、相同組換え修復を介して標的ゲノム遺伝子座に挿入される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まない。

【０１７４】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、双方向性構築物であり、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列である。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む。いくつかのそのような方法では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、異なっているが、同じ第ＩＸ因子タンパク質配列をコードし、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質は、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような方法では、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、又は（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９５％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような方法では、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９５％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、又は（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性

スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような方法では、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような方法では、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような方法では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇しており、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している。いくつかのそのような方法では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような方法では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードし、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードする。いくつかのそのような方法では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような方法では、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。いくつかのそのような方法では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９からなり、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６からなる。いくつかのそのような方法では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６からなり、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９からなる。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含む。いくつかのそのような方法では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、異なっているが、同じ第ＩＸ因子タンパク質配列をコードし、第１のポリアデニル化シグナル及び第２のポリアデニル化シグナルは、異なっている。

【０１７５】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、双方向性構築物であり、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、双方向性構築物は、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第

ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、配列番号２１０、若しくは１８０、又はそれらの逆相補体を含む。

【０１７６】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡ又は二本鎖ＤＮＡである。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡである。

【０１７７】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような方法では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような方法では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである。いくつかのそのような方法では、ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する。いくつかのそのような方法では、ＡＡＶベクターは、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである。いくつかのそのような方法では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである。

【０１７８】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、双方向性構築物であり、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、双方向性構築物は、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。

【０１７９】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、一方向性構築物である。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第ＩＸ因子タンパク

質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１８０】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡ又は二本鎖ＤＮＡである。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡである。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような方法では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような方法では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターであり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである。いくつかのそのような方法では、ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する。いくつかのそのような方法では、ＡＡＶベクターは、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである。いくつかのそのような方法では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである。

【０１８１】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１８２】

いくつかのそのような方法では、標的ゲノム遺伝子座は、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ標的部位は、アルブミン遺伝子のイントロン１内にある。いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ剤は、（ａ）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、又は（ｃ）（ｉ）Ｃａｓタンパク質若しくはＣａｓタンパク質をコードする核酸、及び（ｉｉ）ガイドＲＮＡ若しくはガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、

ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる。

【０１８３】

いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ剤は、（ａ）Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及び（ｂ）ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる。いくつかのそのような方法では、ガイドＲＮＡ標的配列は、アルブミン遺伝子のイントロン１内にある。いくつかのそのような方法では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含み、任意選択的に、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であり、任意選択的に、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される配列に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つを含み、任意選択的に、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つを含む。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つからなり、任意選択的に、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つからなる。いくつかのそのような方法では、ガイドＲＮＡは、配列番号６２～１２５のうちのいずれか１つを含み、任意選択的に、ガイドＲＮＡは、配列番号６８、１００、６２、９４、６５、９７、７３、及び１０５のうちのいずれか１つを含む。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６を含む。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３６からなる。いくつかのそのような方法では、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含む。

【０１８４】

いくつかのそのような方法では、方法は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを投与することを含む。いくつかのそのような方法では、ガイドＲＮＡは、少なくとも１つの修飾を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも１つの修飾は、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも１つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも１つの修飾は、ガイドＲＮＡの５’末端の最初の５つのヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも１つの修飾は、ガイドＲＮＡの３’末端の最後の５つのヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも１つの修飾は、ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも１つの修飾は、ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも１つの修飾は、ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも１つの修飾は、ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつ

かのそのような方法では、少なくとも１つの修飾は、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含む。いくつかのそのような方法では、ガイドＲＮＡは、単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。いくつかのそのような方法では、方法は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを投与することを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含む。

【０１８５】

いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質である。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、又はＮｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質は、配列番号１１に示される配列を含む。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化される。いくつかのそのような方法では、方法は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、少なくとも１つの修飾を含む。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、１つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている。いくつかのそのような方法では、修飾ウリジンは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンである。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されている。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、１つ以上又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むように修飾されている。いくつかのそのような方法では、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されている。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’キャップを含む。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される配列を含む。いくつかのそのような方法では、方法は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような方法では、方法は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡ

は、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。

【０１８６】

いくつかのそのような方法では、方法は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを投与することを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、方法は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される配列を含む。いくつかのそのような方法では、方法は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを投与することを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、方法は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような方法では、方法は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを投与することを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、方法は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、双方向性構築物であり、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、双方向性構築物は、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、双方向性構築物であり、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、双方向性構築物は、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配

列の逆相補体を更に含み、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１８７】

いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及びガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡは、脂質ナノ粒子と会合している。いくつかのかかる方法では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質を含む。いくつかのそのような方法では、カチオン性脂質は、脂質Ａ（（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアート）である。いくつかのそのような方法では、中性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン又は１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine、ＤＳＰＣ）である。いくつかのそのような方法では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかのそのような方法では、ステルス脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである。いくつかのそのような方法では、カチオン性脂質は脂質Ａであり、中性脂質はＤＳＰＣであり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、ステルス脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである。いくつかのそのような方法では、脂質ナノ粒子は、以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで４つの脂質を含む。

【０１８８】

いくつかのそのような方法では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、方法は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを投与することを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００を含み、方法は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される配列を含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような方法では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、方法は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを投与することを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、方法は、Ｃａｓタンパク質をコード

する核酸を投与することを含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジン又はＮ１－メチル－シュードウリジン、任意選択的にＮ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような方法では、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子であり、方法は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを投与することを含み、ガイドＲＮＡは、配列番号１００を含み、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合と、（ｉｉｉ）ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、（ｉｖ）ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドと、を含み、方法は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号２２６、２２５、又は１２に示される配列を含み、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されており、５’キャップを含み、ポリ（Ａ）テールを含み、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、脂質Ａ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質ナノ粒子と、任意選択的に以下のモル比：約５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、約９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、約３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び約３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで会合している。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、双方向性構築物であり、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、双方向性構築物は、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配

列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、双方向性構築物であり、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列であり、双方向性構築物は、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む一方向性構築物であり、核酸構築物は、５’から３’に、スプライスアクセプター、第ＩＸ因子タンパク質コード配列、及びポリアデニル化シグナルを含み、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９又は配列番号１６６を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まず、核酸構築物は、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクター内にあり、任意選択的に、核酸構築物は、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接しており、任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなるか、又は任意選択的に、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなり、任意選択的に、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような方法では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。

【０１８９】

いくつかのそのような方法では、方法は、対象に組成物を投与する前に、対象における既存のＡＡＶ免疫力を評価することを更に含む。いくつかのそのような方法では、既存のＡＡＶ免疫力は、既存のＡＡＶ８免疫力である。いくつかのそのような方法では、既存のＡＡＶ免疫力を評価することは、全抗体免疫アッセイ又は中和抗体アッセイを使用して免疫原性を評価することを含む。

【０１９０】

別の態様では、上記方法のいずれかによって作製された新生児細胞又は新生児細胞の集団が提供される。別の態様では、標的ゲノム遺伝子座に挿入された第ＩＸ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物を含む、新生児細胞又は新生児細胞の集団が提供される。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、新生児細胞は、肝臓細胞であ

るか、又は新生児細胞の集団は、肝臓細胞の集団である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、新生児細胞は、肝細胞であるか、又は新生児細胞の集団は、肝細胞の集団である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、新生児細胞は、ヒト細胞であるか、又は新生児細胞の集団は、ヒト細胞の集団である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後２４週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後１２週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後８週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、新生児細胞又は新生児細胞の集団は、出生後４週間以内のヒト新生児対象からのものである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、新生児細胞は、インビトロ若しくはエクスビボであるか、又は新生児細胞の集団は、インビトロ若しくはエクスビボである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、新生児細胞は、対象におけるインビボであるか、又は新生児細胞の集団は、インビボである。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質が発現される。

【０１９１】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質は、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、（Ｉ）配列番号１６６、１６５、１６４、及び１６７～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％同一であり、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は（ＩＩ）配列番号１５９、１６０、及び１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、若しくは（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、（Ｉ）配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、（ＩＩ）配列番号１６５に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は（ＩＩＩ）配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、（Ｉ）配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではないか、又は（ＩＩ）配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質は、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそ

のような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質は、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６、１６５、又は１５９を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６、１６５、又は１５９からなる。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６又は１５９を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６又は１５９からなる。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６からなる。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９からなる。

【０１９２】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列の上流にスプライスアクセプターを含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列の下流にポリアデニル化シグナルを含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列の上流にスプライスアクセプターを含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質コード配列の下流にポリアデニル化シグナルを含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、標的ゲノム遺伝子座において内因性プロモーターに作動可能に連結されている。

【０１９３】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、核酸構築物は、双方向性構築物であり、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、核酸構築物は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、異なっているが、同じ第ＩＸ因子タンパク質配列をコードし、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質は、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、又は（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９５％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９５％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配

列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、（ｉ）ＣｐＧが枯渇しているか、（ｉｉ）１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されているか、又は（ｉｉｉ）ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、（ｉｉ）第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％同一であり、ＣｐＧが枯渇しており、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列を変異させるように修飾されており、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質が、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇しており、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質は、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではなく、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％同一である第ＩＸ因子タンパク質をコードし、任意選択的に、第ＩＸ因子タンパク質は、機能亢進性第ＩＸ因子バリアントではない。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードし、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１９５を含む第ＩＸ因子タンパク質をコードする。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９からなり、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６からなる。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６からなり、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９からなる。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含む。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列及び第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、異なっているが、同じ第ＩＸ因子タンパク質配列をコードし、第１のポリアデニル化シグナル及び第２のポリアデニル化シグナルは、異なっている。

【０１９４】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、核酸構築物は、双方向性構築物であり、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード

配列であり、双方向性構築物は、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体を更に含み、核酸構築物は、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列、第１のポリアデニル化シグナル、第２のポリアデニル化シグナルの逆相補体、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含み、（ｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含むか、又は（ｉｉ）第１の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１６６を含み、第２の第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、配列番号１５９を含み、核酸構築物は、第ＩＸ因子タンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、第ＩＸ因子タンパク質コード配列は、標的ゲノム遺伝子座において内因性プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、核酸構築物は、配列番号２１０、若しくは１８０、又はそれらの逆相補体を含む。

【０１９５】

いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、標的ゲノム遺伝子座は、アルブミン遺伝子であり、任意選択的に、アルブミン遺伝子は、ヒトアルブミン遺伝子である。いくつかのそのような新生児細胞又は新生児細胞の集団では、ヌクレアーゼ標的部位は、アルブミン遺伝子のイントロン１内にある。

【図面の簡単な説明】

【０１９６】

【図１】凝固カスケードの概略図を示す。

【０１９７】

【図２】アルブミン（albumin、ＡＬＢ）遺伝子座における双方向性ＡＡＶ挿入鋳型のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９媒介挿入についての概略図を示す。ヒトＡＬＢ遺伝子座を示しており、Ｃａｓ９切断部位をハサミで示している。Ｆ９　ＤＮＡ挿入鋳型における第９因子（Ｆ９）導入遺伝子に隣接するスプライスアクセプター部位を示す。各Ｆ９導入遺伝子の後に転写を終結させるためのポリアデニル化配列を示す。内因性ＡＬＢプロモーターによって駆動される挿入及び転写に続いて、ＡＬＢエキソン１と挿入されたＦ９　ＤＮＡ鋳型との間にスプライシングが起こり、破線で図示されるように、ハイブリッドＡＬＢ－Ｆ９ｍＲＮＡが生成される。ＡＬＢシグナルペプチド（signal peptide、ｓｐ；エキソン１にコードされ、括弧内に図示されている）は、第ＩＸ因子（ＦＩＸ）の分泌を促進し、タンパク質成熟中にＦＩＸプロペプチドとともに除去されて、血漿中に成熟野生型ＦＩＸを生じる。

【０１９８】

【図３】Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びヒトＡＬＢイントロン１を標的とするｓｇＲＮＡ　９８６０を含有する脂質ナノ粒子である開発候補ＬＮＰＦ９、並びにインサート３０によってコードされる双方向性Ｆ９挿入鋳型とともにパッケージされた組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）キャプシドであるＲＥＧＶ１３１を示す。

【０１９９】

【図４】インサート３０によってコードされる双方向性Ｆ９挿入鋳型についての概略図を示す。

【０２００】

【図５】ＰＨＨにおけるインビトロでのＦＩＸ発現を示す。ＰＨＨを９６ウェルプレートに播種し、次いで、ｒＡＡＶ８にパッケージされた一定の６．０Ｅ＋４ｖｇ／細胞の示された挿入鋳型（インサート７２、インサート２９、又はインサート３０）で処理した。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡと、ＡＬＢイントロン１を標的とする４つのｓｇＲＮＡのうちの１つ（ｇ９８６０、ｇ９８５７、ｇ９８７４、及びｇ９８４４）とを含むＬＮＰを、３倍連続希釈系列にわたって１０００ｎｇ／ｍＬ～４．１ｎｇ／ＭＬの範囲の濃度で複製ウェルに添加した。細胞を３７℃でインキュベートし、３日目及び５日目に培地を交換し、８日目にｈＦＩＸ　ＥＬＩＳＡを介してｈＦＩＸ発現を測定した。

【０２０１】

【図６】ＰＣＨにおけるインビトロでのＦＩＸ発現を示す。ＰＣＨを９６ウェルプレートに播種し、次いで、ｒＡＡＶ８にパッケージされた一定の６．０Ｅ＋４ｖｇ／細胞の示された挿入鋳型（インサート７２、インサート２９、又はインサート３０）で処理した。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡと、ＡＬＢイントロン１を標的とする４つのｓｇＲＮＡのうちの１つ（ｇ９８６０、ｇ９８５７、ｇ９８７４、及びｇ９８４４）とを含むＬＮＰを、３倍連続希釈系列にわたって１０００ｎｇ／ｍＬ～４．１ｎｇ／ｍＬの範囲の濃度で複製ウェルに添加した。細胞を３７℃でインキュベートし、３日目及び５日目に培地を交換し、８日目にｈＦＩＸ　ＥＬＩＳＡを介してｈＦＩＸ発現を測定した。

【０２０２】

【図７】ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１で治療したＡＬＢ$^{hu/hu/F9-/-}$マウスからの血漿中のｈＦＩＸの測定された発現を示す。血漿を特定の時点でマウスから単離し、Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｅｖｉｃｅ（ＭＳＤ）プラットフォーム上でｈＦＩＸに特異的な検出抗体（ＡＨＩＸ－５０４１、Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してｈＦＩＸレベルについて定量した。

【０２０３】

【図８Ａ】ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１で治療したＡＬＢ$^{hu/hu/F9-/-}$マウスからの血漿中の相対的ｈＦＩＸ活性を示す。活性は、ＦＩＸ活性を特異的に測定する発色アッセイに基づいた。

【０２０４】

【図８Ｂ】ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１で治療したＡＬＢ$^{hu/hu/F9-/-}$マウスからの血漿中の相対的ｈＦＩＸ活性に対するｈＦＩＸ発現の相関を示す。

【０２０５】

【図９】ＣｐＧが枯渇していないＦ９挿入鋳型（インサート７２）及びＣｐＧが枯渇しているＦ９挿入鋳型（インサート２７、インサート２８、インサート２９、及びインサート３０）についての初代ヒト形質細胞様ＤＣベースアッセイにおけるＩＦＮ－Ｉ応答を示す。

【０２０６】

【図１０Ａ】ＬＮＰＦ９（ｇ９８６０）及び／又はＲＥＧＶ１３１（インサート３０）若しくはＲＥＧＶ０１３（インサート７２）で治療したカニクイザルサルからの血漿中のｈＦＩＸの測定された発現を示す。血漿を特定の時点でサルから単離し、Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｅｖｉｃｅ（ＭＳＤ）プラットフォーム上でｈＦＩＸに特異的な検出抗体（ＡＨＩＸ－５０４１、Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してｈＦＩＸレベルについて定量した。

【０２０７】

【図１０Ｂ】ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１若しくはＲＥＧＶ０１３で治療したサルからの血漿中のｈＦＩＸ活性に対する評価したｈＦＩＸレベルの相関を示す。ヒトＦＩＸ（ｈｕｍａｎ　ＦＩＸ、ｈＦＩＸ）タンパク質を、ｈＦＩＸに特異的な抗体（ＡＨＩＸ－５０４１、Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いるプルダウン技術を使用してサル血漿から単離し、ｈＦＩＸ機能的活性を発色ＦＩＸ活性アッセイ（ＢｉｏＰｈｅｎ　ＦＩＸ、Ｈｙｐｅｎ　ＢｉｏＭｅｄ）を用いて決定した。

【０２０８】

【図１０Ｃ】６ヶ月の時間経過にわたる、ＬＮＰＦ９（ｇ９８６０）及び／又はＲＥＧＶ１３１（インサート３０）で治療したカニクイザルサルからの血漿中のｈＦＩＸの測定された発現を示す。血漿を特定の時点でサルから単離し、ｈＦＩＸレベルをＭｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｅｖｉｃｅ（ＭＳＤ）プラットフォーム上でｈＦＩＸに特異的な検出抗体（ＡＨＩＸ－５０４１、Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して定量した。

【０２０９】

【図１１】成体マウス及び新生児マウスにおいて試験した異なるヒト第ＩＸ因子（ｈＦＩＸ）挿入鋳型を説明する概略図を示す。

【０２１０】
【図１２Ａ】エピソームｈＦＩＸ（エピソーム）、ＬＮＰ－ｇ６６６＋ｈＦＩＸ－ＨＤＲ－５００鋳型（ＨＤＲ５００）、ＬＮＰ－ｇ６６６＋ｈＦＩＸ－ＨＤＲ－８００鋳型（ＨＤＲ８００）、及びＬＮＰ－ｇ６６６＋ｈＦＩＸ－ＮＨＥＪ鋳型（ＮＨＥＪ）の投与後の異なる時点での新生児マウス（群当たりｎ＝４～１０、雄及び雌）及び成体マウス（群当たりｎ＝５、雌）におけるｈＦＩＸ血漿レベルを示す。新生児マウスにおける投与はＰ０又はＰ１に行った。陰性対照として、生理食塩水を注射したマウスを使用した。データを対数スケールで示す。
【図１２Ｂ】エピソームｈＦＩＸ（エピソーム）、ＬＮＰ－ｇ６６６＋ｈＦＩＸ－ＨＤＲ－５００鋳型（ＨＤＲ５００）、ＬＮＰ－ｇ６６６＋ｈＦＩＸ－ＨＤＲ－８００鋳型（ＨＤＲ８００）、及びＬＮＰ－ｇ６６６＋ｈＦＩＸ－ＮＨＥＪ鋳型（ＮＨＥＪ）の投与後の異なる時点での新生児マウス（群当たりｎ＝４～１０、雄及び雌）におけるｈＦＩＸ血漿レベルを示す。新生児マウスにおける投与はＰ０又はＰ１に行った。陰性対照として、生理食塩水を注射したマウスを使用した。データを線形スケールで示す。
【０２１１】
【図１３Ａ】１４５ｂｐ　ＩＴＲ、１４１ｂｐ　ＩＴＲ、及び１３０ｂｐ　ＩＴＲプラスミドを使用して生成された組換えＡＡＶ８　ｈＦＩＸウイルスが、初代ヒト肝細胞において同様に機能することを示す。ｈＦＩＸ発現を、７日目にＥＬＩＳＡによって測定した。
【図１３Ｂ】１４５ｂｐ　ＩＴＲ、１４１ｂｐ　ＩＴＲ、及び１３０ｂｐ　ＩＴＲプラスミドを使用して生成された組換えＡＡＶ８　ｈＦＩＸウイルスが、初代ヒト肝細胞において同様に機能することを示す。ｈＦＩＸ発現を、７日目にＥＬＩＳＡによって測定した。
【０２１２】
【図１４Ａ】ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１で治療したＡＬＢ^{hu}／^{hu}／Ｆ９$^{－}$／$^{－}$マウスからの血漿中のｈＦＩＸの測定された発現を示す。血漿を特定の時点でマウスから単離し、ｈＦＩＸレベルをＭｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｅｖｉｃｅ（ＭＳＤ）プラットフォーム上でｈＦＩＸに特異的な検出抗体（ＡＨＩＸ－５０４１、Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して定量した。示された値は平均＋ＳＥＭである。
【０２１３】
【図１４Ｂ】治療後６週目における、ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１で治療したＡＬＢ^{hu}／^{hu}／Ｆ９$^{－}$／$^{－}$マウスからの血漿中のｈＦＩＸの測定された発現を示す。
【０２１４】
【図１４Ｃ】治療後の種々の時点の、ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１の異なる用量の組み合わせで治療したＡＬＢ^{hu}／^{hu}／Ｆ９$^{－}$／$^{－}$マウスからの血漿中のｈＦＩＸの測定された発現を示す。
【０２１５】
【図１５Ａ】ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１で治療したＡＬＢ^{hu}／^{hu}／Ｆ９$^{－}$／$^{－}$マウスからの血漿中の相対的ｈＦＩＸ活性を示す。血漿を特定の時点でマウスから単離した。活性は、ＦＩＸ活性を特異的に測定する発色アッセイに基づいた。
【０２１６】
【図１５Ｂ】治療後６週目における、ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１で治療したＡＬＢ^{hu}／^{hu}／Ｆ９$^{－}$／$^{－}$マウスからの血漿中の相対的ｈＦＩＸ活性を示す。
【０２１７】
【図１５Ｃ】ＬＮＰＦ９及びＲＥＧＶ１３１で治療したＡＬＢ^{hu}／^{hu}／Ｆ９$^{－}$／$^{－}$マウスからの血漿中の相対的ｈＦＩＸ活性に対するｈＦＩＸ発現の相関を示す。データは、活性に対するレベルの相関として個々の動物についてプロットされる。
【０２１８】
【図１６】治療後４週目における、ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１で治療したＡＬＢ^{hu}／^{hu}／Ｆ９$^{－}$／$^{－}$マウスにおける尾切断後の出血時間を示す。示された値は平均＋ＳＥＭである。

【０２１９】
【図１７】治療後６週目における、ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１で治療したＡＬＢ$^{hu/hu}$／Ｆ９$^{-/-}$マウスからの希釈していない血漿中の活性化部分トロンボプラスチン時間（activated partial thromboplastin time、ａＰＴＴ）を示す。示された値は平均＋ＳＥＭである。
【０２２０】
【図１８】ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１で治療したＡＬＢ$^{hu/hu}$／Ｆ９$^{-/-}$マウスからのマウス生成ヒトＦＩＸが、一段階凝血／ａＰＴＴアッセイにおいて精製ヒトＦＩＸと同様の特異的活性を示すことを示す。
【０２２１】
【図１９】ＬＮＰＦ９及び／又はＲＥＧＶ１３１で治療したＡＬＢ$^{hu/hu}$／Ｆ９$^{-/-}$マウスからのマウス生成ヒトＦＩＸが、二段階発色基質（chromogenic substrate、ＣＳ）アッセイにおいて精製ヒトＦＩＸと同様の特異的活性を示すことを示す。
【発明を実施するための形態】
【０２２２】
定義
本明細書で互換的に使用される、「タンパク質」、「ポリペプチド」、及び「ペプチド」という用語は、コードされたアミノ酸及び非コードのアミノ酸並びに化学的又は生化学的に修飾又は誘導体化されたアミノ酸を含む、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を含む。これらの用語には、修飾されているペプチド骨格を有するポリペプチドなどの修飾されているポリマーも含まれる。「ドメイン」という用語は、特定の機能又は構造を有するタンパク質又はポリペプチドの任意の部分を指す。
【０２２３】
タンパク質は、「Ｎ末端」及び「Ｃ末端」を有すると言われている。「Ｎ末端」という用語は、遊離アミン基（－ＮＨ２）を有するアミノ酸を末端に有する、タンパク質又はポリペプチドの開始部に関する。「Ｃ末端」という用語は、遊離カルボキシル基（－ＣＯＯＨ）によって終端されたアミノ酸鎖（タンパク質又はポリペプチド）の末端に関する。
【０２２４】
本明細書で互換的に使用される、「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、又はそれらの類似体若しくは修飾バージョンを含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を含む。これらには、一本鎖、二本鎖、及び多重鎖ＤＮＡ又はＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド、並びにプリン塩基、ピリミジン塩基、又は他の天然、化学的に修飾された、生化学的に修飾された、非天然、若しくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれる。
【０２２５】
１つのモノヌクレオチドペントース環の５’リン酸がホスホジエステル結合を介して一方向で、その隣の３’酸素に結合する手法でオリゴヌクレオチドを作製するように、モノヌクレオチドが反応するため、核酸は、「５’末端」及び「３’末端」を有すると言われている。オリゴヌクレオチドの末端は、その５’リン酸がモノヌクレオチドペントース環の３’酸素に連結されていない場合、「５’末端」と称される。オリゴヌクレオチドの末端は、その３’酸素が別のモノヌクレオチドペントース環の５’リン酸に連結されていない場合、「３’末端」と称される。核酸配列は、より大きなオリゴヌクレオチドの内部に存在するとしても、５’及び３’末端を有するとも言われ得る。直線状又は環状ＤＮＡ分子のいずれかにおいて、別個の要素は、「上流」又は「下流」の５’若しくは３’要素であると称される。
【０２２６】
「ゲノムに組み込まれた」という用語は、ヌクレオチド配列が細胞のゲノムに組み込まれるように、細胞に導入されている核酸を指す。細胞のゲノムへの核酸の安定した組み込みのために、任意のプロトコルが使用され得る。

【０２２７】
「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも１つの要素を含み、かつウイルスベクター粒子へのパッケージングに十分な、又はそれを許容する要素を含む、組換え核酸を指す。ベクター及び／又は粒子は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又は他の核酸を、インビトロ、エクスビボ、又はインビボで細胞に移入する目的で利用することができる。ウイルスベクターの多くの形態が知られている。
【０２２８】
細胞、組織（例えば、肝臓サンプル）、タンパク質、及び核酸に関して「単離された」という用語は、通常インサイチュで存在し得る他の細菌、ウイルス、細胞、又は他の成分に関して比較的精製されている細胞、組織（例えば、肝臓サンプル）、タンパク質、及び核酸、細胞、組織（例えば、肝臓サンプル）、タンパク質、及び核酸の実質的に純粋な調製物までを含み、並びにそれらの実質的に純粋な調製物を含む。「単離された」という用語はまた、天然に存在する対応物を有せず、化学的に合成され、それにより他の細胞、組織（例えば、肝臓サンプル）、タンパク質、及び核酸が実質的に混入していないか、又はそれらに天然に付随する（例えば、他の細胞タンパク質、ポリヌクレオチド、若しくは他の成分）ほとんどの他の成分（例えば、細胞成分）から分離若しくは精製されているタンパク質及び核酸も含む。
【０２２９】
「野生型」という用語は、（変異体、病変した、改変したなどとは対照的に）正常な状態又は文脈に見出されるような構造及び／又は活性を有する実体を含む。野生型遺伝子及びポリペプチドは、多くの場合、複数の異なる形態（例えば、対立遺伝子）で存在する。
【０２３０】
「内因性配列」という用語は、細胞又は動物内で天然に存在する核酸配列を指す。例えば、ヒトの内因性ＡＬＢ配列は、ヒトにおけるＡＬＢ遺伝子座で天然に存在する天然のＡＬＢ配列を指す。
【０２３１】
「外因性」分子又は配列には、その形態で細胞に通常は存在しない分子又は配列が含まれる。通常の存在には、細胞の特定の発生段階及び環境条件に関する存在が含まれる。外因性分子又は配列には、例えば、内因性配列のヒト化バージョンなどの、細胞内の対応する内因性配列の変異バージョンが含まれ得るか、又は細胞内であるが、異なる形態の（すなわち、染色体内ではない）内因性配列に対応する配列が含まれ得る。対照的に、内因性分子又は配列は、その形態で、特定の細胞において、特定の発生段階で、特定の環境条件下で通常存在する分子又は配列を含む。
【０２３２】
核酸又はタンパク質の文脈で使用される場合の「異種」という用語は、核酸又はタンパク質が、同じ分子内で一緒に天然に存在しない少なくとも２つのセグメントを含むことを示す。例えば、核酸のセグメント又はタンパク質のセグメントに関して使用される場合の「異種」という用語は、核酸又はタンパク質が、自然界で互いに同じ関係（例えば、一緒に結合）で見出されない２つ以上のサブ配列を含むことを示す。一例として、核酸ベクターの「異種」領域は、自然界で他の分子と関連して見出されない、別の核酸分子内の、又は別の核酸分子に結合した核酸のセグメントである。例えば、核酸ベクターの異種領域は、自然界のコード配列に関連して見出されない配列に隣接するコード配列を含み得る。同様に、タンパク質の「異種」領域は、自然界の他のペプチド分子（例えば、融合タンパク質、又はタグ付きタンパク質）に関連して見出されない、別のペプチド分子内にあるか、又はそれに結合しているアミノ酸のセグメントである。同様に、核酸又はタンパク質は、異種標識又は異種分泌又は局在化配列を含み得る。
【０２３３】
「コドン最適化」（すなわち、「コドン最適化された」配列）は、アミノ酸を指定する３塩基対のコドンの組み合わせの多様性によって示されるように、コドンの縮重を利用し、一般に、天然アミノ酸配列を維持しながら、天然配列の少なくとも１つのコドンを、宿

主細胞の遺伝子においてより頻繁に又は最も頻繁に使用されるコドンで置き換えることによって、特定の宿主細胞における発現の増強のために核酸配列を修飾するプロセスを含む。例えば、第ＩＸ因子タンパク質をコードする核酸は、天然に存在する核酸配列と比較して、細菌細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、又は他の任意の宿主細胞を含む、所与の原核細胞又は真核細胞においてより高い頻度で使用される代替コドンへと修飾することができる。コドン使用表は、例えば、「コドン使用データベース（Ｃｏｄｏｎ　Ｕｓａｇｅ　Ｄａｔａｂａｓｅ）」において容易に利用可能である。これらの表は、様々な方法で適用することができる。全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｎａｋａｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２８（１）：２９２を参照されたい。特定の宿主における発現のための特定の配列のコドン最適化のためのコンピュータアルゴリズム（例えば、Ｇｅｎｅ　Ｆｏｒｇｅを参照されたい）もまた利用可能である。

【０２３４】

「遺伝子座」という用語は、遺伝子（又は重要な配列）、ＤＮＡ配列、ポリペプチドコード配列、又は生物のゲノムの染色体上の位置（position）の特定の位置（location）を指す。例えば、「ＡＬＢ遺伝子座」は、ＡＬＢ遺伝子、ＡＬＢ　ＤＮＡ配列、アルブミンコード配列、又はそのような配列が常駐すると同定されている生物のゲノムの染色体上のＡＬＢ位置の特定の位置を指し得る。「ＡＬＢ遺伝子座」は、例えば、エンハンサー、プロモーター、５’及び／若しくは３’非翻訳領域（ｕｎｔｒａｎｓｌａｔｅｄ　ｒｅｇｉｏｎ、ＵＴＲ）、又はそれらの組み合わせを含む、ＡＬＢ遺伝子の調節エレメントを含み得る。

【０２３５】

「遺伝子」という用語は、自然に存在する場合、少なくとも１つのコード領域及び少なくとも１つの非コード領域を含有する可能性のある染色体中のＤＮＡ配列を指す。遺伝子が完全長のＲＮＡ（５’及び３’の非翻訳配列を含む）に対応するように、産物（例えば、非限定的に、ＲＮＡ産物及び／又はポリペプチド産物）をコードする染色体中のＤＮＡ配列は、非コードイントロンで中断されたコード領域並びに５’端及び３’端の両方のコード領域に隣接して位置する配列を含み得る。更に、調節配列を含む他の非コード配列（例えば、非限定的に、プロモーター、エンハンサー、及び転写因子結合部位）、ポリアデニル化シグナル、配列内リボソーム進入部位、サイレンサー、絶縁配列、及びマトリックス結合領域も遺伝子に存在してもよい。これらの配列は、遺伝子のコード領域に近接（例えば、非限定的に、１０ｋｂ以内）しているか、又は離れた部位にあってもよく、それらは遺伝子の転写及び翻訳のレベル又は速度に影響を及ぼす。

【０２３６】

「対立遺伝子」という用語は、遺伝子のバリアント形態を指す。いくつかの遺伝子は、染色体上の同じ位置、又は遺伝子座に位置する様々な異なる形態を有する。二倍体生物は、各遺伝子座に２つの対立遺伝子を有する。対立遺伝子の各対は、特定の遺伝子遺伝子座の遺伝子型を表す。遺伝子型は、特定の遺伝子座に２つの同一の対立遺伝子がある場合はホモ接合であり、２つの対立遺伝子が異なる場合はヘテロ接合であると記載される。

【０２３７】

「プロモーター」は、ＲＮＡポリメラーゼＩＩが特定のポリヌクレオチド配列のための適切な転写開始部位でＲＮＡ合成を開始することを指示することができるＴＡＴＡボックスを通常含むＤＮＡの調節領域である。プロモーターは、転写開始速度に影響を及ぼす他の領域を追加的に含み得る。本明細書に開示されるプロモーター配列は、作動可能に連結されたポリヌクレオチドの転写を調節する。プロモーターは、本明細書に開示される１つ以上の細胞型（例えば、マウス細胞、ラット細胞、多能性細胞、１細胞期胚、分化細胞、又はそれらの組み合わせ）において活性であり得る。プロモーターは、例えば、構成的に活性なプロモーター、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、時間的に制限されたプロモーター（例えば、発生的に調節されたプロモーター）、又は空間的に制限されたプロモーター（例えば、細胞特異的又は組織特異的プロモーター）であり得る。プロモータ

ーの例は、例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１３／１７６７７２号において見出すことができる。

【０２３８】

「作動可能な連結」又は「作動可能に連結される」とは、その両方の成分が正常に機能し、かつ成分のうちの少なくとも１つが他の成分のうちの少なくとも１つに及ぶ機能を媒介し得る可能性を許すような、２つ以上の成分（例えば、プロモーター及び別の配列要素）の並列を含む。例えば、プロモーターが、１つ以上の転写調節因子の存在又は不在に応じてコード配列の転写のレベルを制御する場合、プロモーターは、コード配列に作動可能に連結され得る。作動可能な連結は、そのような配列が互いに近接していること、又はトランスに作用する（例えば、調節配列が、コード配列の転写を制御するために離れて作用し得る）ことを含み得る。

【０２３９】

本明細書で提供される方法及び組成物は、様々な異なる成分を用いる。記載全体のいくつかの成分は、活性なバリアント及び断片を有し得る。「機能的」という用語は、生物学的活性又は機能を示すタンパク質又は核酸（又はその断片、若しくはバリアント）の生来の能力を指す。機能的断片又はバリアントの生物学的機能は、元の分子と比較して同じであるか、又は実際に変更され得る（例えば、それらの特異性又は選択性又は有効性に関して）が、分子の基本的な生物学的機能を保持する。

【０２４０】

「バリアント」という用語は、集団で最も一般的な配列とは異なるヌクレオチド配列（例えば、１ヌクレオチド）、又は集団で最も一般的な配列とは異なるタンパク質配列（例えば、１アミノ酸）を指す。

【０２４１】

「断片」という用語は、タンパク質に言及する場合、完全長タンパク質よりも短いか、又は少ないアミノ酸を有するタンパク質を意味する。「断片」という用語は、核酸に言及する場合、完全長核酸よりも短いか、又は少ないヌクレオチドを有する核酸を意味する。断片は、例えば、タンパク質断片に言及する場合、Ｎ末端断片（すなわち、タンパク質のＣ末端の一部の除去）、Ｃ末端断片（すなわち、タンパク質のＮ末端の一部の除去）、又は内部断片（すなわち、タンパク質のＮ末端及びＣ末端の各々の一部の除去）であり得る。断片は、例えば、核酸断片に言及する場合、５’断片（すなわち、核酸の３’末端の一部の除去）、３’断片（すなわち、核酸の５’末端の一部の除去）、又は内部断片（すなわち、核酸の５’末端及び３’末端の各々の一部の除去）であり得る。

【０２４２】

２つのポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」又は「同一性」は、特定の比較ウィンドウで最大の一致のためにアラインさせる場合、同じである２つの配列の残基を指す。タンパク質に関して、配列同一性のパーセンテージを使用する場合、同一ではない残基位置は多くの場合に、保存的アミノ酸置換によって異なり、その保存的アミノ酸置換では、アミノ酸残基は同様の化学的特性（例えば、電荷又は疎水性）を有する他のアミノ酸残基で置換されており、したがって、分子の機能的特性を変化させない。配列が保存的置換で異なる場合、配列同一性パーセントを、置換の保存的性質について補正するために、上方に調整され得る。そのような保存的置換によって異なる配列は、「配列類似性」又は「類似性」を有すると言われている。この調整を行うための手段は周知である。典型的には、これは、保存的置換を完全なミスマッチではなく部分的なミスマッチとしてスコアリングして、それによって、配列同一性パーセンテージを増加させることを含む。したがって、例えば、同一のアミノ酸が１のスコアを与えられ、非保存的置換が０のスコアを与えられる場合に、保存的置換は、０～１のスコアを与えられる。保存的置換のスコアリングは、例えば、プログラムＰＣ／ＧＥＮＥ（Ｉｎｔｅｌｌｉｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）で実行されるように計算される。

【０２４３】

「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウにわたって２つの最適にアラインされた配列（完全にマッチする残基の数が最大）を比較することによって決定される値を含み、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列の部分は、２つの配列の最適アラインメントのための（付加また欠失を含まない）参照配列と比較した場合に、付加又は欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。パーセンテージは、同一の核酸塩基又はアミノ酸残基が両方の配列中に発生する位置の数を決定してマッチする位置の数を得ること、マッチする位置の数を比較のウィンドウにおける位置の総数で割ること、及び結果に１００を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。特に明記しない限り（例えば、短い方の配列が、連結された非相同配列を含む）、比較ウィンドウは、比較される２つの配列のうちの短い方の全長である。

【０２４４】

特に指示しない限り、配列同一性／類似性の値は、以下のパラメータ：５０のＧＡＰ重量及び３の長さ重量、並びにｎｗｓｇａｐｄｎａ．ｃｍｐスコアリングマトリックスを使用するヌクレオチド配列についての同一性％及び類似性％；８のＧＡＰ重量及び２の長さ重量、並びにＢＬＯＳＵＭ６２スコアリングマトリックスを使用するアミノ酸配列についての同一性％及び類似性％；又はその任意の同等のプログラムを使用し、ＧＡＰバージョン１０を使用して得られた値を含む。「同等のプログラム」は、問題の任意の２つの配列について、ＧＡＰバージョン１０によって生成された対応するアラインメントと比較した場合、同一のヌクレオチド又はアミノ酸残基のマッチ及び同一の配列同一性パーセントを有するアラインメントを生成する任意の配列比較プログラムを含む。

【０２４５】

「保存的アミノ酸置換」という用語は、配列中に通常存在するアミノ酸の、類似のサイズ、電荷、又は極性の、異なるアミノ酸との置換を指す。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、又はロイシンなどの非極性（疎水性）残基の、別の非極性残基との置換が含まれる。同様に、保存的置換の例には、アルギニンとリジンとの間、グルタミンとアスパラギンとの間、又はグリシンとセリンとの間などの、１つの極性（親水性）残基の別のものとの置換が含まれる。追加的に、リジン、アルギニン、若しくはヒスチジンなどの塩基性残基の別のものへの置換、又はアスパラギン酸若しくはグルタミン酸などのある酸性残基の別の酸性残基への置換は、保存的置換の追加の例である。非保存的置換の例には、非極性（疎水性）アミノ酸残基、例えば、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、若しくはメチオニンの極性（親水性）残基、例えば、システイン、グルタミン、グルタミン酸、若しくはリジンへの置換、及び／又は極性残基の非極性残基への置換が含まれる。典型的なアミノ酸の分類を以下で要約する。

【０２４６】

【表１】

表１．アミノ酸の分類。

アラニン	Ala	A	非極性	中性	１．８
アルギニン	Arg	R	極性	陽性	－４．５
アスパラギン	Asn	N	極性	中性	－３．５
アスパラギン酸	Asp	D	極性	陰性	－３．５
システイン	Cys	C	非極性	中性	２．５
グルタミン酸	Glu	E	極性	陰性	－３．５
グルタミン	Gln	Q	極性	中性	－３．５
グリシン	Gly	G	非極性	中性	－０．４
ヒスチジン	His	H	極性	陽性	－３．２
イソロイシン	Ile	I	非極性	中性	４．５
ロイシン	Leu	L	非極性	中性	３．８
リジン	Lys	K	極性	陽性	－３．９
メチオニン	Met	M	非極性	中性	１．９
フェニルアラニン	Phe	F	非極性	中性	２．８
プロリン	Pro	P	非極性	中性	－１．６
セリン	Ser	S	極性	中性	－０．８
スレオニン	Thr	T	極性	中性	－０．７
トリプトファン	Trp	W	非極性	中性	－０．９
チロシン	Tyr	Y	極性	中性	－１．３
バリン	Val	V	非極性	中性	４．２

【０２４７】

「相同」配列（例えば、核酸配列）には、例えば、既知の参照配列に対して少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは１００％同一であるような、既知の参照配列に対して同一か、又は実質的に同様である配列が含まれる。相同配列は、例えば、オルソログ配列及びパラロガス配列を含み得る。例えば、相同遺伝子は典型的には、種分化事象（オルソログ遺伝子）又は遺伝子重複事象（パラロガス遺伝子）のいずれかを介して、共通の祖先ＤＮＡ配列から派生する。「オルソログ」遺伝子には、種分化によって共通の祖先遺伝子から進化した様々な種における遺伝子が含まれる。オルソログは典型的には、進化の過程で同じ機能を保持する。「パラロガス」遺伝子には、ゲノム内の重複によって関連する遺伝子が含まれる。パラログは、進化の過程で新しい機能を進化させることができる。

【０２４８】

「インビトロ」という用語は、人工環境、及び人工環境（例えば、試験管又は単離された細胞若しくは細胞株）内で生じるプロセス又は反応を含む。「インビボ」という用語は、天然環境（例えば、細胞又は生物又は身体）、及び天然環境内で生じるプロセス又は反応を含む。「エクスビボ」という用語は、個体の身体から除去される細胞、及びそのような細胞内で生じるプロセス又は反応を含む。

【０２４９】

本明細書で使用される場合、ヒトの文脈における「新生児」という用語は、１歳（５２週齢）以下、好ましくは２４週齢以下、より好ましくは１２週齢以下、より好ましくは８週齢以下、及び更により好ましくは４週齢以下のヒト対象を包含する。ある特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大４週齢である。ある特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大８週齢である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後３週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後２週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後１週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後７日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後６日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後５日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後４日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後３日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後２日以内である。別の実施

形態では、新生児ヒト対象は、出生後１日以内である。上に開示される時間窓は、ヒト対象のためのものであり、他の動物のための対応する発生時間窓を包含することも意図される。本明細書で使用される場合、「新生児細胞」は、新生児対象の細胞であり、新生児細胞の集団は、新生児対象の細胞の集団である。

【０２５０】

本明細書で使用される場合、対照サンプル又は対照対象におけるような「対照」は、測定、例えば、疾患の徴候又は症状の診断測定のための比較物である。ある特定の実施形態では、対照は、より早い時点、例えば、治療介入前の同じ対象からの対象サンプルであり得る。ある特定の実施形態では、対照は、正常な対照、例えば、対象サンプル中のＦＩＸ濃度又は活性を提供するための、正常な対象、すなわち、治療された対象の疾患を有しない対象からの測定であり得る。ある特定の実施形態では、正常対照は、集団対照、すなわち、一般集団における対象の平均であり得る。ある特定の実施形態では、対照は、同じ疾患を有する未治療の対象であり得る。ある特定の実施形態では、対照は、異なる療法、例えば、標準治療で治療された対象であり得る。ある特定の実施形態では、対照は、比較される対象の疾患を有する対象の自然史研究からの対象又は対象の集団であり得る。ある特定の実施形態では、対照は、ある特定の因子、例えば、年齢、性別について、試験される対象に適合される。ある特定の実施形態では、対照は、特定の検査室、例えば、臨床検査室についての対照レベルであり得る。適切な対照の選択は、当業者の能力の範囲内である。

【０２５１】

１つ以上の列挙された要素を「含む（comprising）」又は「含む（including）」組成物又は方法は、具体的に列挙されていない他の要素を含み得る。例えば、タンパク質を「含む（comprises）」又は「含む（includes）」組成物は、タンパク質を単独で、又は他の成分との組み合わせで含有し得る。「から本質的になる」という移行句は、特許請求の範囲の範囲が、特許請求の範囲に列挙された特定の要素、及び特許請求される発明の基本的かつ新規の特性に実質的に影響しない要素を包含すると解釈されることを意味する。したがって、本発明の特許請求の範囲で使用される場合の「から本質的になる」という用語は、「含む」と同等であると解釈されることを意図するものではない。

【０２５２】

「任意選択的な」又は「任意選択的に」は、それに続いて記載された事象又は状況が起こっても起こらなくてもよいことであり、説明が、事象又は状況が起こる場合の例及びそれが起こらない場合の例を含むことを意味する。

【０２５３】

値の範囲の指定は、その範囲内の、又はその範囲を定義する全ての整数、及びその範囲内の整数によって定義される全ての部分範囲を含む。例えば、５～１０ヌクレオチドは、５、６、７、８、９、又は１０ヌクレオチドとして理解され、一方、５～１０％は、５％及び１０％までの全ての可能な値を含むと理解される。

【０２５４】

２０ヌクレオチド配列のうちの少なくとも１７ヌクレオチドは、提供される配列の１７、１８、１９、又は２０ヌクレオチドを含むと理解され、それによって、明確に理解されるように、１つが具体的に提供されない場合であっても上限を提供する。同様に、最大３ヌクレオチドは、０、１、２、又は３ヌクレオチドを包含すると理解され、１つが具体的に提供されない場合であっても下限を提供する。「少なくとも」、「最大」、又は他の同様の言語が数を修飾する場合、それは、一連の各数を修飾すると理解することができる。

【０２５５】

本明細書で使用される場合、「以下」又は「未満」は、句に隣接する値、及び文脈から論理的に０までの論理的なより低い値又は整数として理解される。例えば、「２以下のヌクレオチド塩基対」の二重鎖領域は、２、１、又は０ヌクレオチド塩基対を有する。一連の数又は範囲の前に「以下」又は「未満」が存在する場合、その一連又は範囲内の数の各々が修飾されていることが理解される。

【０２５６】
本明細書で使用される場合、値の最大量が１００％（例えば、１００％阻害又は１００％カプセル化）で表される場合、その値は検出方法によって制限されることが理解される。例えば、１００％阻害は、アッセイの検出レベル未満のレベルへの阻害として理解され、１００％カプセル化は、カプセル化のために意図される物質が小胞の外側に検出され得ないとして理解される。
【０２５７】
文脈から特に明らかでない限り、「約」という用語は、記載された値の±５％である値を包含する。ある特定の実施形態では、「約」という用語は、当該技術分野内で許容される変動若しくは誤差、例えば、平均からの２標準偏差、又は測定を行うために使用される方法の感度、又は当該技術分野において許容される値のパーセント、例えば、年齢を伴うものを包含すると理解される。一連の最初の値の前に「約」が存在する場合、一連の各値を修飾すると理解することができる。
【０２５８】
「及び／又は」という用語は、関連するリストされる項目のうちの１つ以上の任意及び全ての可能な組み合わせ、並びに代替物（「又は」）で解釈されるときの組み合わせの欠如を指し、これらを包含する。
【０２５９】
「又は」という用語は、特定のリストの任意の１つのメンバーを指し、そのリストのメンバーの任意の組み合わせも含む。
【０２６０】
冠詞「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」の単数形は、文脈が特に明確に規定していない限り、複数形の言及を含む。例えば、「タンパク質」又は「少なくとも１つのタンパク質」という用語は、それらの混合物を含む複数のタンパク質を含み得る。
【０２６１】
統計的に有意なとは、ｐ≦０．０５を意味する。
【０２６２】
本出願中の配列と、示されたアクセッション番号又はアクセッション番号中の位置との間に矛盾がある場合、本出願中の配列が優勢である。
（発明を実施するための形態）
【０２６３】
Ｉ．概要
内因性アルブミン（ＡＬＢ）遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座への第ＩＸ因子（ＦＩＸ）コード配列の挿入及び／又はＦＩＸコード配列の発現を可能にする核酸構築物及び組成物が本明細書で提供される。核酸構築物及び組成物は、第９因子（Ｆ９）核酸を細胞に導入する方法、Ｆ９核酸を標的ゲノム遺伝子座に組み込む方法、細胞におけるＦＩＸの発現方法、及び対象における血友病Ｂ又はＦＩＸ欠乏症を治療する方法において使用することができる。場合によっては、細胞又は対象は、本明細書で定義される新生児細胞又は新生児対象であり得る。他の場合、細胞は、新生児細胞ではなく、対象は、新生児対象ではない。ヌクレアーゼ剤（例えば、内因性ＡＬＢ遺伝子座を標的とする）又はヌクレアーゼ剤をコードする核酸も提供され、内因性ＡＬＢ遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座への核酸構築物の組み込みを容易にする。
【０２６４】
より具体的には、いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９遺伝子編集技術に基づき、組換えアデノ随伴ウイルス血清型８（ｒＡＡＶ８）に任意選択的に含有されるＦ９　ＤＮＡ遺伝子挿入鋳型（例えば、一方向性又は双方向性Ｆ９　ＤＮＡ遺伝子挿入鋳型）と会合した脂質ナノ粒子（lipid　nanoparticle、ＬＮＰ）送達系に任意選択的に含有される、治療用産物が本明細書に記載される。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９成分は、標的遺伝子遺伝子座（例えば、肝細胞におけるＡＬＢ遺伝子遺伝子座などのセーフハーバー遺伝子座）において二本鎖ＤＮＡを標的とし、切断するように設計されており、Ｆ９　ＤＮＡ

鋳型が標的ゲノム遺伝子座においてゲノムに挿入されることを可能にする。導入遺伝子の挿入は、血友病Ｂ患者における欠損又は欠陥ゲノムＦ９をコードする機能的Ｆ９遺伝子を提供する。

【０２６５】

場合によっては、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、天然のＦＩＸコード配列と比較して発現のために最適化されている。他の場合、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、天然のＦＩＸコード配列を含み得る。例えば、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、コドン最適化（例えば、ヒトコドンへの）、ＣｐＧジヌクレオチドの枯渇、潜在性スプライス部位の変異、又はそれらの任意の組み合わせなどの１つ以上の修飾を含み得る。１つの具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、天然のＦＩＸコード配列と比較して、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、天然ＦＩＸコード配列と比較して、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（例えば、１つのＣｐＧを導入して、潜在性スプライス部位を変異させる）、１つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、天然のＦＩＸコード配列と比較して、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドンが最適化されている）。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、天然のＦＩＸコード配列と比較して、全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。

【０２６６】

特に、２つの異なるＦＩＸコード配列（すなわち、第１のＦＩＸコード配列及び第２のＦＩＸコード配列の逆相補体）を含む双方向性構築物が本明細書で提供される。そのような双方向性構築物の一例では、一方のＦＩＸコード配列は、天然のＦＩＸコード配列と比較して、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されており（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）（例えば、天然のＦＩＸコード配列と比較して、全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されており（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている））、他方のＦＩＸコード配列は、天然のＦＩＸコード配列と比較して、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている（例えば、天然のＦＩＸコード配列と比較して、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（例えば、１つのＣｐＧを導入して、潜在性スプライス部位を変異させる）、１つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている）。

【０２６７】

コドン最適化されており、完全にＣｐＧが枯渇しているＦＩＸコード配列の１つの特定の例は、配列番号１６６に示される。コドン最適化されており、完全にＣｐＧが枯渇しているＦＩＸコード配列の別の特定の例は、配列番号１６５に示される。１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており、１つ以上の潜在性スプライス部位を変異させるように修飾されている、最適化された天然のＦＩＸコード配列の１つの特定の例は、配列番号１５９に示される。２つの異なるＦＩＸコード配列（すなわち、第１のＦＩＸコード配列及び第２のＦＩＸコード配列の逆相補体）を含む双方向性構築物の１つの特定の例は、配列番号１６６及び１５９に示されるＦＩＸコード配列を含む。２つの異なるＦＩＸコード配列（すなわち、第１のＦＩＸコード配列及び第２のＦＩＸコード配列の逆相補体）を含む双方向性構築物の別の特定の例は、配列番号１６５及び１５９に示されるＦＩＸコ

ード配列を含む。

【０２６８】

単一のＦＩＸコード配列を含む一方向性構築物も本明細書で提供される。そのような一方向性構築物の一例では、ＦＩＸコード配列は、天然のＦＩＸコード配列と比較して、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）（例えば、天然のＦＩＸコード配列と比較して、全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている））。そのような一方向性構築物の別の例では、ＦＩＸコード配列は、天然のＦＩＸコード配列と比較して、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている（例えば、天然のＦＩＸコード配列と比較して、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（例えば、１つのＣｐＧを導入して、潜在性スプライス部位を変異させる）、１つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている）。

【０２６９】

コドン最適化されており、完全にＣｐＧが枯渇しているＦＩＸコード配列の１つの特定の例は、配列番号１６６に示される。コドン最適化されており、完全にＣｐＧが枯渇しているＦＩＸコード配列の別の特定の例は、配列番号１６５に示される。１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており、１つ以上の潜在性スプライス部位を変異させるように修飾されている、最適化された天然のＦＩＸコード配列の１つの特定の例は、配列番号１５９に示される。一方向性構築物の１つの特定の例は、配列番号１６６に示されるＦＩＸコード配列を含む。一方向性構築物の別の特定の例は、配列番号１６５に示されるＦＩＸコード配列を含む。一方向性構築物の別の特定の例は、配列番号１５９に示されるＦＩＸコード配列を含む。

【０２７０】

前世代のＦＩＸコード配列及び前世代の双方向性Ｆ９挿入カセットと比較して、本明細書に開示される構築物は、ＦＩＸ発現（レベル、活性、低変動性、製造可能性）を維持する一方で、ヒト患者における鋳型性能に影響を与え得る潜在的な負の特徴も除去し、野生型マウス及び非ヒト霊長類において観察される意図しない潜在性スプライシング事象を最小化し、ＡＡＶウイルスベクターにおけるＣｐＧ部位が強力なＴＬＲ９アゴニストであり得る非メチル化Ｃ残基を含有するため、ＣｐＧを枯渇させる。

【０２７１】

本明細書に記載の遺伝子挿入プラットフォームはまた、既存のエピソームＦＩＸプラットフォームを超える利点を有する。例えば、使用されるＦ９挿入鋳型はプロモーターを含まないため、プロモーター含有構築物の組み込みに関する懸念がない。使用されるＡＡＶカセットにおいてプロモーター／調節エレメントがないため、ランダムに挿入された場合、隣接する遺伝子座の発現に影響を及ぼす可能性が低い。同様に、使用されるカセットの５’末端にインフレームＡＴＧ／メチオニンがないため、鋳型単独からはタンパク質は生成されない。加えて、正確なリーディングフレームへのスプライシングをもたらすイントロン挿入を必要とするため、オフターゲット挿入からタンパク質を生成する可能性は極めて低い。既存のＦ９エピソームプラットフォームを超える別の利点は、ロバストなタンパク質発現が、高度に活性なゲノム遺伝子座からの転写を利用することによってインビボで達成されたので、治療活性を達成するためにＦＩＸの機能亢進性バリアントを使用する必要がないことである。対照的に、現在臨床試験中のエピソームＦＩＸプラットフォームは、治療活性レベルを達成するために、ＦＩＸの機能亢進性変異体バリアントをコードする。しかしながら、本明細書に開示される方法における組成物は、野生型成熟ＦＩＸが任意の人工的な機能亢進性変異を伴わずにコードされる場合であっても、高レベルの発現をもたらす。更に、本明細書に開示される組成物及び方法におけるようなコード配列の組み込みは、経時的な導入遺伝子保持が、非複製エピソームベクターでは問題となり得、継続的

な治療応答のためにより多くのウイルスを投与することを必要とするため、非組み込みエピソームベクターよりも有利である。しかしながら、これらのその後の曝露は、ウイルスの急速な中和をもたらし、したがって、導入遺伝子発現の低下をもたらす可能性がある。これは、本明細書に開示される組成物及び方法では問題ではなく、組成物及び方法がゲノムへの組み込み及び永続的な発現をもたらすため、再投薬は必要とされない。

【０２７２】

ＩＩ．第ＩＸ因子を発現させるための組成物

内因性アルブミン（ＡＬＢ）遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座への第ＩＸ因子（ＦＩＸ）コード配列の挿入及び／又はＦＩＸコード配列の発現を可能にする核酸構築物及び組成物が本明細書で提供される。核酸構築物及び組成物は、標的ゲノム遺伝子座への組み込み及び／若しくは細胞内での発現のための方法、又は血友病Ｂ若しくはＦＩＸ欠乏症を治療する方法において使用することができる。ヌクレアーゼ剤（例えば、内因性ＡＬＢ遺伝子座を標的とする）又はヌクレアーゼ剤をコードする核酸も提供され、内因性ＡＬＢ遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座への核酸構築物の組み込みを容易にする。

【０２７３】

Ａ．第９因子核酸構築物

本明細書に記載の組成物及び方法は、ＦＩＸタンパク質コード配列（第９因子（Ｆ９）核酸）又はＦＩＸタンパク質コード配列の逆相補体（例えば、異種ＦＩＸタンパク質コード配列（異種Ｆ９核酸）又は異種ＦＩＸタンパク質コード配列の逆相補体）を含む、核酸構築物の使用を含む。例えば、核酸構築物は、異種ＦＩＸタンパク質コード配列（例えば、異種Ｆ９核酸）などのＦＩＸタンパク質コード配列（Ｆ９核酸）を含み得る。そのような核酸構築物は、本明細書の他の場所に開示されるヌクレアーゼ剤若しくはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系による切断後の標的ゲノム遺伝子座への挿入のためのものであり得るか、又は標的ゲノム遺伝子座への（例えば、エピソームにおける）挿入を伴わないＦＩＸの発現のためのものであり得る。例えば、そのような核酸構築物は、本明細書の他の場所に開示されるヌクレアーゼ剤又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系によって作製される切断部位への挿入のためのものであり得るか、又は切断部位への（例えば、エピソームにおける）挿入を伴わないＦＩＸの発現のためのものであり得る。切断部位という用語は、ヌクレアーゼ剤（例えば、ガイドＲＮＡと複合体を形成したＣａｓ９タンパク質）によってニック又は二本鎖切断が作製されるＤＮＡ配列を含む。「異種」ＦＩＸタンパク質コード配列は、外因性供給源として宿主細胞ゲノム内の部位に（例えば、ＡＬＢイントロン１を含むセーフハーバー遺伝子座などのゲノム遺伝子座において）導入されているコード配列を指し得る。すなわち、異種タンパク質コード配列は、その挿入部位に関して異種であり、そのような異種コード配列から発現されたポリペプチドは、異種ポリペプチドと称される。異種コード配列は、天然に存在し得るか、又は操作され得、野生型又はバリアントであり得る。異種コード配列は、異種ポリペプチドをコードする配列以外のヌクレオチド配列（例えば、配列内リボソーム進入部位）を含み得る。異種コード配列は、野生型又はバリアント（例えば、変異体）として宿主ゲノム内に天然に存在するコード配列であり得る。例えば、宿主細胞は目的のコード配列を（野生型として、又はバリアントとして）含有するが、同じコード配列又はそのバリアントを外因性供給源として（例えば、高度に発現される遺伝子座での発現のために）導入することができる。異種コード配列はまた、宿主ゲノム内に天然に存在しないか、又は宿主ゲノム内に天然に存在しない異種ポリペプチドを発現するコード配列であり得る。異種コード配列は、外因性核酸配列（例えば、核酸配列は、レシピエント細胞に対して内因性ではない）を含み得るか、又はその挿入部位に関して、かつ／若しくはそのレシピエント細胞に関して異種であり得る。

【０２７４】

本明細書に開示されるＦ９核酸構築物の長さは、変動し得る。構築物は、例えば、約１ｋｂ～約５ｋｂ、例えば、約１ｋｂ～約４．５ｋｂ又は約１ｋｂ～約４ｋｂであり得る。例示的な核酸構築物は、約１ｋｂ～約５ｋｂの長さ、又は約１ｋｂ～約４ｋｂの長さである。代替的に、核酸構築物は、約１ｋｂ～約１．５ｋｂ、約１．５ｋｂ～約２ｋｂ、約２

ｋｂ～約２．５ｋｂ、約２．５ｋｂ～約３ｋｂ、約３ｋｂ～約３．５ｋｂ、約３．５ｋｂ～約４ｋｂ、約４ｋｂ～約４．５ｋｂ、又は約４．５ｋｂ～約５ｋｂの長さであり得る。代替的に、核酸構築物は、例えば、５ｋｂ以下、４．５ｋｂ以下、４ｋｂ以下、３．５ｋｂ以下、３ｋｂ以下、又は２．５ｋｂ以下の長さであり得る。

【０２７５】

構築物は、デオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid、ＤＮＡ）又はリボ核酸（ribonucleic acid、ＲＮＡ）を含み得、一本鎖、二本鎖、又は部分的に一本鎖及び部分的に二本鎖であり得、直線状又は環状（例えば、ミニサークル）形態で宿主細胞に導入され得る。例えば、米国特許出願公開第２０１０／００４７８０５号、米国特許出願公開第２０１１／０２８１３６１号、及び米国特許出願公開第２０１１／０２０７２２１号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。直線状の形態で導入された場合、構築物の末端は、既知の方法によって（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）保護することができる。例えば、１つ以上のジデオキシヌクレオチド残基を直線状分子の３’末端に付加することができ、かつ／又は自己相補的オリゴヌクレオチドを一方又は両方の末端にライゲーションすることができる。例えば、Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．」８４：４９５９－４９６３、及びＮｅｈｌｓ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ２７２：８８６－８８９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。外因性ポリヌクレオチドを分解から保護するための追加の方法としては、末端アミノ基の付加、並びに例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、及びＯ－メチルリボース又はデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間結合の使用が挙げられるが、これらに限定されない。構築物は、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクター分子の一部として細胞に導入され得る。構築物は、ウイルス要素を省いてもよい。更に、構築物は、ネイキッド核酸として導入され得るか、リポソーム若しくはポロキサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として導入され得るか、又はウイルス（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、若しくはレンチウイルス）によって送達され得る。

【０２７６】

本明細書に開示される構築物は、必要に応じて１つ以上の好適な構造的特徴を含むように、かつ／又は１つ以上の機能的利益を付与するように、いずれか又は両方の末端で修飾され得る。例えば、構造的修飾は、本明細書に開示される構築物を宿主細胞に送達するために使用される方法（例えば、ウイルスベクター送達の使用又は送達のための脂質ナノ粒子へのパッケージング）に応じて変動し得る。そのような修飾には、例えば、逆位末端反復（ＩＴＲ）、ヘアピン、ループなどの末端構造、及びトロイドなどの他の構造が含まれる。例えば、本明細書に開示される構築物は、１つ、２つ、若しくは３つのＩＴＲを含み得るか、又は２つ以下のＩＴＲを含み得る。構造的修飾の種々の方法が既知である。

【０２７７】

いくつかの構築物は、それらの発現が挿入部位での内因性プロモーター（例えば、構築物が宿主細胞のＡＬＢ遺伝子座に組み込まれる場合、内因性ＡＬＢプロモーター）によって駆動されるように挿入され得る。そのような構築物は、ＦＩＸの発現を駆動するプロモーターを含まなくてもよい。例えば、ＦＩＸの発現は、宿主細胞のプロモーター（例えば、導入遺伝子が宿主細胞のＡＬＢ遺伝子座に組み込まれる場合、内因性ＡＬＢプロモーター）によって駆動され得る。そのような場合、構築物は、その発現を駆動する制御要素（例えば、プロモーター及び／又はエンハンサー）を欠いていてもよい（例えば、プロモーターを含まない構築物）。それでもなお、他の場合、構築物は、プロモーター及び／又はエンハンサー、例えば、エピソーム中で又は組み込み時にＦＩＸの発現を駆動する構成的プロモーター又は誘導性若しくは組織特異的（例えば、肝臓特異的又は血小板特異的）プロモーターを含み得る。非限定的な例示的な構成的プロモーターには、サイトメガロウイルス即時初期プロモーター（cytomegalovirus、ＣＭＶ）、シミアンウイルス（ＳＶ４

０）プロモーター、アデノウイルス主要後期（major late promoter、ＭＬＰ）プロモーター、ラス肉腫ウイルス（Rous sarcoma virus、ＲＳＶ）プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（mouse mammary tumor virus、ＭＭＴＶ）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（phosphoglycerate kinase、ＰＧＫ）プロモーター、伸長因子－アルファ（elongation factor-alpha、ＥＦ１ａ）プロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、チューブリンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、その機能的断片、又は前述のいずれかの組み合わせが含まれる。例えば、プロモーターは、ＣＭＶプロモーター又は切断型ＣＭＶプロモーターであり得る。別の例では、プロモーターは、ＥＦ１ａプロモーターであり得る。非限定的な例示的な誘導性プロモーターには、熱ショック、光、化学物質、ペプチド、金属、ステロイド、抗生物質、又はアルコールによって誘導性であるプロモーターが含まれる。誘導性プロモーターは、Ｔｅｔ－Ｏｎ（登録商標）プロモーター（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）などの低い基底（非誘導）発現レベルを有するものであってもよい。発現に必要ではないが、構築物は、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、配列内リボソーム進入部位、ペプチドをコードする追加の配列、及び／又はポリアデニル化シグナルなどの転写又は翻訳調節配列を含み得る。構築物は、シグナルペプチドをコードするシグナル配列の下流にあり、かつそれに作動可能に連結された異種ＦＩＸタンパク質をコードする配列を含み得る。いくつかの例では、核酸構築物は、ＦＩＸタンパク質をコードする核酸のホモロジー非依存性挿入において機能する。そのような核酸構築物は、例えば、非分裂細胞（例えば、相同組換え（homologous recombination、ＨＲ）ではなく、非相同末端結合（non-homologous end joining、ＮＨＥＪ）が、二本鎖ＤＮＡ切断が修復される主要な機構である細胞）において機能し得る。そのような構築物は、例えば、ホモロジー非依存性ドナー構築物であり得る。そのような核酸構築物は、例えば、分裂細胞（例えば、活発に分裂している細胞）において機能し得る。

【０２７８】

本明細書に開示される構築物は、任意の特定の使用のために必要に応じて、かつ／又は１つ以上の所望の機能を付与する、任意の好適な構造的特徴を含むか、又は除外するように修飾され得る。例えば、本明細書に開示されるいくつかの構築物は、ホモロジーアームを含まない。本明細書に開示されるいくつかの構築物は、非相同末端結合によって、ヌクレアーゼ剤の標的ＤＮＡ配列中の切断部位への挿入が可能である（例えば、ＡＬＢ遺伝子座などのセーフハーバー遺伝子への挿入が可能である）。いくつかのそのような構築物は、ホモロジーアームを含まない。例えば、そのような構築物は、本明細書に開示されるヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）による切断後の平滑末端二本鎖切断に挿入することができる。具体的な例では、構築物は、ＡＡＶを介して送達することができ、非相同末端結合による挿入が可能であり得る（例えば、構築物は、ホモロジーアームを含まないものであり得る）。

【０２７９】

特定の例では、構築物は、ホモロジー非依存性標的化組み込みを介して挿入することができる。例えば、構築物中の異種Ｆ９核酸は、ヌクレアーゼ剤の標的部位（例えば、標的化挿入のための標的ＤＮＡ配列中（例えば、セーフハーバー遺伝子中）と同じ標的部位、及び標的化挿入のための標的ＤＮＡ配列を切断するために使用される同じヌクレアーゼ剤）によって各側に隣接され得る。次いで、ヌクレアーゼ剤は、異種Ｆ９核酸に隣接する標的部位を切断することができる。具体的な例では、構築物は、ＡＡＶ媒介送達で送達され、異種Ｆ９核酸に隣接する標的部位の切断は、ＡＡＶの逆位末端反復（ＩＴＲ）を除去することができる。いくつかの例では、標的化挿入のための標的ＤＮＡ配列（例えば、隣接するプロトスペーサー隣接モチーフを含むｇＲＮＡ標的配列などのセーフハーバー遺伝子座中の標的ＤＮＡ配列）は、異種Ｆ９核酸が切断部位又は標的ＤＮＡ配列に正しい向きで挿入される場合にはもはや存在しないが、異種Ｆ９核酸が切断部位又は標的ＤＮＡ配列に逆の向きで挿入される場合には再形成される。これは、異種Ｆ９核酸が発現のために正しい向きで挿入されることを確実にするのに役立ち得る。

【０２８０】
本明細書に開示される構築物は、ポリアデニル化テール配列（例えば、ＦＩＸコード配列の下流又は３’）を含み得る。好適なポリアデニル化テール配列を設計する方法は周知である。ポリアデニル化テール配列は、例えば、ＦＩＸコード配列の下流の「ポリＡ」ストレッチとしてコードされ得る。ポリＡテールは、例えば、少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、又は１００のアデニン、及び任意選択的に最大３００のアデニンを含み得る。具体的な例では、ポリＡテールは、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００のアデニンヌクレオチドを含む。好適なポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列を設計する方法は周知である。例えば、ポリアデニル化シグナル配列ＡＡＵＡＡＡは哺乳動物系において一般的に使用されるが、ＵＡＵＡＡＡ又はＡＵ／ＧＵＡＡＡなどのバリアントが同定されている。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｐｒｏｕｄｆｏｏｔ（２０１１）Ｇｅｎｅｓ　＆　Ｄｅｖ．２５（１７）：１７７０－８２を参照されたい。ポリアデニル化シグナル配列という用語は、転写の終結及びｍＲＮＡ転写物へのポリＡテールの付加を指示する任意の配列を指す。真核生物では、転写ターミネーターはタンパク質因子によって認識され、終結の後に、ポリ（Ａ）ポリメラーゼの存在下でｍＲＮＡ転写物にポリ（Ａ）テールを追加するプロセスであるポリアデニル化が続く。哺乳動物のポリ（Ａ）シグナルは、典型的には、約４５ヌクレオチド長のコア配列で構成されており、切断及びポリアデニル化の効率を高めるのに役立つ多様な補助配列が隣接している場合がある。コア配列は、ポリＡ認識モチーフ又はポリＡ認識配列と呼ばれ、切断及びポリアデニル化特異性因子（cleavage and polyadenylation-specificity factor、ＣＰＳＦ）によって認識される、ｍＲＮＡ内の高度に保存された上流要素（ＡＡＴＡＡＡ又はＡＡＵＡＡＡ）、並びに定義が不十分であり、切断刺激因子（cleavage stimulation factor、ＣｓｔＦ）によって結合される下流領域（Ｕ又はＧ及びＵが豊富）で構成される。使用され得る転写ターミネーターの例には、例えば、ヒト成長ホルモン（human growth hormone、ＨＧＨ）ポリアデニル化シグナル、シミアンウイルス４０（simian virus 40、ＳＶ４０）後期ポリアデニル化シグナル、ウサギベータグロビンポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン（bovine growth hormone、ＢＧＨ）ポリアデニル化シグナル、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）ポリアデニル化シグナル、ＡＯＸ１転写終結配列、ＣＹＣ１転写終結配列、又は真核細胞における遺伝子発現の調節に好適であることが既知の任意の転写終結配列が含まれる。一例では、ポリアデニル化シグナルは、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）後期ポリアデニル化シグナルである。例えば、ポリアデニル化シグナルは、配列番号１９９を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。別の例では、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモン（ＢＧＨ）ポリアデニル化シグナル又はＣｐＧが枯渇しているＢＧＨポリアデニル化シグナルである。例えば、ポリアデニル化シグナルは、配列番号２００を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【０２８１】
本明細書に開示される構築物はまた、スプライスアクセプター部位（例えば、ＦＩＸコード配列の上流又は５’などのＦＩＸコード配列に作動可能に連結されている）を含み得る。スプライスアクセプター部位は、例えば、ＮＡＧを含み得るか、又はＮＡＧからなり得る。具体的な例では、スプライスアクセプターは、ＡＬＢスプライスアクセプターである（例えば、ＡＬＢのエキソン１及び２を一緒にスプライシングする際に使用されるＡＬＢスプライスアクセプター（すなわち、ＡＬＢエキソン２スプライスアクセプター））。例えば、そのようなスプライスアクセプターは、ヒトＡＬＢ遺伝子に由来し得る。別の例では、スプライスアクセプターは、マウスＡｌｂ遺伝子に由来し得る（例えば、マウスＡｌｂのエキソン１及び２を一緒にスプライシングする際に使用されるＡＬＢスプライスアクセプター（すなわち、マウスＡｌｂエキソン２スプライスアクセプター））。別の例では、スプライスアクセプターは、Ｆ９スプライスアクセプターである（例えば、Ｆ９のエキソン１及び２を一緒にスプライシングする際に使用されるＦ９スプライスアクセプター

）。例えば、そのようなスプライスアクセプターは、ヒトＦ９遺伝子に由来し得る。代替的に、そのようなスプライスアクセプターは、マウスＦ９遺伝子に由来し得る。人工スプライスアクセプターを含む、真核生物において有用な追加の好適なスプライスアクセプター部位は周知である。例えば、Ｓｈａｐｉｒｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１５：７１５５－７１７４、及びＢｕｒｓｅｔ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２９：２５５－２５９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。具体的な例では、スプライスアクセプターは、マウスＡｌｂエキソン２スプライスアクセプターである。具体的な例では、スプライスアクセプターは、配列番号２０１を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【０２８２】

いくつかの例では、本明細書に開示される核酸構築物は、以下により詳細に記載される双方向性構築物であり得る。いくつかの例では、本明細書に開示される核酸構築物は、以下により詳細に記載される一方向性構築物であり得る。同様に、いくつかの例では、本明細書に開示される核酸構築物は、本明細書の他の場所でより詳細に記載されるように、ベクター（例えば、ＡＡＶ又はｒＡＡＶ８などのウイルスベクター）及び／又は脂質ナノ粒子内にあり得る。

【０２８３】

（１）第９因子（Ｆ９）

凝固第ＩＸ因子（ＦＩＸ；クリスマス因子又は血漿トロンボプラスチン成分又はＰＴＣとしても既知である）は、第９因子Ｆ９によってコードされ、肝臓で合成される４１５アミノ酸セリンプロテアーゼである。それは、Ca^{2+}イオン、リン脂質、及び第ＶＩＩＩａ因子の存在下で第Ｘ因子をその活性型に変換することによって血液凝固の内因的経路に関与するビタミンＫ依存性血漿タンパク質である。ＦＩＸの血漿濃度は第ＶＩＩＩ因子の約５０倍であり、ＦＩＸは約２４時間の半減期を有する。

【０２８４】

本明細書に開示される組成物及び方法から発現されたＦＩＸは、任意の野生型又はバリアントＦＩＸであり得る。一例では、ＦＩＸは、ヒトＦＩＸタンパク質である。ヒトＦＩＸは、ＵｎｉＰｒｏｔ参照番号Ｐ００７４０が割り当てられている。ヒト第ＩＸ因子についての例示的なアミノ酸配列は、ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿０００１２４．１が割り当てられており、配列番号１に示されている。例示的なヒトＦ９ｍＲＮＡ（ｃＤＮＡ）配列は、ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿０００１３３．４が割り当てられており、配列番号２．例示的なヒトＦ９コード配列は、ＣＣＤＳ　ＩＤ　ＣＣＤＳ１４６６６．１が割り当てられており、配列番号３に示されている。

【０２８５】

いくつかの例では、ＦＩＸ（例えば、ヒトＦＩＸ）は、野生型ＦＩＸ（例えば、野生型ヒトＦＩＸ）配列又はその断片である。例えば、ＦＩＸは、成熟ＦＩＸアミノ酸配列（すなわち、シグナルペプチド及びプロペプチドの除去後のＦＩＸ配列）を含む断片、又は成熟ＦＩＸアミノ酸配列及びプロペプチドの一部を含む断片であり得る。具体的な例では、ＦＩＸは、配列番号１９５を含み得るか、又は配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、若しくは少なくとも９９．５％同一であり得る。

【０２８６】

いくつかの例では、ＦＩＸ（例えば、ヒトＦＩＸ）は、ＦＩＸの機能亢進性又は高機能性バリアントではない（すなわち、ＦＩＸは、野生型と比較してバリアントＦＩＸの活性を増加させる１つ以上の変異を有しない）。他の例では、ＦＩＸ（例えば、ヒトＦＩＸ）は、ＦＩＸのＦＶＩＩＩ非依存性バリアントではない（すなわち、ＦＩＸは、バリアントＦＩＸがその補因子である第ＶＩＩＩ因子の不在下で凝固を活性化することを可能にする１つ以上の変異を有しない）。他の例では、ＦＩＸ（例えば、ヒトＦＩＸ）は、ＦＩＸの

機能亢進性又は高機能性バリアントではなく、ＦＩＸのＦＶＩＩＩ非依存性バリアントではない。

【０２８７】

他の例では、ＦＩＸ（例えば、ヒトＦＩＸ）は、バリアントＦＩＸ（例えば、バリアントヒトＦＩＸ）又はその断片である。例えば、バリアントＦＩＸ又はその断片は、１つ以上の変異を含み得る。一例では、バリアントＦＩＸ又はその断片は、位置Ｒ３３８におけるアミノ酸置換（例えば、Ｒ３３８Ａ又はＲ３３８Ｌ）及び／又は位置Ｓ３７７におけるアミノ酸置換（例えば、Ｓ３７７Ｗ）などの、野生型と比較してバリアントＦＩＸ（機能亢進性又は高機能性）の活性を増加させる１つ以上の変異を有し得る。例えば、米国特許出願公開第２０１９／００１７０３９号及び米国特許出願公開第２０２０／０１７２８９２号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で言及される番号付けは、標準的なＦＩＸ番号付けであり、位置１は、配列番号１におけるアミノ酸４７でのチロシンである（すなわち、配列番号１におけるシグナルペプチド及びプロペプチドに続く成熟ＦＩＸタンパク質の最初のアミノ酸）。バリアントＦＩＸの更なる例は、アラニン、ロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、セリン、及びトレオニンから選択される残基３３８でのアミノ酸を含む。更なるＦＩＸバリアントは、ロイシン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、グルタミン、又はチロシンから選択される残基３３８でのアミノ酸を含む。別の例では、バリアントＦＩＸ又はその断片は、位置Ｌ６、Ｖ１８１、Ｅ１８５、Ｙ２５９、Ａ２６１、Ｋ２６５、Ｙ３４５、Ｉ３８３、Ｅ３８８におけるアミノ酸置換、又はそれらの組み合わせ（例えば、Ｌ６Ｆ、Ｖ１８１Ｉ、Ｅ１８５Ｄ、Ｅ１８５Ｓ、Ｙ２５９Ｆ、Ａ２６１Ｋ、Ｋ２６５Ａ、Ｋ２６５Ｔ、Ｙ３４５Ｆ、Ｉ３８３Ｖ、Ｅ１８８Ｇ、又はそれらの組み合わせ）などの、その補因子である第ＶＩＩＩ因子の不在下でバリアントＦＩＸが凝固を活性化することを可能にする１つ以上の変異を有し得る。例えば、米国特許第１０，１２５，３５７号、米国特許第１０，０００，７４８号、米国特許第１０，６０４，７４９号、米国特許出願公開第２００８／０２１４４６２号、米国特許第８，０２２，１８７号、及び米国特許第８，５１３，３８６号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。別の例では、バリアントＦＩＸ又はその断片は、位置Ｖ１８１、Ｋ２６５、Ｉ３８３若しくはそれらの組み合わせ、又は位置Ｌ６、Ｖ１８１、Ｋ２６５、Ｉ３８３、Ｅ１８５若しくはそれらの組み合わせにおけるアミノ酸置換などの、その補因子である第ＶＩＩＩ因子の不在下でバリアントＦＩＸが凝固を活性化することを可能にする１つ以上の変異を有し得る（例えば、Ｌ６Ｆ変異、Ｖ１８１Ｉ変異、Ｋ２６５Ａ若しくはＫ２６５Ｔ変異、Ｉ３８３Ｖ変異、Ｅ１８５Ｄ変異、又はそれらの組み合わせ、例えば、Ｌ６Ｆ／Ｖ１８１Ｉ／Ｋ２６５Ａ／Ｉ３８３Ｖ、Ｌ６Ｆ／Ｖ１８１Ｉ／Ｋ２６５Ｔ／Ｉ３８３Ｖ、Ｖ１８１Ｉ／Ｋ２６５Ａ／Ｉ３８３Ｖ／Ｅ１８５Ｄ、Ｖ１８１Ｉ／Ｋ２６５Ｔ／Ｉ３８３Ｖ／Ｅ１８５Ｄ、Ｖ１８１Ｉ／Ｋ２６５Ａ／Ｉ３８３Ｖ／Ｅ１８５Ｓ、又はＶ１８１Ｉ／Ｋ２６５Ｔ／Ｉ３８３Ｖ／Ｅ１８５Ｓ、あるいはＶ１８１Ｉ変異、Ｋ２６５Ａ若しくはＫ２６５Ｔ変異、Ｉ３８３Ｖ変異、又はそれらの組み合わせ、例えば、Ｖ１８１Ｉ／Ｋ２６５Ａ／Ｉ３８３Ｖ又はＶ１８１Ｉ／Ｋ２６５Ｔ／Ｉ３８３Ｖ）。別の例では、バリアントＦＩＸ又はその断片は、野生型と比較してバリアントＦＩＸの活性を増加させる１つ以上の変異、及びその補因子である第ＶＩＩＩ因子の不在下でバリアントＦＩＸが凝固を活性化することを可能にする１つ以上の変異を有し得る。

【０２８８】

本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、いかなる修飾も伴わない野生型ＦＩＸコード配列を含み得る。本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、コドン最適化（例えば、ヒトコドンへの）、ＣｐＧジヌクレオチドの枯渇、潜在性スプライス部位の変異、１つ以上のグリコシル化部位の付加、又はそれらの任意の組み合わせなどの１つ以上の修飾を含み得る。構築物中のＣｐＧジヌクレオチドは、構築物の治療的有用性を制限し得る。第一に、非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドは、宿主トール様受容体９（

toll-like receptor-9、ＴＬＲ－９）と相互作用して、先天性の炎症促進性免疫応答を刺激することができる。第二に、ＣｐＧジヌクレオチドがメチル化されると、それらは、メチル－ＣｐＧ結合タンパク質によって調整された導入遺伝子発現の抑制をもたらし得る。潜在性スプライス部位は、通常はスプライス部位として使用されないが、例えば、標準スプライス部位を不活性化するか、又は以前に存在しなかったスプライス部位を作製するかのいずれかの変異によって活性化され得る、プレメッセンジャーＲＮＡ中の配列である。正確なスプライス部位選択は、遺伝子発現の成功のために重要であり、潜在性スプライス部位の除去は、正常な又は意図されたスプライス部位の使用に有利であり得る。

【０２８９】

一例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、１つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されている（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されている。別の例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されている（すなわち、完全にＣｐＧが枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（例えば、１つのＣｐＧを導入して、潜在性スプライス部位を変異させる）、１つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。別の具体的な例では、本明細書に開示される構築物中のＦＩＸコード配列は、全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。

【０２９０】

種々のコドン最適化されたＦＩＸコード配列が提供される。ＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい（例えば、ＣｐＧが枯渇しており（例えば、完全にＣｐＧが枯渇しており）、コドン最適化されている）。一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに示される配列からなる。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対

して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０２９１】

一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに示される配列からなる。ＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０２９２】

一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６又は１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６又は１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６又は１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６又は１６５に示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６又は１６５に示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６又は１６５に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０２９３】

一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、

少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０２９４】

一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）

、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０２９５】

種々の最適化された天然のＦＩＸコード配列も提供される。一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード

配列は、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに示される配列からなる。ＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されている）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０２９６】

一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一

であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されている）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０２９７】

特定のＦ９核酸構築物配列が本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示されるＦ９核酸構築物が仮定配列５’－ＣＴＧＧＡＣＣＧＡ－３’からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体（５’－ＴＣＧＧＴＣＣＡＧ－３’）を包含することを意味する。同様に、双方向性構築物要素が特定の５’から３’への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。同様に、一方向性構築物要素が特定の５’から３’への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。このための理由の１つは、本明細書に開示される多くの実施形態では、Ｆ９核酸構築物が一本鎖組換えＡＡＶベクターの一部であることである。一本鎖ＡＡＶゲノムは、センス（プラス鎖）又はアンチセンス（マイナス鎖ゲノム）のいずれかとしてパッケージされ、＋及び－極性の一本鎖ＡＡＶゲノムは、等

しい頻度で成熟ｒＡＡＶビリオンにパッケージされる。例えば、ＬＩＮＧ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．Ｍｅｄ．９（３）：１７５、Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１６（３）：４９４－４９９、及びＳａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６１：３０９６－３１０１を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２９８】

（２）双方向性構築物

本明細書に開示されるＦ９核酸構築物は、双方向性構築物であり得る。そのような双方向性構築物は、コードされたＦＩＸの増強された挿入及び発現を可能にすることができる。本明細書に記載のヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）系、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）系）と組み合わせて使用される場合、核酸構築物の双方向性は、構築物が標的ゲノム遺伝子座内のいずれかの方向に挿入されることを可能にし（すなわち、一方向の挿入に限定されない）、いずれかの向きで挿入された場合にＦＩＸの発現を可能にし、それによって、本明細書に例示されるように、発現効率を増強する。例えば、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）系、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）系）と組み合わせて使用される場合、核酸構築物の双方向性は、構築物が切断部位又は標的挿入部位内のいずれかの方向に挿入されることを可能にし（すなわち、一方向の挿入に限定されない）、いずれかの向きで挿入された場合にＦＩＸの発現を可能にし、それによって、本明細書に例示されるように、挿入及び発現効率を増強する。

【０２９９】

本明細書に開示される双方向性構築物は、少なくとも２つの核酸セグメントを含み得、第１のセグメントは、第１のＦＩＸコード配列を含み、第２のセグメントは、第２のＦＩＸコード配列の逆相補体を含むか、又はその逆である。しかしながら、本明細書に開示される他の双方向性構築物は、少なくとも２つの核酸セグメントを含み得、第１のセグメントは、ＦＩＸコード配列を含み、第２のセグメントは、別のタンパク質についてのコード配列の逆相補体を含むか、又はその逆である。逆相補体は、参照配列の相補体配列である配列を指し、相補体配列は逆向きに書かれている。例えば、仮定配列５’－ＣＴＧＧＡＣＣＧＡ－３’について、完全相補体配列は３’－ＧＡＣＣＴＧＧＣＴ－５’であり、完全逆相補体配列は５’－ＴＣＧＧＴＣＣＡＧ－３’と書かれる。逆相補体配列は完全である必要はなく、それでも参照配列と同じポリペプチド又は類似のポリペプチドをコードし得る。コドン使用冗長性のために、逆相補体は、同じポリペプチドをコードする参照配列から分岐し得る。コード配列は、ＦＩＸ又は他のタンパク質に連結されたシグナル配列、標識配列（例えば、ＨｉＢｉｔ）、又は異種機能的配列（例えば、核局在化配列（ｎｕｃｌｅａｒ　ｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ　ｓｉｇｎａｌ、ＮＬＳ）又は自己切断ペプチド）などのアミノ末端又はカルボキシ末端アミノ酸配列をコードする配列などの、１つ以上の追加の配列を任意選択的に含み得る。

【０３００】

特定の双方向性構築物配列が本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示される双方向性構築物が仮定配列５’－ＣＴＧＧＡＣＣＧＡ－３’からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体（５’－ＴＣＧＧＴＣＣＡＧ－３’）を包含することを意味する。同様に、双方向性構築物要素が特定の５’から３’への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。例えば、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１のコード配列、第１のターミネーター、第２のターミネーターの逆相補体、第２のコード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含む双方向性構築物が本明細書に開示される場合、それはまた、５’から３’に、第２のスプライスアクセプター、第２のコード配列、第２のターミネーター、第１の

ターミネーターの逆相補体、第１のコード配列の逆相補体、及び第１のスプライスアクセプターの逆相補体を含む構築物を包含することを意味する。このための理由の１つは、本明細書に開示される多くの実施形態では、双方向性構築物が一本鎖組換えＡＡＶベクターの一部であることである。一本鎖ＡＡＶゲノムは、センス（プラス鎖）又はアンチセンス（マイナス鎖ゲノム）のいずれかとしてパッケージされ、＋及び－極性の一本鎖ＡＡＶゲノムは、等しい頻度で成熟ｒＡＡＶビリオンにパッケージされる。例えば、ＬＩＮＧ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．Ｍｅｄ．９（３）：１７５、Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１６（３）：４９４－４９９、及びＳａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６１：３０９６－３１０１を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０３０１】

少なくとも２つのセグメントが両方ともＦＩＸをコードする場合、少なくとも２つのセグメントは、同じＦＩＸタンパク質又は異なるＦＩＸタンパク質をコードし得る。異なるＦＩＸタンパク質は、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、又は少なくとも約９９．５％同一であり得る。例えば、第１のセグメントは、野生型ＦＩＸタンパク質若しくはその断片をコードし得、第２のセグメントは、バリアントＦＩＸタンパク質若しくはその断片をコードし得るか、又はその逆である。代替的に、第１のセグメントは、第１のバリアントＦＩＸタンパク質をコードし得、第２のセグメントは、第１のバリアントＦＩＸタンパク質とは異なる第２のバリアントＦＩＸタンパク質をコードし得る。好ましくは、２つのセグメントは、同じＦＩＸタンパク質（すなわち、１００％同一）をコードする。

【０３０２】

２つのセグメントが同じＦＩＸタンパク質をコードする場合であっても、第１のセグメントにおけるＦＩＸコード配列は、第２のセグメントにおけるＦＩＸコード配列とは異なり得る。いくつかの双方向性構築物では、第１のコード配列でのコドン使用は、第２のコード配列でのコドン使用と同じである。他の双方向性構築物では、ヘアピン形成を低減するために、第２のコード配列は、第１のコード配列のコドン使用とは異なるコドン使用を採用する。コード配列の一方又は両方は、宿主細胞での発現のためにコドン最適化され得る。いくつかの双方向性構築物では、コード配列のうちの１つのみがコドン最適化される。いくつかの双方向性構築物では、第１のコード配列がコドン最適化される。いくつかの双方向性構築物では、第２のコード配列がコドン最適化される。いくつかの双方向性構築物では、両方のコード配列がコドン最適化される。例えば、第２のＦＩＸコード配列は、コドン最適化され得るか、又は第１のセグメントにおけるＦＩＸコード配列によってコードされる同じＦＩＸ（すなわち、同じアミノ酸配列）の１つ以上のアミノ酸に対して１つ以上の代替コドンを使用し得る。代替コドンは、本明細書で使用される場合、所与のアミノ酸についてのコドン使用の変動を指し、所与の発現系について好ましい又は最適化されたコドン（コドン最適化）であってもなくてもよい。好ましいコドン使用、又は所与の発現系において十分に許容されるコドンは既知である。

【０３０３】

一例では、第２のセグメントは、ヘアピン形成を低減させるために、第１のセグメントにおけるＦＩＸコード配列のコドン使用とは異なるコドン使用を採用するＦＩＸコード配列の逆相補体を含む。そのような逆相補体は、第１のセグメントにおけるコード配列の全てのヌクレオチドよりも少ない塩基対を形成するが、任意選択的に同じポリペプチドをコードする。一例では、第２のセグメントにおける逆相補体配列は、第１のセグメントにおけるコード配列に対して実質的に相補的ではない（例えば、７０％以下相補的）。しかしながら、他の場合、第２のセグメントは、第１のセグメントにおけるコード配列に対して高度に相補的（例えば、少なくとも９０％相補的）である逆相補体配列を含む。

【０３０４】

第２のセグメントは、第１のセグメントに対して任意のパーセンテージの相補性を有す

ることができる。例えば、第２のセグメント配列は、第１のセグメントに対する少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、又は少なくとも約９９％の相補性を有することができる。別の例として、第２のセグメント配列は、第１のセグメントに対する約３０％未満、約３５％未満、約４０％未満、約４５％未満、約５０％未満、約５５％未満、約６０％未満、約６５％未満、約７０％未満、約７５％未満、約８０％未満、約８５％未満、約９０％未満、約９５％未満、約９７％未満、又は約９９％未満の相補性を有することができる。いくつかの核酸構築物では、第２のコード配列の逆相補体は、第１のコード配列に実質的に相補的ではなく（例えば、７０％以下相補的）、第１のコード配列の断片に実質的に相補的ではなく、第１のコード配列に高度に相補的であり（例えば、少なくとも９０％相補的）、第１のコード配列の断片に高度に相補的であり、第１のコード配列の逆相補体に対して約５０％～約８０％同一であるか、又は第１のコード配列の逆相補体に対して約６０％～約１００％同一であり得る。

【０３０５】

本明細書に開示される双方向性構築物は、任意の特定の使用のために必要に応じて、及び／又は１つ以上の所望の機能を付与する、任意の好適な構造的特徴を含むように修飾され得る。例えば、本明細書に開示される双方向性核酸構築物は、ホモロジーアームを含む必要はなく、かつ／又は例えば、ホモロジー非依存性ドナー構築物であり得る。核酸構築物の双方向性機能に部分的に起因して、双方向性構築物は、ＦＩＸの効率的な挿入及び／又は発現を可能にするために、本明細書に記載されるようにいずれかの方向でゲノム遺伝子座に挿入され得る。

【０３０６】

場合によっては、双方向性核酸構築物は、ＦＩＸの発現を駆動するプロモーターを含まない。例えば、ＦＩＸの発現は、宿主細胞のプロモーター（例えば、導入遺伝子が宿主細胞のＡＬＢ遺伝子座に組み込まれる場合、内因性ＡＬＢプロモーター）によって駆動され得る。他の場合、双方向性核酸構築物は、ＦＩＸコード配列に作動可能に連結された１つ以上のプロモーターを含み得る。すなわち、発現に必要ではないが、本明細書に開示される構築物はまた、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、配列内リボソーム進入部位、ペプチドをコードする追加の配列、及び／又はポリアデニル化シグナルなどの転写又は翻訳調節配列を含み得る。いくつかの双方向性構築物は、第１のＦＩＸコード配列の発現を駆動するプロモーター、及び／又は第２のＦＩＸコード配列の逆相補体の発現を駆動するプロモーターの逆相補体を含み得る。

【０３０７】

本明細書に開示される双方向性構築物は、任意の特定の使用のために必要に応じて、かつ／又は１つ以上の所望の機能を付与する、任意の好適な構造的特徴を含むか、又は除外するように修飾され得る。例えば、本明細書に開示されるいくつかの双方向性核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。核酸構築物の双方向性機能に部分的に起因して、双方向性構築物は、異種ＦＩＸの効率的な挿入及び／又は発現を可能にするために、本明細書に記載されるようにいずれかの方向（向き）でゲノム遺伝子座に挿入され得る。

【０３０８】

双方向性構築物は、場合によっては、１つ以上（例えば、２つ）のポリアデニル化テール配列又はポリアデニル化シグナル配列を含むことができる。いくつかの双方向性構築物では、第１のセグメントは、ポリアデニル化シグナル配列を含むことができる。いくつかの双方向性構築物では、第２のセグメントは、ポリアデニル化シグナル配列を含むことができる。いくつかの双方向性構築物では、第１のセグメントは、第１のポリアデニル化シグナル配列を含むことができ、第２のセグメントは、第２のポリアデニル化シグナル配列（例えば、ポリアデニル化シグナル配列の逆相補体）を含むことができる。いくつかの双方向性構築物では、第１のセグメントは、第１のコード配列の３’に位置する第１のポリ

アデニル化シグナル配列を含むことができる。いくつかの双方向性構築物では、第２のセグメントは、第２のコード配列の逆相補体の５’に位置する第２のポリアデニル化シグナル配列の逆相補体を含むことができる。いくつかの双方向性構築物では、第１のセグメントは、第１のコード配列の３’に位置する第１のポリアデニル化シグナル配列を含むことができ、第２のセグメントは、第２のコード配列の逆相補体の５’に位置する第２のポリアデニル化シグナル配列の逆相補体を含むことができる。第１及び第２のポリアデニル化シグナル配列は、同じであっても異なっていてもよい。一例では、第１及び第２のポリアデニル化シグナルは異なっている。具体的な例では、第１のポリアデニル化シグナルは、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）後期ポリアデニル化シグナル（若しくはそのバリアント）であり、第２のポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモン（ＢＧＨ）ポリアデニル化シグナル（若しくはそのバリアント）であるか、又はその逆である。例えば、一方のポリアデニル化シグナルは、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナルであり得、他方のポリアデニル化シグナルは、ＣｐＧが枯渇しているＢＧＨポリアデニル化シグナルであり得る。具体的な例では、一方のポリアデニル化シグナルは、配列番号１９９を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得、他方のポリアデニル化シグナルは、配列番号２００を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【０３０９】

いくつかの双方向性構築物では、第１のセグメント及び第２のセグメントの両方は、ポリアデニル化テール配列を含む。好適なポリアデニル化テール配列を設計する方法は既知である。例えば、いくつかの双方向性構築物では、第１及び第２のセグメントの一方又は両方は、オープンリーディングフレームの下流にポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列（すなわち、コード配列の３’のポリアデニル化テール配列及び／若しくはポリアデニル化シグナル配列、又はコード配列の逆相補体の５’のポリアデニル化テール配列及び／若しくはポリアデニル化シグナル配列の逆相補体）を含む。ポリアデニル化テール配列は、例えば、第１及び／又は第２のセグメントにおけるＦＩＸコード配列（又は他のタンパク質コード配列）の下流の「ポリＡ」ストレッチとしてコードされ得る。ポリＡテールは、例えば、少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、又は１００のアデニン、及び任意選択的に最大３００のアデニンを含み得る。具体的な例では、ポリＡテールは、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００のアデニンヌクレオチドを含む。好適なポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列を設計する方法は周知である。例えば、ポリアデニル化シグナル配列ＡＡＵＡＡＡは哺乳動物系において一般的に使用されるが、ＵＡＵＡＡＡ又はＡＵ／ＧＵＡＡＡなどのバリアントが同定されている。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｐｒｏｕｄｆｏｏｔ（２０１１）Ｇｅｎｅｓ ＆ Ｄｅｖ．２５（１７）：１７７０－８２を参照されたい。いくつかの双方向性構築物では、単一の双方向性ターミネーターが、センス方向又はアンチセンス方向のいずれかでＲＮＡポリメラーゼ転写を終結させるために（すなわち、第１のセグメント及び第２のセグメントの両方からのＲＮＡポリメラーゼ転写を終結させるために）使用され得る。双方向性ターミネーターの例には、ＡＲＯ４、ＴＲＰ１、ＴＲＰ４、ＡＤＨ１、ＣＹＣ１、ＧＡＬ１、ＧＡＬ７、及びＧＡＬ１０ターミネーターが含まれる。

【０３１０】

双方向性構築物は、場合によっては、１つ以上（例えば、２つ）のスプライスアクセプター部位を含むことができる。いくつかの双方向性構築物では、第１のセグメントは、スプライスアクセプター部位を含むことができる。いくつかの双方向性構築物では、第２のセグメントは、スプライスアクセプター部位を含むことができる。いくつかの双方向性構築物では、第１のセグメントは、第１のスプライスアクセプター部位を含むことができ、第２のセグメントは、第２のスプライスアクセプター部位（例えば、スプライスアクセプター部位の逆相補体）を含むことができる。いくつかの双方向性構築物では、第１のセグメントは、第１のコード配列の５’に位置する第１のスプライスアクセプター部位を含む。いくつかの双方向性構築物では、第２のセグメントは、第２のコード配列の逆相補体の

３’に位置する第２のスプライスアクセプター部位の逆相補体を含む。いくつかの双方向性構築物では、第１のセグメントは、第１のコード配列の５’に位置する第１のスプライスアクセプター部位を含み、第２のセグメントは、第２のコード配列の逆相補体の３’に位置する第２のスプライスアクセプター部位の逆相補体を含む。第１及び第２のスプライスアクセプター部位は、同じであっても異なっていてもよい。具体的な例では、両方のスプライスアクセプターは、マウスＡｌｂエキソン２スプライスアクセプターである。具体的な例では、両方のスプライスアクセプターは、配列番号２０１を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【０３１１】

双方向性構築物は、スプライスアクセプターに連結された第１のコード配列をコードする第１のコード配列と、スプライスアクセプターの逆相補体に作動可能に連結された第２のコード配列の逆相補体とを含み得る。本明細書に開示される双方向性構築物はまた、構築物のいずれか若しくは両方の末端にスプライスアクセプター部位、又は第１のセグメント及び第２のセグメントの両方にスプライスアクセプター部位（例えば、コード配列の５’のスプライスアクセプター部位、又はコード配列の逆相補体の３’のスプライスアクセプターの逆相補体）を含むことができる。スプライスアクセプター部位は、例えば、ＮＡＧを含み得るか、又はＮＡＧからなり得る。具体的な例では、スプライスアクセプターは、ＡＬＢスプライスアクセプターである（例えば、ＡＬＢのエキソン１及び２を一緒にスプライシングする際に使用されるＡＬＢスプライスアクセプター（すなわち、ＡＬＢエキソン２スプライスアクセプター））。例えば、そのようなスプライスアクセプターは、ヒトＡＬＢ遺伝子に由来し得る。別の例では、スプライスアクセプターは、マウスＡｌｂ遺伝子に由来し得る（例えば、マウスＡｌｂのエキソン１及び２を一緒にスプライシングする際に使用されるＡＬＢスプライスアクセプター（すなわち、マウスＡｌｂエキソン２スプライスアクセプター））。別の例では、スプライスアクセプターは、Ｆ９スプライスアクセプターである（例えば、Ｆ９のエキソン１及び２を一緒にスプライシングする際に使用されるＦ９スプライスアクセプター）。例えば、そのようなスプライスアクセプターは、ヒトＦ９遺伝子に由来し得る。代替的に、そのようなスプライスアクセプターは、マウスＦ９遺伝子に由来し得る。人工スプライスアクセプターを含む、真核生物において有用な追加の好適なスプライスアクセプター部位は既知である。例えば、Ｓｈａｐｉｒｏ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１５：７１５５－７１７４、及びＢｕｒｓｅｔ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２９：２５５－２５９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。双方向性構築物において使用されるスプライスアクセプターは、同じであっても異なっていてもよい。具体的な例では、両方のスプライスアクセプターは、マウスＡｌｂエキソン２スプライスアクセプターである。

【０３１２】

双方向性構築物は、環状又は直線状であり得る。例えば、双方向性構築物は直線状であり得る。第１及び第２のセグメントは、リンカー配列を介して直線状の様式で結合され得る。例えば、逆相補体配列を含む第２のセグメントの５’末端は、第１のセグメントの３’末端に連結され得る。代替的に、第１のセグメントの５’末端は、逆相補体配列を含む第２のセグメントの３’末端に連結され得る。リンカーは、任意の好適な長さであり得る。例えば、リンカーは、約５～約２０００ヌクレオチドの長さであり得る。一例として、リンカー配列は、約１、約２、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２５、約３０、約３５、約４０、約４５、約５０、約５５、約６０、約６５、約７０、約７５、約８０、約８５、約９０、約９５、約１００、約１５０、約２００、約２５０、約３００、約５００、約１０００、約１５００、約２０００、又はそれ以上のヌクレオチド長であり得る。リンカー配列に加えて、又はリンカー配列の代わりに、他の構造的要素もまた、第１のセグメントと第２のセグメントとの間に挿入され得る。

【０３１３】

本明細書に開示される双方向性構築物は、ＤＮＡ又はＲＮＡ、一本鎖、二本鎖、又は部分的に一本鎖及び部分的に二本鎖であり得る。例えば、構築物は、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡであり得る。いくつかの実施形態では、核酸は、本明細書に記載されるように、（例えば、ヌクレオシド類似体を使用して）修飾され得る。具体的な例では、双方向性構築物は、一本鎖（例えば、一本鎖ＤＮＡ）である。

【０３１４】

本明細書に開示される双方向性構築物は、必要に応じて１つ以上の好適な構造的特徴を含むように、かつ／又は１つ以上の機能的利益を付与するように、いずれか又は両方の末端で修飾され得る。例えば、構造的修飾は、本明細書に開示される構築物を宿主細胞に送達するために使用される方法（例えば、ウイルスベクター送達の使用又は送達のための脂質ナノ粒子へのパッケージング）に応じて変動し得る。そのような修飾には、例えば、逆位末端反復（ＩＴＲ）、ヘアピン、ループなどの末端構造、及びトロイドなどの他の構造が含まれる。例えば、本明細書に開示される構築物は、１つ、２つ、若しくは３つのＩＴＲを含み得るか、又は２つ以下のＩＴＲを含み得る。構造的修飾の種々の方法が既知である。

【０３１５】

同様に、構築物の一方又は両方の末端は、既知の方法によって（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）保護することができる。例えば、１つ以上のジデオキシヌクレオチド残基を直線状分子の３’末端に付加することができ、かつ／又は自己相補的オリゴヌクレオチドを一方又は両方の末端にライゲーションすることができる。例えば、Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．」８４：４９５９－４９６３、及びＮｅｈｌｓ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ２７２：８８６－８８９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。構築物を分解から保護するための追加の方法には、末端アミノ基の付加、並びに例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、及びＯ－メチルリボース又はデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間連結の使用が含まれるが、これらに限定されない。

【０３１６】

本明細書でより詳細に開示されるように、本明細書に開示される双方向性構築物は、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクターの一部として細胞に導入され得る。構築物は、ネイキッド核酸として導入され得るか、リポソーム、ポリマー、若しくはポロキサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として導入され得るか、又はウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、ＡＡＶ、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス）によって送達され得る。

【０３１７】

本明細書に開示される双方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、コドン最適化（例えば、ヒトコドンへの）、ＣｐＧジヌクレオチドの枯渇、潜在性スプライス部位の変異、１つ以上のグリコシル化部位の付加、又はそれらの任意の組み合わせなどの１つ以上の修飾を含み得る。構築物中のＣｐＧジヌクレオチドは、構築物の治療的有用性を制限し得る。第一に、非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドは、宿主トール様受容体９（ＴＬＲ－９）と相互作用して、先天性の炎症促進性免疫応答を刺激することができる。第二に、ＣｐＧジヌクレオチドがメチル化されると、それらは、メチル－ＣｐＧ結合タンパク質によって調整された導入遺伝子発現の抑制をもたらし得る。潜在性スプライス部位は、通常はスプライス部位として使用されないが、例えば、標準スプライス部位を不活性化するか、又は以前に存在しなかったスプライス部位を作製するかのいずれかの変異によって活性化され得る、プレメッセンジャーＲＮＡ中の配列である。正確なスプライス部位選択は、遺伝子発現の成功のために重要であり、潜在性スプライス部位の除去は、正常な又は意図されたスプライス部位の使用に有利であり得る。

【０３１８】

一例では、本明細書に開示される双方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、１つ以上の

潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される双方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される双方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されている（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される双方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されている。別の例では、本明細書に開示される双方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されている（すなわち、完全にＣｐＧが枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される双方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。具体的な例では、本明細書に開示される双方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される双方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており、１つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される双方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。別の具体的な例では、本明細書に開示される双方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。

【０３１９】

１つの具体的な例では、本明細書に開示される双方向性構築物中の一方のＦＩＸコード配列は、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されており、本明細書に開示される双方向性構築物中の他方のＦＩＸコード配列は、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、コドンが最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドンが最適化されている）。別の具体的な例では、本明細書に開示される双方向性構築物中の一方のＦＩＸコード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており、１つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されており、本明細書に開示される双方向性構築物中の他方のＦＩＸコード配列は、全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。

【０３２０】

例示的な双方向性構築物では、第２のセグメントは、第１のセグメントの３’に位置し、第１のＦＩＸコード配列及び第２のＦＩＸコード配列は両方とも同じヒトＦＩＸタンパク質をコードし、第２のＦＩＸコード配列は、第１のＦＩＸコード配列のコドン使用とは異なるコドン使用を採用し、第１のセグメントは、第１のＦＩＸコード配列の３’に位置する第１のポリアデニル化シグナル配列を含み、第２のセグメントは、第２のＦＩＸコード配列の逆相補体の５’に位置する第２のポリアデニル化シグナル配列の逆相補体を含み、第１のセグメントは、第１のＦＩＸコード配列の５’に位置する第１のスプライスアクセプター部位を含み、第２のセグメントは、第２のＦＩＸコード配列の逆相補体の３’に位置する第２のスプライスアクセプター部位の逆相補体を含み、核酸構築物は、第１のＦＩＸタンパク質又は第２のＦＩＸタンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、任意選択的に、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。

【０３２１】

双方向性構築物の一例では、第１のＦＩＸタンパク質コード配列及び第２のＦＩＸタンパク質コード配列は、異なっているが、同じＦＩＸタンパク質配列をコードし、ＦＩＸコ

ード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇しており（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されている（例えば、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されている）。一例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに示される配列からなる。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３２２】

一例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに示される配列からなる。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している

）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３２３】

一例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６又は１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６又は１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６又は１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６又は１６５に示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６又は１６５に示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６又は１６５に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列

を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３２４】

一例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）

。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３２５】

一例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば

、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３２６】

種々の最適化された天然のＦＩＸコード配列も提供される。一例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに示される配列からなる。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも

９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３２７】

一例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプラ

イスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３２８】

一例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なく

ともＸＸ％、少なくともＸＸ．Ｘ％、又はＸＸＸ％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号ＸＸＸに対して少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ．Ｘ％、又はＸＸＸ％同一であり（又は配列を含み）、配列番号ＸＸＸに示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号ＸＸＸに対して少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ．Ｘ％、又はＸＸＸ％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号ＸＸＸに対して少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ．Ｘ％、又はＸＸＸ％同一であり（又は配列を含み）、配列番号ＸＸＸに対して少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ．Ｘ％、又はＸＸＸ％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号ＸＸＸに対して少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ．Ｘ％、又はＸＸＸ％同一であり（又は配列を含み）、配列番号ＸＸＸに示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号ＸＸＸに示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号ＸＸＸに示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号ＸＸＸに示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号ＸＸＸに対して少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ．Ｘ％、又はＸＸＸ％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号ＸＸＸに対して少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ．Ｘ％、又はＸＸＸ％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号ＸＸＸに対して少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ．Ｘ％、又はＸＸＸ％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号ＸＸＸに示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号ＸＸＸに示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号ＸＸＸに示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【ＸＸＸＸ】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号ＸＸＸに対して少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ．Ｘ％、又はＸＸＸ％同一であり（又は配列を含み）、配列番号ＸＸＸに対して少なくともＸＸ％、少なくともＸＸ．Ｘ％、又はＸＸＸ％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１

つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、

少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３３０】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコ

ードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３３１】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１

００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３３２】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少

なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも

９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３３３】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００

％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３３４】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦ

ＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする

。

【０３３５】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐ

Ｇが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３３６】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列

番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３３７】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に示される配列を含む。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％

同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸ

コード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３３８】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に示される配列から本質的になる。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるよう

に修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３３９】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６６に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では

、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３４０】

一例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番

号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的にな

るＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３４１】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去され

ているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３４２】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、

少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３４３】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して

少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタン

パク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３４４】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に

示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３４５】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードす

る。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３４６】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが

枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）

。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３４７】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．

５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３４８】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも

９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３４９】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に示される配列を含む

。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパ

ク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３５０】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に示される配列から本質的になる。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は

、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３５１】

別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列のうちの１つは、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。一例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配

列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、他のＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列からなる。他のＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、他のＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列の一方又は両方は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３５２】

特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０２～２２４又は１７２～１９４のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少な

くとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０２～２２４又は１７２～１９４のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０２～２２４又は１７２～１９４のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０２～２２４又は１７２～１９４のうちのいずれか１つを含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０２～２２４又は１７２～１９４のうちのいずれか１つから本質的になる。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０２～２２４又は１７２～１９４のうちのいずれか１つからなる。

【０３５３】

特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０３～２２４又は１７３～１９４のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０３～２２４又は１７３～１９４のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０３～２２４又は１７３～１９４のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０３～２２４又は１７３～１９４のうちのいずれか１つを含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０３～２２４又は１７３～１９４のうちのいずれか１つから本質的になる。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０３～２２４又は１７３～１９４のうちのいずれか１つからなる。

【０３５４】

特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０４～２２４又は１７４～１９４のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０４～２２４又は１７４～１９４のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０４～２２４又は１７４～１９４のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０４～２２４又は１７４～１９４のうちのいずれか１つを含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０４～２２４又は１７４～１９４のうちのいずれか１つから本質的になる。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０４～２２４又は１７４～１９４のうちのいずれか１つからなる。

【０３５５】

特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０又は２０９又は１８０又は１７９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０又は２０９又

は１８０又は１７９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０又は２０９又は１８０又は１７９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０又は２０９又は１８０又は１７９を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０又は２０９又は１８０又は１７９から本質的になる。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０又は２０９又は１８０又は１７９からなる。

【０３５６】

特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０又は１８０に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０又は１８０に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０又は１８０に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０又は１８０を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０又は１８０から本質的になる。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０又は１８０からなる。

【０３５７】

特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０から本質的になる。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２１０からなる。

【０３５８】

特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号１８０に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号１８０に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号１８０に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号１８０を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号１８０から本質的になる。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号１８０からなる。

【０３５９】

特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０９又は１７９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少な

くとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０９又は１７９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０９又は１７９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０９又は１７９を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０９又は１７９から本質的になる。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０９又は１７９からなる。

【０３６０】

特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０９を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０９から本質的になる。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号２０９からなる。

【０３６１】

特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号１７９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号１７９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号１７９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である配列を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号１７９を含む。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号１７９から本質的になる。別の特定の例では、例示的な双方向性構築物は、配列番号１７９からなる。

【０３６２】

（３）一方向性構築物

本明細書に開示されるＦ９核酸構築物は、一方向性構築物であり得る。

【０３６３】

特定の一方向性構築物配列が本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示される一方向性構築物が仮定配列５’－ＣＴＧＧＡＣＣＧＡ－３’からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体（５’－ＴＣＧＧＴＣＣＡＧ－３’）を包含することを意味する。同様に、一方向性構築物要素が特定の５’から３’への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。このための理由の１つは、本明細書に開示される多くの実施形態では、一方向性構築物が一本鎖組換えＡＡＶベクターの一部であることである。一本鎖ＡＡＶゲノムは、センス（プラス鎖）又はアンチセンス（マイナス鎖ゲノム）のいずれかとしてパッケージされ、＋及び－極性の一本鎖ＡＡＶゲノムは、等しい頻度で成熟ｒＡＡＶビリオンにパッケージされる。例えば、ＬＩＮＧ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．Ｍｅｄ．９（３）：１７５、Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．（２００８）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１６（３）：４９４－４９９、及びＳａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６１：３０９６－３１０１

を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０３６４】

一方向性構築物では、ＦＩＸコード配列は、更なる改変を伴わない野生型ＦＩＸコード配列であり得る。一方向性構築物では、ＦＩＸコード配列は、宿主細胞での発現のためにコドン最適化され得る。例えば、ＦＩＸコード配列は、コドン最適化され得るか、又はＦＩＸの１つ以上のアミノ酸（すなわち、同じアミノ酸配列）の１つ以上の代替コドンを使用し得る。代替コドンは、本明細書で使用される場合、所与のアミノ酸についてのコドン使用の変動を指し、所与の発現系について好ましい又は最適化されたコドン（コドン最適化）であってもなくてもよい。好ましいコドン使用、又は所与の発現系において十分に許容されるコドンは既知である。

【０３６５】

本明細書に開示される一方向性構築物は、任意の特定の使用のために必要に応じて、及び／又は１つ以上の所望の機能を付与する、任意の好適な構造的特徴を含むように修飾され得る。例えば、本明細書に開示される一方向性核酸構築物は、ホモロジーアームを含む必要はなく、かつ／又は例えば、ホモロジー非依存性ドナー構築物であり得る。

【０３６６】

場合によっては、一方向性核酸構築物は、ＦＩＸの発現を駆動するプロモーターを含まない。例えば、ＦＩＸの発現は、宿主細胞のプロモーター（例えば、導入遺伝子が宿主細胞のＡＬＢ遺伝子座に組み込まれる場合、内因性ＡＬＢプロモーター）によって駆動され得る。他の場合、一方向性核酸構築物は、ＦＩＸコード配列に作動可能に連結された１つ以上のプロモーターを含み得る。すなわち、発現に必要ではないが、本明細書に開示される構築物はまた、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、配列内リボソーム進入部位、ペプチドをコードする追加の配列、及び／又はポリアデニル化シグナルなどの転写又は翻訳調節配列を含み得る。いくつかの一方向性構築物は、ＦＩＸコード配列の発現を駆動するプロモーターを含むことができる。

【０３６７】

一方向性構築物は、場合によっては、１つ以上のポリアデニル化テール配列又はポリアデニル化シグナル配列を含むことができる。いくつかの一方向性構築物は、ＦＩＸコード配列の３’に位置するポリアデニル化シグナル配列を含むことができる。具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）後期ポリアデニル化シグナル（又はそのバリアント）である。別の具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモン（ＢＧＨ）ポリアデニル化シグナル（又はそのバリアント）である。別の具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、ＣｐＧが枯渇しているＢＧＨポリアデニル化シグナルである。例えば、ポリアデニル化シグナルは、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル又はＣｐＧが枯渇しているＢＧＨポリアデニル化シグナルであり得る。具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号１９９を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。別の具体的な例では、ポリアデニル化シグナルは、配列番号２００を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【０３６８】

好適なポリアデニル化テール配列を設計する方法は既知である。例えば、いくつかの一方向性構築物は、オープンリーディングフレームの下流にポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列（すなわち、コード配列の３’のポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列）を含む。ポリアデニル化テール配列は、例えば、第１及び／又は第２のセグメントにおけるＦＩＸコード配列（又は他のタンパク質コード配列）の下流の「ポリＡ」ストレッチとしてコードされ得る。ポリＡテールは、例えば、少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、又は１００のアデニン、及び任意選択的に最大３００のアデニンを含み得る。具体的な例では、ポリＡテールは、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００のアデニンヌクレオチドを含む。好適なポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列を設計する方法は

周知である。例えば、ポリアデニル化シグナル配列ＡＡＵＡＡＡは哺乳動物系において一般的に使用されるが、ＵＡＵＡＡＡ又はＡＵ／ＧＵＡＡＡなどのバリアントが同定されている。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｐｒｏｕｄｆｏｏｔ（２０１１）Ｇｅｎｅｓ　＆　Ｄｅｖ．２５（１７）：１７７０－８２を参照されたい。

【０３６９】

一方向性構築物は、場合によっては、１つ以上のスプライスアクセプター部位を含むことができる。いくつかの一方向性構築物は、ＦＩＸコード配列の５’に位置するスプライスアクセプター部位を含む。具体的な例では、スプライスアクセプターは、マウスＡｌｂエキソン２スプライスアクセプターである。具体的な例では、スプライスアクセプターは、配列番号２０１を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【０３７０】

スプライスアクセプター部位は、例えば、ＮＡＧを含み得るか、又はＮＡＧからなり得る。具体的な例では、スプライスアクセプターは、ＡＬＢスプライスアクセプターである（例えば、ＡＬＢのエキソン１及び２を一緒にスプライシングする際に使用されるＡＬＢスプライスアクセプター（すなわち、ＡＬＢエキソン２スプライスアクセプター））。例えば、そのようなスプライスアクセプターは、ヒトＡＬＢ遺伝子に由来し得る。別の例では、スプライスアクセプターは、マウスＡｌｂ遺伝子に由来し得る（例えば、マウスＡｌｂのエキソン１及び２を一緒にスプライシングする際に使用されるＡＬＢスプライスアクセプター（すなわち、マウスＡｌｂエキソン２スプライスアクセプター））。別の例では、スプライスアクセプターは、Ｆ９スプライスアクセプターである（例えば、Ｆ９のエキソン１及び２を一緒にスプライシングする際に使用されるＦ９スプライスアクセプター）。例えば、そのようなスプライスアクセプターは、ヒトＦ９遺伝子に由来し得る。代替的に、そのようなスプライスアクセプターは、マウスＦ９遺伝子に由来し得る。人工スプライスアクセプターを含む、真核生物において有用な追加の好適なスプライスアクセプター部位は既知である。例えば、Ｓｈａｐｉｒｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１５：７１５５－７１７４、及びＢｕｒｓｅｔ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２９：２５５－２５９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０３７１】

一方向性構築物は、環状又は直線状であり得る。例えば、一方向性構築物は直線状であり得る。

【０３７２】

本明細書に開示される一方向性構築物は、ＤＮＡ又はＲＮＡ、一本鎖、二本鎖、又は部分的に一本鎖及び部分的に二本鎖であり得る。例えば、構築物は、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡであり得る。いくつかの実施形態では、核酸は、本明細書に記載されるように、（例えば、ヌクレオシド類似体を使用して）修飾され得る。具体的な例では、一方向性構築物は、一本鎖（例えば、一本鎖ＤＮＡ）である。

【０３７３】

本明細書に開示される一方向性構築物は、必要に応じて１つ以上の好適な構造的特徴を含むように、かつ／又は１つ以上の機能的利益を付与するように、いずれか又は両方の末端で修飾され得る。例えば、構造的修飾は、本明細書に開示される構築物を宿主細胞に送達するために使用される方法（例えば、ウイルスベクター送達の使用又は送達のための脂質ナノ粒子へのパッケージング）に応じて変動し得る。そのような修飾には、例えば、逆位末端反復（ＩＴＲ）、ヘアピン、ループなどの末端構造、及びトロイドなどの他の構造が含まれる。例えば、本明細書に開示される構築物は、１つ、２つ、若しくは３つのＩＴＲを含み得るか、又は２つ以下のＩＴＲを含み得る。構造的修飾の種々の方法が既知である。

【０３７４】

同様に、構築物の一方又は両方の末端は、既知の方法によって（例えば、エキソヌクレ

アーゼ分解から）保護することができる。例えば、１つ以上のジデオキシヌクレオチド残基を直線状分子の３’末端に付加することができ、かつ／又は自己相補的オリゴヌクレオチドを一方又は両方の末端にライゲーションすることができる。例えば、Ｃｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．」８４：４９５９－４９６３、及びＮｅｈｌｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ２７２：８８６－８８９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。構築物を分解から保護するための追加の方法には、末端アミノ基の付加、並びに例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、及びＯ－メチルリボース又はデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間連結の使用が含まれるが、これらに限定されない。

【０３７５】

本明細書でより詳細に開示されるように、本明細書に開示される一方向性構築物は、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクターの一部として細胞に導入され得る。構築物は、ネイキッド核酸として導入され得るか、リポソーム、ポリマー、若しくはポロキサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として導入され得るか、又はウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、ＡＡＶ、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス）によって送達され得る。

【０３７６】

本明細書に開示される一方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、コドン最適化（例えば、ヒトコドンへの）、ＣｐＧジヌクレオチドの枯渇、潜在性スプライス部位の変異、１つ以上のグリコシル化部位の付加、又はそれらの任意の組み合わせなどの１つ以上の修飾を含み得る。構築物中のＣｐＧジヌクレオチドは、構築物の治療的有用性を制限し得る。第一に、非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドは、宿主トール様受容体９（ＴＬＲ－９）と相互作用して、先天性の炎症促進性免疫応答を刺激することができる。第二に、ＣｐＧジヌクレオチドがメチル化されると、それらは、メチル－ＣｐＧ結合タンパク質によって調整された導入遺伝子発現の抑制をもたらし得る。潜在性スプライス部位は、通常はスプライス部位として使用されないが、例えば、標準スプライス部位を不活性化するか、又は以前に存在しなかったスプライス部位を作製するかのいずれかの変異によって活性化され得る、プレメッセンジャーＲＮＡ中の配列である。正確なスプライス部位選択は、遺伝子発現の成功のために重要であり、潜在性スプライス部位の除去は、正常な又は意図されたスプライス部位の使用に有利であり得る。

【０３７７】

一例では、本明細書に開示される一方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、１つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される一方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の例では、本明細書に開示される一方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されている（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される一方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されている。別の例では、本明細書に開示される一方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されている（すなわち、完全にＣｐＧが枯渇している）。別の例では、本明細書に開示される一方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。具体的な例では、本明細書に開示される一方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される一方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており、１つ以上又は全ての同定された潜在性スプライス部位が変異又は除去されている。別の具体的な例では、本明細書に開示される一方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、１つ以上のＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、ＣｐＧが枯渇している）、コドン最適

化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。別の具体的な例では、本明細書に開示される一方向性構築物中のＦＩＸコード配列は、全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されており（すなわち、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されている（例えば、ヒト又は哺乳動物における発現のためにコドン最適化されている）。

【０３７８】

例示的な一方向性構築物では、構築物は、ＦＩＸコード配列の３’に位置するポリアデニル化シグナル配列を含み、構築物は、ＦＩＸコード配列の５’に位置するスプライスアクセプター部位を含み、核酸構築物は、ＦＩＸタンパク質の発現を駆動するプロモーターを含まず、任意選択的に、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。

【０３７９】

一方向性構築物の一例では、ＦＩＸタンパク質コード配列は、ＣｐＧが枯渇しており（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されている（例えば、ＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇しており、コドン最適化されている）。一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６２～１７１のうちのいずれか１つに示される配列からなる。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３８０】

一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つ

に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６４～１７１のうちのいずれか１つに示される配列からなる。ＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３８１】

一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６又は１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６又は１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６又は１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６又は１６５に示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６又は１６５に示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６又は１６５に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタ

ンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３８２】

一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６６に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、

少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３８３】

一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１６５に示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１６５に示される配列からなる。ＦＩＸコー

ド配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又はコドン最適化されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、完全にＣｐＧが枯渇している）、コドン最適化されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３８４】

種々の最適化された天然のＦＩＸコード配列も提供される。一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９～１６１のうちのいずれか１つに示される配列からなる。ＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸ

の活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３８５】

一例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一である（又は配列を含む）。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であり（又は配列を含み）、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列を含む。別の例では、ＦＩＸコード配列は、配列番号１５９に示される配列から本質的になる。別の例では、ＦＩＸコード配列のうちの１つは、配列番号１５９に示される配列からなる。ＦＩＸコード配列は、例えば、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、かつ／又は１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例えば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。例えば、ＦＩＸコード配列は、ＣｐＧが枯渇していてもよく（例えば、１つを除く全てのＣｐＧジヌクレオチドが除去されているか、又は完全にＣｐＧが枯渇している）、１つ以上の潜在性スプライスドナー配列（例え

ば、全ての同定された潜在性スプライスドナー配列）を変異させるように修飾されていてもよい。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、ＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に対して少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、又は１００％同一であるＦＩＸタンパク質（又は配列を含むＦＩＸタンパク質）をコードする（かつ例えば、天然ＦＩＸの活性を保持する）。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列を含むＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列から本質的になるＦＩＸタンパク質をコードする。任意選択的に、上記の例におけるＦＩＸコード配列は、配列番号１９５に示される配列からなるＦＩＸタンパク質をコードする。

【０３８６】

（４）ベクター

本明細書に開示されるＦ９核酸構築物は、発現のための、又は標的ゲノム遺伝子座への組み込み及び標的ゲノム遺伝子座からの発現のためのベクターにおいて提供され得る。ベクターは、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を含むことができる。ベクターはまた、本明細書の他の場所に開示されるヌクレアーゼ剤成分を含むことができる。例えば、ベクターは、Ｆ９核酸構築物、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系（Ｃａｓタンパク質及びｇＲＮＡをコードする核酸）、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系のうちの１つ以上の成分、又はそれらの組み合わせ（例えば、Ｆ９核酸構築物及びｇＲＮＡ）を含むことができる。場合によっては、Ｆ９核酸構築物を含むベクターは、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤のいかなる成分も含まない（例えば、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含まず、ｇＲＮＡをコードする核酸を含まない）。いくつかのそのようなベクターは、標的ゲノム遺伝子座の標的部位に対応するホモロジーアームを含む。他のそのようなベクターは、いかなるホモロジーアームも含まない。

【０３８７】

いくつかのベクターは、環状であり得る。代替的に、ベクターは、直線状であり得る。ベクターは、脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、又はウイルスキャプシドを介して送達されるようにパッケージされ得る。非限定的な例示的なベクターとしては、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体、ミニ染色体、トランスポゾン、ウイルスベクター、及び発現ベクターが挙げられる。

【０３８８】

ベクターは、例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターなどのウイルスベクターであり得る。ＡＡＶは任意の好適な血清型であり得、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）又は自己相補的ＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）であり得る。他の例示的なウイルス／ウイルスベクターには、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、及び単純ヘルペスウイルスが含まれる。ウイルスは、分裂細胞、非分裂細胞、又は分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染し得る。ウイルスは、宿主ゲノムに組み込むことができるか、又は代替的に宿主ゲノムに組み込まない。このようなウイルスは、免疫力が低減するように操作することもできる。ウイルスは、複製可能であり得、複製欠損性（例えば、ビリオン複製及び／又はパッケージングの追加ラウンドに必要な１つ以上の遺伝子に欠損がある）であり得る。ウイルスは、一過性の発現、長期的な発現（例えば、少なくとも１週間、２週間、１ヶ月、２ヶ月、又は３ヶ月）、又は永続的な発現を引き起こし

得る。ウイルスベクターは、それらの野生型対応物から遺伝的に修飾され得る。例えば、ウイルスベクターは、クローニングを容易にするために、又はベクターの１つ以上の特性が変化するように、１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含み得る。そのような特性には、パッケージング容量、形質導入効率、免疫原性、ゲノム組み込み、複製、転写、及び翻訳が含まれ得る。いくつかの例では、ウイルスゲノムの一部は、ウイルスがより大きなサイズを有する外因性配列をパッケージングすることができるように欠失され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、増強された形質導入効率を有し得る。いくつかの例では、宿主においてウイルスによって誘導される免疫応答が低減され得る。いくつかの例では、宿主ゲノムへのウイルス配列の組み込みを促進するウイルス遺伝子（インテグラーゼなど）は、ウイルスが非組み込み型になるように変異され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、複製欠損性であり得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、ベクター上のコード配列の発現を駆動するための外因性転写又は翻訳制御配列を含み得る。いくつかの例では、ウイルスは、ヘルパー依存性であり得る。例えば、ウイルスは、ベクターを増幅してウイルス粒子にパッケージングするのに必要とされるウイルス成分（ウイルスタンパク質など）を供給するために、１つ以上のヘルパーウイルスを必要とし得る。そのような場合、ウイルス成分をコードする１つ以上のベクターを含む１つ以上のヘルパー成分が、本明細書に記載のベクター系とともに宿主細胞又は宿主細胞の集団に導入され得る。他の例では、ウイルスは、ヘルパーフリーであり得る。例えば、ウイルスは、ヘルパーウイルスなしでベクターを増幅及びパッケージングすることが可能であり得る。いくつかの例では、本明細書に記載のベクター系はまた、ウイルス増幅及びパッケージングに必要とされるウイルス成分をコードし得る。

【０３８９】

例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）は、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、及び10^{16}ベクターゲノム／ｍＬを含む。例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）としては、約10^{12}、約10^{13}、約10^{14}、約10^{15}及び約10^{16}のベクターゲノム（ｖｇ）／ｍＬ、又は約10^{12}～約10^{16}、約10^{12}～約10^{15}、約10^{12}～約10^{14}、約10^{12}～約10^{13}、約10^{13}～約10^{16}、約10^{14}～約10^{16}、約10^{15}～約10^{16}、若しくは約10^{13}～約10^{15}ｖｇ／ｍＬが挙げられる。他の例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）としては、約10^{12}、約10^{13}、約10^{14}、約10^{15}及び約10^{16}のベクターゲノム（ｖｇ）／ｋｇの体重、又は約10^{12}～約10^{16}、約10^{12}～約10^{15}、約10^{12}～約10^{14}、約10^{12}～約10^{13}、約10^{13}～約10^{16}、約10^{14}～約10^{16}、約10^{15}～約10^{16}、若しくは約10^{13}～約10^{15}ｖｇ／ｋｇの体重が挙げられる。一例では、ウイルス力価は、約10^{13}～約10^{14}ｖｇ／ｍＬ又はｖｇ／ｋｇである。別の例では、ウイルス力価は、約10^{12}～約10^{13}ｖｇ／ｍＬ又はｖｇ／ｋｇ（例えば、約10^{12}～約10^{13}ｖｇ／ｋｇ）である。別の例では、ウイルス力価は、約10^{12}～約10^{14}ｖｇ／ｍＬ又はｖｇ／ｋｇ（例えば、約10^{12}～約10^{14}ｖｇ／ｋｇ）である。例えば、ウイルス力価は、約１．５Ｅ１２～約１．５Ｅ１３ｖｇ／ｋｇであり得るか、約１．５Ｅ１２ｖｇ／ｋｇであり得るか、又は約１．５Ｅ１３ｖｇ／ｋｇであり得る。別の例では、ウイルス力価は、約２Ｅ１３ｖｇ／ｍＬ又はｖｇ／ｋｇである。

【０３９０】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、ヒト及び非ヒト霊長類（non-human primate、ＮＨＰ）を含む複数の種に固有である。現在までに、少なくとも１２種の天然血清型及び数百種の天然バリアントが単離され、特徴付けられている。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（２０２０）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．２１：２５５－２７２を参照されたい。ＡＡＶ粒子は、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）ゲノムを含有する非エンベロープ二十面体タンパク質キャプシドから天然に構成される。ＤＮＡゲノムには、ウイルスの複製起点及びパッケージングシグナルとして働く２つの逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接している。ｒｅｐ遺伝子は、ウイルス複製及びパッケージングに必要とされる４つのタンパク質をコードするが、ｃａｐ遺伝子は

、ＡＡＶ血清型を規定する３つの構造的キャプシドサブユニット、及びいくつかの血清型においてビリオンアセンブリを促進するアセンブリ活性化タンパク質（Ａｓｓｅｍｂｌｙ　Ａｃｔｉｖａｔｉｎｇ　Ｐｒｏｔｅｉｎ、ＡＡＰ）をコードする。

【０３９１】

組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）は、現在、治療用導入遺伝子を標的細胞にインビボで送達することによってヒト疾患を治療するための遺伝子療法において使用される最も一般的に使用されるウイルスベクターのうちの１つである。実際、ｒＡＡＶベクターは、天然のＡＡＶに類似した二十面体キャプシドから構成されるが、ｒＡＡＶビリオンは、ＡＡＶタンパク質コード配列又はＡＡＶ複製配列をキャプシド化しない。これらのウイルスベクターは非複製性である。ｒＡＡＶベクターにおいて必要とされる唯一のウイルス配列は、２つのＩＴＲであり、これらは、ｒＡＡＶベクターの製造中にゲノム複製及びパッケージングを誘導するために必要とされる。ｒＡＡＶゲノムは、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠いており、インビボでそれらを非複製性にする。ｒＡＡＶベクターは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を、ＡＡＶ　ＩＴＲに隣接する意図された導入遺伝子カセットと組み合わせて、追加のウイルスヘルパータンパク質とともにトランスで発現させることによって生成される。

【０３９２】

治療用ｒＡＡＶゲノムでは、遺伝子発現カセットは、ＩＴＲ配列の間に配置される。典型的には、ｒＡＡＶゲノムカセットは、治療用導入遺伝子の発現を駆動するためのプロモーター、続いてポリアデニル化配列を含む。ｒＡＡＶ発現カセットに隣接するＩＴＲは、通常、単離され、組換えウイルスベクターに変換される最初の血清型であるＡＡＶ２に由来する。それ以来、ほとんどのｒＡＡＶ生成方法は、ＡＡＶ２　Ｒｅｐベースのパッケージング系に依存している。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｃｏｌｅｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．８：８７－１０４を参照されたい。

【０３９３】

使用され得るＩＴＲのいくつかの非限定的な例には、配列番号１９６、配列番号１９７、又は配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＩＴＲが含まれる。ＩＴＲの他の例は、配列番号１９６、配列番号１９７、又は配列番号１９８と比較して１つ以上の変異を含み、配列番号１９６、配列番号１９７、又は配列番号１９８に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であり得る。本明細書に開示されるいくつかのｒＡＡＶゲノムでは、Ｆ９核酸構築物は、両側に同じＩＴＲ（すなわち、５’末端におけるＩＴＲ、及び３’末端におけるＩＴＲの逆相補体）が隣接している。一例では、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。別の例では、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９７を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。一例では、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、５’末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、３’末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。一例では、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、５’末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、３’末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。本明細書に開示される他のｒＡＡＶゲノムでは、Ｆ９核酸構築物は、各末端に異なるＩＴＲが隣接している。一例では、１つの末端におけるＩＴＲは、

配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり、他の末端におけるＩＴＲは、配列番号１９７を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。別の例では、１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり、他の末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９７を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり、他の末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【０３９４】

組換えＡＡＶベクターの特定の血清型は、特定の組織に対するそのインビボ指向性に影響を及ぼす。ＡＡＶキャプシドタンパク質は、標的細胞への付着及び侵入を仲介し、続いてエンドソーム脱出及び核への輸送を担う。したがって、ｒＡＡＶベクターを開発する場合の血清型の選択は、どの細胞型及び組織にベクターがインビボで注射された場合に結合及び形質導入する可能性が最も高いかに影響を与える。ｒＡＡＶ８を含むｒＡＡＶのいくつかの血清型は、マウス、ＮＨＰ及びヒトにおいて全身的に送達された場合、肝臓に形質導入することができる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．２１：２５５－２７２を参照されたい。

【０３９５】

核に入ると、ｓｓＤＮＡゲノムはビリオンから放出され、相補的ＤＮＡ鎖が合成されて二本鎖ＤＮＡ（double-stranded　DNA、ｄｓＤＮＡ）分子が生成される。二本鎖ＡＡＶゲノムは、それらのＩＴＲを介して自然に環状化し、染色体外で核内に存続するエピソームになる。したがって、エピソーム遺伝子療法プログラムのために、ｒＡＡＶ送達ｒＡＡＶエピソームは、非分裂細胞において長期のプロモーター駆動遺伝子発現を提供する。しかしながら、このｒＡＡＶ送達エピソームＤＮＡは、細胞が分裂するにつれて希釈される。対照的に、本明細書に記載の遺伝子療法は、長期の遺伝子発現を可能にする遺伝子挿入に基づく。

【０３９６】

特定の配列（例えば、特定の双方向性構築物配列又は特定の一方向性構築物配列）を含む特定のｒＡＡＶが本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示される双方向性又は一方向性構築物が仮定配列５’－ＣＴＧＧＡＣＣＧＡ－３’からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体（５’－ＴＣＧＧＴＣＣＡＧ－３’）を包含することを意味する。同様に、双方向性又は一方向性構築物要素を含むｒＡＡＶが特定の５’から３’への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。例えば、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１のコード配列、第１のターミネーター、第２のターミネーターの逆相補体、第２のコード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含む双方向性構築物を含むｒＡＡＶが本明細書に開示される場合、それはまた、５’から３’に、第２のスプライスアクセプター、第２のコード配列、第２のターミネーター、第１のターミネーターの逆相補体、第１のコード配列の逆相補体、及び第１のスプライスアクセプターの逆相補体を含む構築物を包含することを意味する。一本鎖ＡＡＶゲノムは、センス（プラス鎖）又はアンチセンス（マイナス鎖ゲノム）のいずれかとしてパッケージされ、＋及び－極性の一本鎖ＡＡＶゲノムは、等しい頻度で成熟ｒＡＡＶビリオンにパッケージされる。例えば、ＬＩＮＧ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．Ｍｅｄ．９（３）：１７５、Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１６（３）：４９４－４９９、及びＳａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６１：３０９６－３１０１を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０３９７】

ｓｓＤＮＡ　ＡＡＶゲノムは、２つのオープンリーディングフレーム、Ｒｅｐ及びＣａ

ｐからなり、相補的ＤＮＡ鎖の合成を可能にする２つの逆位末端反復が隣接している。ＡＡＶトランスファープラスミドを構築する場合、導入遺伝子は、２つのＩＴＲの間に配置され、Ｒｅｐ及びＣａｐは、トランスで供給され得る。Ｒｅｐ及びＣａｐに加えて、ＡＡＶはアデノウイルスからの遺伝子を含有するヘルパープラスミドを必要とする場合がある。これらの遺伝子（Ｅ４、Ｅ２ａ、及びＶＡ）はＡＡＶ複製を仲介する。例えば、トランスファープラスミド、Ｒｅｐ／Ｃａｐ、及びヘルパープラスミドをアデノウイルス遺伝子Ｅ１＋を含むＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトして、感染性ＡＡＶ粒子を生成することができる。代替的に、Ｒｅｐ、Ｃａｐ、及びアデノウイルスヘルパー遺伝子を組み合わせて単一のプラスミドとすることもできる。同様のパッケージングセル及び方法は、レトロウイルスなどの他のウイルスにも使用できる。

【０３９８】

ＡＡＶの複数の血清型が確認されている。これらの血清型は、感染する細胞の種類（すなわち、それらの指向性）が異なり、特定の細胞型の優先的な形質導入を可能にする。ＡＡＶという用語は、例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶｒｈ．６４Ｒ１、ＡＡＶｈｕ．３７、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．３２．３３、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ－ＤＪ、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶＬＫ０３、ＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、及びそれらのハイブリッド、トリＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、霊長類ＡＡＶ、非霊長類ＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶを含む。ＡＡＶの種々の血清型のゲノム配列、並びにネイティブ末端反復（terminal repeat、ＴＲ）、Ｒｅｐタンパク質、及びキャプシドサブユニットの配列は、当該技術分野で既知である。そのような配列は、文献又はＧｅｎＢａｎｋなどの公開データベースに見出すことができる。「ＡＡＶベクター」は、本明細書で使用される場合、ＡＡＶ起源ではない異種配列（すなわち、ＡＡＶに対して異種の核酸配列）を含むＡＡＶベクターを指し、典型的には、目的の異種ポリペプチドをコードする配列を含む。構築物は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶｒｈ．６４Ｒ１、ＡＡＶｈｕ．３７、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．３２．３３、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ－ＤＪ、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶＬＫ０３、ＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、及びそれらのハイブリッド、トリＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、霊長類ＡＡＶ、非霊長類ＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶキャプシド配列を含み得る。一般に、異種核酸配列（導入遺伝子）は、少なくとも１つ、及び一般に２つのＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）が隣接している。ＡＡＶベクターは、一本鎖（ｓｓＡＡＶ）又は自己相補的（ｓｃＡＡＶ）のいずれかであり得る。肝臓組織の血清型の例には、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ．７４、及びＡＡＶｈｕ．３７が含まれ、特にＡＡＶ８が含まれる。具体的な例では、核酸構築物を含むＡＡＶベクターは、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）であり得る。本明細書に記載のｒＡＡＶ８ベクターは、キャプシドがＡＡＶ８からのものであるベクターである。例えば、ＡＡＶ２からのＩＴＲ及びＡＡＶ８のキャプシドを使用するＡＡＶベクターは、本明細書においてｒＡＡＶ８ベクターであるとみなされる。

【０３９９】

指向性は、キャプシド及び異なるウイルス血清型からのゲノムの混合である偽型付けによって更に洗練することができる。例えば、ＡＡＶ２／５は、血清型５のキャプシドにパッケージされた血清型２のゲノムを含むウイルスを示す。偽型ウイルスの使用は、形質導入効率を改善するだけでなく、指向性を変えることができる。異なる血清型に由来するハイブリッドキャプシドを使用して、ウイルスの指向性を改変することもできる。例えば、ＡＡＶ－ＤＪは、８つの血清型からのハイブリッドキャプシドを含有しており、インビボで幅広い細胞型にわたって高い感染力を示す。ＡＡＶ－ＤＪ８は、ＡＡＶ－ＤＪの特性を示すが、脳への取り込みが増強された別の例である。ＡＡＶ血清型は、変異によっても修飾することができる。ＡＡＶ２の変異修飾の例には、Ｙ４４４Ｆ、Ｙ５００Ｆ、Ｙ７３０Ｆ、及びＳ６６２Ｖが含まれる。ＡＡＶ３の変異修飾の例には、Ｙ７０５Ｆ、Ｙ７３１Ｆ

、及びＴ４９２Ｖが含まれる。ＡＡＶ６の変異修飾の例には、Ｓ６６３Ｖ及びＴ４９２Ｖが含まれる。他の偽型／修飾ＡＡＶバリアントには、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／６、ＡＡＶ２／７、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／９、ＡＡＶ２．５、ＡＡＶ８．２、及びＡＡＶ／ＳＡＳＴＧが含まれる。

【０４００】

導入遺伝子の発現を加速するために、自己相補的ＡＡＶ（self-complementary AAV、ｓｃＡＡＶ）バリアントを使用することができる。ＡＡＶは細胞のＤＮＡ複製機構に依存して、ＡＡＶの一本鎖ＤＮＡゲノムの相補的鎖を合成するため、導入遺伝子の発現が遅れる可能性がある。この遅延に対処するために、感染時に自発的にアニーリングすることができる相補的配列を含むｓｃＡＡＶを使用することができ、宿主細胞のＤＮＡ合成の必要性を排除する。しかしながら、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターも使用できる。

【０４０１】

パッケージング容量を増加させるために、より長い導入遺伝子を、１つ目は３’スプライスドナー、２つ目は５’スプライスアクセプターである２つのＡＡＶトランスファープラスミドとの間に分割することができる。細胞の共感染時に、これらのウイルスはコンカテマー（concatemer）を形成し、一緒にスプライシングされ、完全長導入遺伝子を発現させることができる。これにより、より長い導入遺伝子の発現が可能になるが、発現の効率は低下する。容量を増加させるための同様の方法は、相同組換えを利用する。例えば、導入遺伝子は２つのトランスファープラスミドの間に分割することができるが、共発現が相同組換え及び完全長導入遺伝子の発現を誘導するように、実質的な配列の重複がある。

【０４０２】

ベクター（例えば、組換えＡＡＶ８などのＡＡＶ）は、例えば、１０ｍＭのリン酸ナトリウム、１８０ｍＭの塩化ナトリウム、及び０．００５％のポロキサマー１８８において、ｐＨ７．３で製剤化することができる。

【０４０３】

Ｂ．ヌクレアーゼ剤及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系

本明細書に開示される方法及び組成物は、本明細書に開示されるＦ９核酸構築物の挿入のために、クラスター化して規則的に散在する短い回文配列リピート（Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeat、ＣＲＩＳＰＲ）／ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）系、若しくは転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）系などのヌクレアーゼ剤、又はそのような系の成分を利用し、セーフハーバー遺伝子（例えば、ＡＬＢ）などの標的遺伝子内の標的ゲノム遺伝子座を修飾することができる。一般に、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位において二本鎖切断又はニック（すなわち、一本鎖切断）を誘導するための操作された切断系の使用を伴う。切断又はニッキングは、ヌクレアーゼ標的部位の特異的切断又はニッキングを誘導するための操作されたガイドＲＮＡを有する、操作されたＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系などの特異的ヌクレアーゼの使用を介して起こり得る。所望の標的配列においてニック又は二本鎖切断を誘導する任意のヌクレアーゼ剤を、本明細書に開示される方法及び組成物で使用することができる。ヌクレアーゼ剤を使用して、宿主ゲノム内の所望の遺伝子座（標的遺伝子）に挿入の部位を作製することができ、その部位にＦ９核酸構築物を挿入してＦＩＸを発現させる。ＦＩＸは、ＦＩＸが通常発現されないセーフハーバー遺伝子座などの、その挿入部位又は遺伝子座（標的遺伝子）に関して異種であり得る。代替的に、ＦＩＸは、欠損Ｆ９遺伝子を補正するための内因性Ｆ９遺伝子座への挿入などの、その挿入部位に関して非異種であってもよい。

【０４０４】

一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系である。別の例では、ヌクレアーゼ剤は、１つ以上のＺＦＮを含む。更に別の例では、ヌクレアーゼ剤は、１つ以上のＴＡＬＥＮを含む。具体的な例では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系又はそのような系の成分は、

細胞内のＡＬＢ遺伝子若しくは遺伝子座（例えば、ＡＬＢゲノム遺伝子座）、又は細胞内のＡＬＢ遺伝子若しくは遺伝子座のイントロン１を標的とする。より具体的な例では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系又はそのような系の成分は、細胞内のヒトＡＬＢ遺伝子若しくは遺伝子座又はヒトＡＬＢ遺伝子若しくは遺伝子座のイントロン１を標的とする。

【０４０５】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系には、Ｃａｓ遺伝子の発現に関与する、又はその活性を指示する転写物及び他の要素が含まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、例えば、タイプＩ、タイプＩＩ、タイプＩＩＩ系、又はタイプＶ系（例えば、サブタイプＶ－Ａ又はサブタイプＶ－Ｂ）であり得る。本明細書に開示される方法及び組成物は、核酸の部位特異的結合又は切断のためにＣＲＩＳＰＲ複合体（Ｃａｓタンパク質と複合体を形成したガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む）を利用することによってＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を用いることができる。ＡＬＢ遺伝子又は遺伝子座を標的とするＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、Ｃａｓタンパク質（又はＣａｓタンパク質をコードする核酸）及び１つ以上のガイドＲＮＡ（又は１つ以上のガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ）を含み、１つ以上のガイドＲＮＡの各々は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、ＡＬＢ遺伝子又は遺伝子座）内の異なるガイドＲＮＡ標的配列を標的とする。

【０４０６】

本明細書に開示される組成物及び方法で使用されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、天然に存在しなくてもよい。天然に存在しない系は、系の１つ以上の成分が、それらの天然に存在する状態から改変若しくは変異されている、それらが自然界で天然に関連する少なくとも１つの他の成分を少なくとも実質的に含まない、又はそれらが天然に関連しない少なくとも１つの他の成分と関連するなどの、ヒトの手の関与を示す任意のものを含む。例えば、いくつかのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、天然に存在しないｇＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を一緒に含む天然に存在しないＣＲＩＳＰＲ複合体を用いるか、天然に存在しないＣａｓタンパク質を用いるか、又は天然に存在しないｇＲＮＡを用いる。

【０４０７】

（１）標的ゲノム遺伝子座及びアルブミン（ＡＬＢ）

セーフハーバー遺伝子座（ＡＬＢなどのセーフハーバー遺伝子）又は内因性Ｆ９遺伝子座などの、遺伝子を発現することができる任意の標的ゲノム遺伝子座を使用することができる。核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座の任意の部分に組み込むことができる。例えば、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座のイントロン若しくはエキソンに挿入することができ、又は標的ゲノム遺伝子座の１つ以上のイントロン及び／若しくはエキソンを置き換えることができる。具体的な例では、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座の第１のイントロン（例えば、ＡＬＢイントロン１）などの、標的ゲノム遺伝子座のイントロンに組み込むことができる。例えば、国際公開第２０２０／０８２０４２号、米国特許出願公開第２０２０／０２７０６１７号、国際公開第２０２０／０８２０４１号、米国特許出願公開第２０２０／０２６８９０６号、国際公開第２０２０／０８２０４６号、及び米国特許出願公開第２０２０／０２８９６２８号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。標的ゲノム遺伝子座に組み込まれた構築物は、標的ゲノム遺伝子座において内因性プロモーター（例えば、内因性ＡＬＢプロモーター）に作動可能に連結され得る。

【０４０８】

組み込まれた外因性ＤＮＡと宿主ゲノムとの間の相互作用は、組み込みの信頼性及び安全性を制限する可能性があり、標的化遺伝子修飾によるものではなく、代わりに周囲の内因性遺伝子に対する組み込みの意図しない影響による明白な表現型効果をもたらす可能性がある。例えば、ランダムに挿入された導入遺伝子は、位置効果及びサイレンシングの影響を受けやすく、その発現が信頼できず、予測できないものになる可能性がある。同様に、外因性ＤＮＡの染色体遺伝子座への組み込みは、周囲の内因性遺伝子及びクロマチンに影響を及ぼし、それによって細胞の挙動及び表現型を変化させる可能性がある。セーフハーバー遺伝子座には、導入遺伝子又は他の外因性核酸インサートが、細胞の挙動又は表現

型を明白に変えることなく（すなわち、宿主細胞に有害な影響を与えることなく）、目的の全ての組織で安定かつ確実に発現できる染色体遺伝子座が含まれる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｓａｄｅｌａｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ１２：５１－５８を参照されたい。例えば、セーフハーバー遺伝子座は、挿入された遺伝子配列の発現が、隣接する遺伝子からのリードスルー発現によって乱されない遺伝子座であり得る。例えば、セーフハーバー遺伝子座には、内因性遺伝子の構造又は発現に悪影響を及ぼすことなく、外因性ＤＮＡが予測可能な方法で組み込まれて機能できる染色体遺伝子座を含めることができる。セーフハーバー遺伝子座には、遺伝子外領域又は遺伝子内領域、例えば、必須ではない、不要な、又は明白な表現型の結果なしに破壊できる遺伝子内の遺伝子座を含めることができる。

【０４０９】

このようなセーフハーバー遺伝子座は、全ての組織でオープンクロマチン構成を提供でき、胚発生中及び成体で遍在的に発現することができる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｚａｍｂｒｏｗｉｃｚ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．」９４：３７８９－３７９４を参照されたい。加えて、セーフハーバー遺伝子座を高効率で標的化することができ、セーフハーバー遺伝子座を明白な表現型を伴わずに破壊することができる。セーフハーバー遺伝子座の例には、ＡＬＢ、ＣＣＲ５、ＨＰＲＴ、ＡＡＶＳ１、及びＲｏｓａ２６が含まれる。例えば、米国特許第７，８８８，１２１号、同第７，９７２，８５４号、同第７，９１４，７９６号、同第７，９５１，９２５号、同第８，１１０，３７９号、同第８，４０９，８６１号、同第８，５８６，５２６号、並びに米国特許出願公開第２００３／０２３２４１０号、同第２００５／０２０８４８９号、同第２００５／００２６１５７号、同第２００６／００６３２３１号、同第２００８／０１５９９９６号、同第２０１０／００２１８２６４号、同第２０１２／００１７２９０号、同第２０１１／０２６５１９８号、同第２０１３／０１３７１０４号、同第２０１３／０１２２５９１号、同第２０１３／０１７７９８３号、同第２０１３／０１７７９６０号、及び同第２０１３／０１２２５９１号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０４１０】

具体的な例では、セーフハーバー遺伝子座は、ゲノム内の遺伝子座であり、遺伝子は、肝細胞などの宿主細胞に対する顕著な有害効果なしに（例えば、アポトーシス、壊死、及び／若しくは老化を引き起こすことなく、又は対照細胞と比較して５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、若しくは４０％を超えるアポトーシス、壊死、及び／若しくは老化を引き起こすことなく）挿入され得る。セーフハーバー遺伝子座は、肝細胞などの宿主細胞に対する顕著な有害効果なしに（例えば、アポトーシス、壊死、及び／若しくは老化を引き起こすことなく、又は対照細胞と比較して５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、若しくは４０％を超えるアポトーシス、壊死、及び／若しくは老化を引き起こすことなく）外因性遺伝子の過剰発現を可能にすることができる。望ましいセーフハーバー遺伝子座は、挿入された遺伝子配列の発現が、隣接する遺伝子からのリードスルー発現によって乱されない遺伝子座であり得る。セーフハーバーは、ヒトセーフハーバー（例えば、肝臓組織又は肝細胞宿主細胞について）であり得る。

【０４１１】

具体的な例では、標的ゲノム遺伝子座は、ＡＬＢ遺伝子座、例えば、ＡＬＢ遺伝子座のイントロン１である。より具体的な例では、標的ゲノム遺伝子座は、ヒトＡＬＢ遺伝子座、例えば、ヒトＡＬＢ遺伝子座のイントロン１である（例えば、配列番号４）。

【０４１２】

（２）Ｃａｓタンパク質

Ｃａｓタンパク質は一般に、ガイドＲＮＡと相互作用することができる少なくとも１つのＲＮＡ認識又は結合ドメインを含む。Ｃａｓタンパク質はまた、ヌクレアーゼドメイン（例えば、ＤＮａｓｅドメイン又はＲＮａｓｅドメイン）、ＤＮＡ結合ドメイン、ヘリカ

ーゼドメイン、タンパク質－タンパク質相互作用ドメイン、二量体化ドメイン、及び他のドメインを含み得る。いくつかのそのようなドメイン（例えば、ＤＮａｓｅドメイン）は、天然のＣａｓタンパク質からのものであり得る。他のそのようなドメインを追加して、修飾Ｃａｓタンパク質を作製することができる。ヌクレアーゼドメインは、核酸分子の共有結合の切断を含む、核酸切断に対する触媒活性を有する。切断は平滑末端又は付着末端を生成することができ、一本鎖又は二本鎖であってもよい。例えば、野生型Ｃａｓ９タンパク質は、典型的には、平滑切断産物を作製する。代替的に、野生型Ｃｐｆ１タンパク質（例えば、ＦｎＣｐｆ１）は、非標的化鎖におけるＰＡＭ配列から１８番目の塩基対の後及び標的化鎖における２３番目の塩基の後に切断が生じる、５－ヌクレオチドの５’オーバーハングを有する切断産物をもたらし得る。Ｃａｓタンパク質は、完全な切断活性を有し、標的ゲノム遺伝子座で二本鎖切断を作製することができるか（例えば、平滑末端を持つ二本鎖切断）、又はそれは、標的ゲノム遺伝子座で一本鎖切断を作製するニッカーゼであってもよい。

【０４１３】

Ｃａｓタンパク質の例には、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ５ｅ（ＣａｓＤ）、Ｃａｓ６、Ｃａｓ６ｅ、Ｃａｓ６ｆ、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８ａ１、Ｃａｓ８ａ２、Ｃａｓ８ｂ、Ｃａｓ８ｃ、Ｃａｓ９（Ｃｓｎ１又はＣｓｘ１２）、Ｃａｓ１０、Ｃａｓ１０ｄ、ＣａｓＦ、ＣａｓＧ、ＣａｓＨ、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１（ＣａｓＡ）、Ｃｓｅ２（ＣａｓＢ）、Ｃｓｅ３（ＣａｓＥ）、Ｃｓｅ４（ＣａｓＣ）、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４、及びＣｕ１９６６、並びにそれらのホモロジー又は修飾バージョンが含まれる。

【０４１４】

例示的なＣａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質又はＣａｓ９タンパク質に由来するタンパク質である。Ｃａｓ９タンパク質は、タイプＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系からのものであり、典型的には、保存されたアーキテクチャを有する４つの重要なモチーフを共有する。モチーフ１、２、及び４はＲｕｖＣ様モチーフであり、モチーフ３はＨＮＨモチーフである。例示的なＣａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ、Ｎｏｃａｒｄｉｏｐｓｉｓ ｄａｓｓｏｎｖｉｌｌｅｉ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｐｒｉｓｔｉｎａｅｓｐｉｒａｌｉｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ、Ｓｔｒｅｐｔｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ、Ａｌｉｃｙｃｌｏｂａｃｉｌｌｕｓ ａｃｉｄｏｃａｌｄａｒｉｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｓｅｕｄｏｍｙｃｏｉｄｅｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｅｌｅｎｉｔｉｒｅｄｕｃｅｎｓ、Ｅｘｉｇｕｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｉｂｉｒｉｃｕｍ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓａｌｉｖａｒｉｕｓ、Ｍｉｃｒｏｓｃｉｌｌａ ｍａｒｉｎａ、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａｌｅｓ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐｏｌａｒｏｍｏｎａｓ ｎａｐｈｔｈａｌｅｎｉｖｏｒａｎｓ、Ｐｏｌａｒｏｍｏｎａｓ ｓｐ．、Ｃｒｏｃｏｓｐｈａｅｒａ ｗａｔｓｏｎｉｉ、Ｃｙａｎｏｔｈｅｃｅ ｓｐ．、Ｍｉｃｒｏｃｙｓｔｉｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ａｃｅｔｏｈａｌｏｂｉｕｍ ａｒａｂａｔｉｃｕｍ、Ａｍｍｏｎｉｆｅｘ ｄｅｇｅｎｓｉｉ、Ｃａｌｄｉｃｅｌｕｌｏｓｉｒｕｐｔｏｒ ｂｅｃｓｃｉｉ、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｄｅｓｕｌｆｏｒｕｄｉｓ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ、Ｆｉｎｅｇｏｌｄｉａ ｍａｇｎａ、Ｎａｔｒａｎａｅｒｏｂｉｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｅｌｏｔｏｍａｃｕｌｕｍ ｔｈｅｒｍｏｐｒｏｐｉｏｎｉｃｕｍ、Ａｃｉｄｉｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｃ

aldus、Acidithiobacillus ferrooxidans、Allochromatium vinosum、Marinobacter sp.、Nitrosococcus halophilus、Nitrosococcus watsoni、Pseudoalteromonas haloplanktis、Ktedonobacter racemifer、Methanohalobium evestigatum、Anabaena variabilis、Nodularia spumigena、Nostoc sp.、Arthrospira maxima、Arthrospira platensis、Arthrospira sp.、Lyngbya sp.、Microcoleus chthonoplastes、Oscillatoria sp.、Petrotoga mobilis、Thermosipho africanus、Acaryochloris marina、Neisseria meningitidis、又はCampylobacter jejuniからのものである。Cas9ファミリーメンバーの追加の例は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１４／１３１８３３号に記載されている。S.pyogenesからのCas9（SpCas9）（例えば、UniProtアクセッション番号Q99ZW2が割り当てられている）は、例示的なCas9タンパク質である。例示的なSpCas9タンパク質配列は、配列番号８に示されている（配列番号９に示されるDNA配列によってコードされる）。例示的なSpCas9 mRNA（cDNA）は、配列番号１０に示されている。より小さなCas9タンパク質（例えば、SaCas9及びCjCas9及びNme2Cas9などのCas9及びガイドRNAのガイドRNAコード配列及び調節エレメントと組み合わせた場合にそのコード配列が最大AAVパッケージング容量と互換性があるCas9タンパク質）は、他の例示的なCas9タンパク質である。例えば、S.aureusからのCas9（SaCas9）（例えば、UniProtアクセッション番号J7RUA5が割り当てられている）は、別の例示的なCas9タンパク質である。同様に、Campylobacter jejuniからのCas9（CjCas9）（例えば、UniProtアクセッション番号Q0P897が割り当てられている）は、別の例示的なCas9タンパク質である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kim et al.（２０１７）Nat.Commun.8：１４５００を参照されたい。SaCas9は、SpCas9よりも小さく、CjCas9は、SaCas9及びSpCas9の両方よりも小さい。Neisseria meningitidis由来のCas9（Nme2Cas9）は、別の例示的なCas9タンパク質である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Edraki et al.（２０１９）Mol.Cell ７３（４）：７１４－７２６を参照されたい。Streptococcus thermophilusからのCas9タンパク質（例えば、CRISPR1遺伝子座（St1Cas9）によってコードされるStreptococcus thermophilus LMD－9 Cas9又はCRISPR3遺伝子座（St3Cas9）からのStreptococcus thermophilus Cas9）は、他の例示的なCas9タンパク質である。Francisella noviciidaからのCas9（FnCas9）又は代替PAM（E１３６９R／E１４４９H／R１５５６A置換）を認識するRHA Francisella novicida Cas9バリアントは、他の例示的なCas9タンパク質である。これら及び他の例示的なCas9タンパク質は、例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Cebrian－Serrano and Davies（２０１７）Mamm.Genome ２８（７）：２４７－２６１で概説されている。Cas9コード配列、Cas9 mRNA、及びCas9タンパク質配列の例は、国際公開第２０１３／１７６７７２号、国際公開第２０１４／０６５５９６号、国際公開第２０１６／１０６１２１号、国際公開第２０１９／０６７９１０号、国際公開第２０２０／０８２０４２号、米国特許出願公開第２０２０／０２７０６１７号、国際公開第２０２０／０８２０４１号、米国特許出願公開２０２０／０２６８９０６号、国際公開第２０２０／０８２０４６号、及び米国特許出願公開

２０２０／０２８９６２８号に提供されており、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ＯＲＦ及びＣａｓ９アミノ酸配列の具体的な例は、表３０の段落［０４４９］国際公開第２０１９／０６７９１０号に提供され、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びＯＲＦの具体的な例は、国際公開第２０１９／０６７９１０号の段落［０２１４］～［０２３４］に提供される。また、国際公開第２０２０／０８２０４６（Ａ２）号（ｐｐ．８４－８５）、及び国際公開第２０２０／０６９２９６号における表２４も参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。例示的なＳｐＣａｓ９タンパク質配列は、配列番号１１を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。ＳｐＣａｓ９タンパク質配列をコードする例示的なＳｐＣａｓ９　ｍＲＮＡ配列は、配列番号１２を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。ＳｐＣａｓ９タンパク質配列をコードする別の例示的なＳｐＣａｓ９　ｍＲＮＡ配列は、配列番号２２５を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。ＳｐＣａｓ９タンパク質配列をコードする別の例示的なＳｐＣａｓ９　ｍＲＮＡ配列は、配列番号２２６を含む。例示的なＳｐＣａｓ９コード配列は、配列番号２２７を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【０４１５】

Ｃａｓタンパク質の別の例は、Ｃｐｆ１（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ及びＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ１由来のＣＲＩＳＰＲ）タンパク質である。Ｃｐｆ１は、Ｃａｓ９の対応するドメインに相同なＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインを、Ｃａｓ９の特徴的なアルギニンに富むクラスターの対応物とともに含有する大きなタンパク質（約１３００のアミノ酸）である。しかしながら、Ｃｐｆ１は、Ｃａｓ９タンパク質に存在するＨＮＨヌクレアーゼドメインを欠いており、ＨＮＨドメインを含む長い挿入を含有するＣａｓ９とは対照的に、ＲｕｖＣ様ドメインは、Ｃｐｆ１配列において連続している。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｃｅｌｌ１６３（３）：７５９－７７１を参照されたい。例示的なＣｐｆ１タンパク質は、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ　１、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ　ｓｕｂｓｐ．ｎｏｖｉｃｉｄａ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ａｌｂｅｎｓｉｓ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＭＣ２０１７　１、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ　ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ、Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３３＿１０、Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＧＷ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７、Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ　ｓｐ．ＳＣＡＤＣ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＭＡ２０２０、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ　Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ　ｔｅｒｍｉｔｕｍ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｅｌｉｇｅｎｓ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ　ｂｏｖｏｃｕｌｉ　２３７、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ　ｉｎａｄａｉ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＤ２００６、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ　３、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｄｉｓｉｅｎｓ、及びＰｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｍａｃａｃａｅからのものである。Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ　Ｕ１１２由来のＣｐｆ１（ＦｎＣｐｆ１、割り当てられたＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ａ０Ｑ７Ｑ２）は、例示的なＣｐｆ１タンパク質である。

【０４１６】

Ｃａｓタンパク質の別の例は、ＣａｓＸ（Ｃａｓ１２ｅ）である。ＣａｓＸは、ＤＮＡ中に付着二本鎖切断を生成するＲＮＡ誘導型ＤＮＡエンドヌクレアーゼである。ＣａｓＸは、１０００未満のアミノ酸のサイズである。例示的なＣａｓＸタンパク質は、Ｄｅｌｔａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ（ＤｐｂＣａｓＸ又はＤｐｂＣａｓ１２ｅ）及びＰｌａｎｃｔｏｍｙｃｅｔｅｓ（ＰｌｍＣａｓＸ又はＰｌｍＣａｓ１２ｅ）からのものである。Ｃｐｆ１と同様に、ＣａｓＸは、ＤＮＡ切断のために単一のＲｕｖＣ活性部位を使用する。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１９）Ｎａｔｕｒｅ　５６６（７７４３）：２１８－２２３を参照さ

れたい。

【０４１７】

Ｃａｓタンパクの別の例は、ＣａｓΦ（ＣａｓＰｈｉ又はＣａｓ１２ｊ）であり、これはバクテリオファージにおいて特有に見出される。ＣａｓΦは、１０００未満のアミノ酸のサイズ（例えば、７００～８００のアミノ酸）である。ＣａｓΦ切断は、付着５’オーバーハングを生成する。ＣａｓΦにおける単一のＲｕｖＣ活性部位は、ｃｒＲＮＡプロセシング及びＤＮＡ切断が可能である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｐａｕｓｃｈ ｅｔ ａｌ．（２０２０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３６９（６５０１）：３３３－３３７を参照されたい。

【０４１８】

Ｃａｓタンパク質は、野生型タンパク質（すなわち、自然界で発生するもの）、修飾Ｃａｓタンパク質（すなわち、Ｃａｓタンパク質バリアント）、又は野生型若しくは修飾Ｃａｓタンパク質の断片であり得る。Ｃａｓタンパク質はまた、野生型又は修飾Ｃａｓタンパク質の触媒活性に関して、活性なバリアント又は断片であり得る。触媒活性に関する活性なバリアント又は断片は、野生型若しくは修飾Ｃａｓタンパク質又はその一部に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又はそれ以上の配列同一性を含み得、活性なバリアントは、所望の切断部位で切断する能力を保持し、したがってニック誘導又は二本鎖切断誘導活性を保持する。ニック誘導又は二本鎖切断誘導活性のためのアッセイは既知であり、一般に、切断部位を含有するＤＮＡ基質上のＣａｓタンパク質の全体的な活性及び特異性を測定する。

【０４１９】

改変されたＣａｓタンパク質の一例は、改変されたＳｐＣａｓ９－ＨＦ１タンパク質であり、これは、非特異的ＤＮＡ接触を減らすように設計された改変（Ｎ４９７Ａ／Ｒ６６１Ａ／Ｑ６９５Ａ／Ｑ９２６Ａ）を有するＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９の忠実度の高いバリアントである。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１６）Ｎａｔｕｒｅ ５２９（７５８７）：４９０－４９５を参照されたい。修飾Ｃａｓタンパク質の別の例は、オフターゲット効果を低減させるように設計された修飾ｅＳｐＣａｓ９バリアント（Ｋ８４８Ａ／Ｋ１００３Ａ／Ｒ１０６０Ａ）である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｌａｙｍａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１６）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３５１（６２６８）：８４－８８を参照されたい。他のＳｐＣａｓ９バリアントには、Ｋ８５５Ａ及びＫ８１０Ａ／Ｋ１００３Ａ／Ｒ１０６０Ａが含まれる。これら及びその他の改変Ｃａｓタンパク質は、例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｃｅｂｒｉａｎ－Ｓｅｒｒａｎｏ ａｎｄ Ｄａｖｉｅｓ（２０１７）Ｍａｍｍ．Ｇｅｎｏｍｅ ２８（７）：２４７－２６１で概説されている。修飾Ｃａｓ９タンパク質の別の例は、ｘＣａｓ９であり、これは拡大された範囲のＰＡＭ配列を認識することができるＳｐＣａｓ９バリアントである。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｈｕ ｅｔ ａｌ．（２０１８）Ｎａｔｕｒｅ ５５６：５７－６３を参照されたい。

【０４２０】

Ｃａｓタンパク質は、核酸結合親和性、核酸結合特異性、及び酵素活性のうちの１つ以上を増加又は減少させるように修飾することができる。Ｃａｓタンパク質は、安定性などの、タンパク質の他の活性又は特性を変更するように修飾することもできる。例えば、Ｃａｓタンパク質の１つ以上のヌクレアーゼドメインを修飾、欠失、又は不活性化することができるか、あるいはＣａｓタンパク質を短縮して、タンパク質の機能に必須ではないドメインを除去するか、又はＣａｓタンパク質の活性若しくは特性を最適化（例えば、増強又は低減）することができる。

【０４２１】

Ｃａｓタンパク質は、ＤＮａｓｅドメインなどの少なくとも１つのヌクレアーゼドメイ

ンを含み得る。例えば、野生型Ｃｐｆ１タンパク質は、一般に、おそらく二量体立体配座で、標的ＤＮＡの両方の鎖を切断するＲｕｖＣ様ドメインを含む。同様に、ＣａｓＸ及びＣａｓΦは、一般に、標的ＤＮＡの両方の鎖を切断する単一のＲｕｖＣ様ドメインを含む。Ｃａｓタンパク質はまた、ＤＮａｓｅドメインなどの少なくとも２つのヌクレアーゼドメインを含み得る。例えば、野生型Ｃａｓ９タンパク質は、一般に、ＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメイン及びＨＮＨ様ヌクレアーゼドメインを含む。ＲｕｖＣドメイン及びＨＮＨドメインは各々、二本鎖ＤＮＡの異なる鎖を切断して、ＤＮＡに二本鎖切断を行うことができる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３７（６０９６）：８１６－８２１を参照されたい。

【０４２２】

ヌクレアーゼドメインの１つ又は複数を欠失又は変異させ、その結果、それらが、もはや機能的でないか、又は低減したヌクレアーゼ活性を有する場合がある。例えば、Ｃａｓ９タンパク質でヌクレアーゼドメインのうちの１つが欠失又は変異している場合、得られるＣａｓ９タンパク質はニッカーゼと称され得、二本鎖標的ＤＮＡ内で一本鎖切断を生成できるが、二本鎖切断は生成できない（すなわち、相補的鎖又は非相補的鎖を切断することができるが、両方を切断することはできない）。Ｃａｓ９タンパク質でヌクレアーゼドメインのいずれも欠失又は変異していない場合、Ｃａｓ９タンパク質は二本鎖切断誘導活性を保持する。Ｃａｓ９をニッカーゼに変換する変異の例は、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９のＲｕｖＣドメインにおけるＤ１０Ａ（Ｃａｓ９の位置１０におけるアラニンからアスパラギン酸への）変異である。同様に、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９のＨＮＨドメインにおけるＨ９３９Ａ（アミノ酸位置８３９におけるヒスチジンからアラニンへ）、Ｈ８４０Ａ（アミノ酸位置８４０におけるヒスチジンからアラニン）、又はＮ８６３Ａ（アミノ酸位置Ｎ８６３におけるアスパラギンからアラニン）は、Ｃａｓ９をニッカーゼに変換することができる。Ｃａｓ９をニッカーゼに変換する変異の他の例としては、Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来のＣａｓ９に対する対応する変異が挙げられる。例えば、Ｓａｐｒａｎａｕｓｋａｓ ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３９（２１）：９２７５－９２８２及び国際公開第２０１３／１４１６８０号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような変異は、部位特異的変異誘発、ＰＣＲ媒介変異誘発、又は全遺伝子合成などの方法を使用して生成することができる。ニッカーゼを作製する他の変異の例は、例えば、国際公開第２０１３／１７６７７２号及び国際公開第２０１３／１４２５７８号に見出すことができ、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０４２３】

ｘＣａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化変異の例は、ＳｐＣａｓ９について上に記載されるものと同じである。Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９タンパク質の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も公知である。例えば、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９酵素（ＳａＣａｓ９）は、位置Ｎ５８０での置換（例えば、Ｎ５８０Ａ置換）又は位置Ｄ１０での置換（例えば、Ｄ１０Ａ置換）を含み得、Ｃａｓニッカーゼを生成する。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０１６／１０６２３６号を参照されたい。Ｎｍｅ２Ｃａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、Ｄ１６Ａ又はＨ５８８Ａ）。Ｓｔ１Ｃａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、Ｄ９Ａ、Ｄ５９８Ａ、Ｈ５９９Ａ、又はＮ６２２Ａ）。Ｓｔ３Ｃａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、Ｄ１０Ａ又はＮ８７０Ａ）。ＣｊＣａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、Ｄ８Ａ又はＨ５５９Ａの組み合わせ）。ＦｎＣａｓ９及びＲＨＡ ＦｎＣａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、Ｎ９９５Ａ）。

【０４２４】

Ｃｐｆ１タンパク質の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である。Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｕ１１２（ＦｎＣｐｆ１）、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６（ＡｓＣｐｆ１）、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ細菌ＮＤ２００６（ＬｂＣｐｆ１）、及びＭｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７（ＭｂＣｐｆ１ Ｃｐｆ１）由来のＣｐｆ１タンパク質に関して、そのような変異は、ＡｓＣｐｆ１の位置９０８、９９３又は１２６３あるいはＣｐｆ１オルソログ中の対応する位置、あるいはＬｂＣｐｆ１の位置８３２、９２５、９４７又は１１８０あるいはＣｐｆ１オルソログ中の対応する位置における変異を含むことができる。そのような変異は、例えば、ＡｓＣｐｆ１の変異Ｄ９０８Ａ、Ｅ９９３Ａ、及びＤ１２６３Ａ若しくはＣｐｆ１オルソログにおける対応する変異、又はＬｂＣｐｆ１のＤ８３２Ａ、Ｅ９２５Ａ、Ｄ９４７Ａ、及びＤ１１８０Ａ若しくはＣｐｆ１オルソログにおける対応する変異のうちの１つ以上を含み得る。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１６／０２０８２４３号を参照されたい。

【０４２５】

ＣａｓＸタンパク質の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である。ＤｅｌｔａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａからのＣａｓＸタンパク質に関して、Ｄ６７２Ａ、Ｅ７６９Ａ、及びＤ９３５Ａ（個々に又は組み合わせて）又は他のＣａｓＸオルソログにおける対応する位置は、不活性化されている。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．（２０１９）Ｎａｔｕｒｅ ５６６（７７４３）：２１８－２２３を参照されたい。

【０４２６】

ＣａｓΦタンパク質の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である。例えば、Ｄ３７１Ａ及びＤ３９４Ａは、単独で又は組み合わせて、不活性化変異である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｐａｕｓｃｈ ｅｔ ａｌ．（２０２０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３６９（６５０１）：３３３－３３７を参照されたい。

【０４２７】

Ｃａｓタンパク質はまた、融合タンパク質として異種ポリペプチドに作動可能に連結することができる。例えば、Ｃａｓタンパク質を切断ドメインに融合させることができる。全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１４／０８９２９０号を参照されたく、Ｃａｓタンパク質はまた、安定性の増加又は減少を提供する異種ポリペプチドに融合させることができる。融合ドメイン又は異種ポリペプチドは、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＣａｓタンパク質内に内部的に位置し得る。

【０４２８】

一例として、Ｃａｓタンパク質は、細胞内局在化を提供する１つ以上の異種ポリペプチドに融合させることができる。そのような異種ポリペプチドは、例えば、核を標的とするための単一部分ＳＶ４０ ＮＬＳ及び／又は二部分アルファインポーチンＮＬＳなどの１つ以上の核局在化シグナル（ＮＬＳ）、ミトコンドリアを標的とするためのミトコンドリア局在化シグナル、ＥＲ保持シグナルなどを含み得る。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｌａｎｇｅ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８２（８）：５１０１－５１０５を参照されたい。そのような細胞内局在化シグナルは、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＣａｓタンパク質内のどこにでも位置することができる。ＮＬＳは、一続きの塩基性アミノ酸を含むことができ、単一部分配列又は二部分配列であり得る。任意選択的に、Ｃａｓタンパク質は、Ｎ末端にＮＬＳ（例えば、アルファインポーチンＮＬＳ又は単一部分ＮＬＳ）及びＣ末端にＮＬＳ（例えば、ＳＶ４０ ＮＬＳ又は二部分ＮＬＳ）を含む２つ以上のＮＬＳを含み得る。Ｃａｓタンパク質はまた、Ｎ末端に２つ以上のＮＬＳ及び／又はＣ末端に２つ以上のＮＬＳを含み得る。

【０４２９】

Ｃａｓタンパク質は、例えば、１～１０個のＮＬＳと融合され得る（例えば、１～５つ

のＮＬＳと融合されるか、１つのＮＬＳと融合され得る。１つのＮＬＳが使用される場合、ＮＬＳは、Ｃａｓタンパク質配列のＮ末端又はＣ末端で連結され得る。ＮＬＳはまた、Ｃａｓタンパク質配列内に挿入され得る。代替的に、Ｃａｓタンパク質は、２つ以上のＮＬＳと融合され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、２、３、４、又は５つのＮＬＳと融合され得る。具体的な例では、Ｃａｓタンパク質は、２つのＮＬＳと融合され得る。ある特定の状況では、２つのＮＬＳは、同じ（例えば、２つのＳＶ４０　ＮＬＳ）又は異なり得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、カルボキシ末端で連結された２つのＳＶ４０　ＮＬＳ配列に融合され得る。代替的に、Ｃａｓタンパク質は、２つのＮＬＳと融合され得、１つはＮ末端で、１つはＣ末端で連結されている。他の例では、Ｃａｓタンパク質は、３つのＮＬＳと融合され得るか、又はＮＬＳなしで融合され得る。ＮＬＳは、例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳ、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号１３）又はＰＫＫＫＲＲＶ（配列番号１４）などの単一部分配列であり得る。ＮＬＳは、ヌクレオプラスミンのＮＬＳ、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号１５）などの二部分配列であり得る。具体的な例では、単一のＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号１３）ＮＬＳは、Ｃａｓタンパク質のＣ末端に連結され得る。１つ以上のリンカーは、融合部位に任意選択的に含まれる。

【０４３０】

Ｃａｓタンパク質はまた、細胞透過性ドメイン又はタンパク質導入ドメインに作動可能に連結することができる。例えば、細胞透過性ドメインは、ＨＩＶ－１　ＴＡＴタンパク質、ヒトＢ型肝炎ウイルスからのＴＬＭ細胞透過性モチーフ、ＭＰＧ、Ｐｅｐ－１、ＶＰ２２、単純ヘルペスウイルスからの細胞透過性ペプチド、又はポリアルギニンペプチド配列に由来することができる。例えば、国際公開第２０１４／０８９２９０号及び国際公開第２０１３／１７６７７２号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。細胞透過性ドメインは、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＣａｓタンパク質内のどこにでも位置することができる。

【０４３１】

Ｃａｓタンパク質はまた、追跡又は精製を容易にするために、蛍光タンパク質、精製タグ、又はエピトープタグなどの異種ポリペプチドに作動可能に連結することができる。蛍光タンパク質の例には、緑色蛍光タンパク質（例えば、ＧＦＰ、ＧＦＰ－２、ｔａｇＧＦＰ、ｔｕｒｂｏＧＦＰ、ｅＧＦＰ、Ｅｍｅｒａｌｄ、Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、ＣｏｐＧＦＰ、ＡｃｅＧＦＰ、ＺｓＧｒｅｅｎｌ）、黄色蛍光タンパク質（例えば、ＹＦＰ、ｅＹＦＰ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、ＰｈｉＹＦＰ、ＺｓＹｅｌｌｏｗｌ）、青色蛍光タンパク質（例えば、ｅＢＦＰ、ｅＢＦＰ２、Ａｚｕｒｉｔｅ、ｍＫａｌａｍａｌ、ＧＦＰｕｖ、Ｓａｐｐｈｉｒｅ、Ｔ－ｓａｐｐｈｉｒｅ）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ｅＣＦＰ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、ＣｙＰｅｔ、ＡｍＣｙａｎｌ、Ｍｉｄｏｒｉｉｓｈｉ－Ｃｙａｎ）、赤色蛍光タンパク質（例えば、ｍＫａｔｅ、ｍＫａｔｅ２、ｍＰｌｕｍ、ＤｓＲｅｄ単量体、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲＦＰ１、ＤｓＲｅｄ－Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＤｓＲｅｄ２、ＤｓＲｅｄ－Ｍｏｎｏｍｅｒ、ＨｃＲｅｄ－Ｔａｎｄｅｍ、ＨｃＲｅｄｌ、ＡｓＲｅｄ２、ｅｑＦＰ６１１、ｍＲａｓｐｂｅｒｒｙ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊｒｅｄ）、オレンジ色蛍光タンパク質（例えば、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ｔｄＴｏｍａｔｏ）、及び任意の他の好適な蛍光タンパク質が含まれる。タグの例には、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（glutathione-S-transferase、ＧＳＴ）、キチン結合タンパク質（chitin binding protein、ＣＢＰ）、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン（thioredoxin、ＴＲＸ）、ポリ（ＮＡＮＰ）、タンデムアフィニティー精製（tandem affinity purification、ＴＡＰ）タグ、ｍｙｃ、ＡｃＶ５、ＡＵ１、ＡＵ５、Ｅ、ＥＣＳ、Ｅ２、ＦＬＡＧ、ヘマグルチニン（hemagglutinin、ＨＡ）、ｎｕｓ、Ｓｏｆｔａｇ１、Ｓｏｆｔａｇ　３、Ｓｔｒｅｐ、ＳＢＰ、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ、ＨＳＶ、ＫＴ３、Ｓ、Ｓ１、Ｔ７、Ｖ５、ＶＳＶ－Ｇ、ヒスチジン（histidine、Ｈｉｓ）、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（biotin carboxyl carrier protein、ＢＣＣＰ）、及びカ

ルモジュリンが含まれる。

【０４３２】

Ｃａｓタンパク質はまた、標識された核酸に係留され得る。そのような係留（すなわち、物理的連結）は、共有相互作用若しくは非共有相互作用を介して達成することができ、係留は、直接（例えば、タンパク質又はインテイン修飾上のシステイン又はリジン残基の修飾によって達成することができる直接融合又は化学的結合を介して）、又はストレプトアビジン若しくはアプタマーなどの１つ以上の介在するリンカー又はアダプター分子を介して達成することができる。例えば、Ｐｉｅｒｃｅ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｍｉｎｉ Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．５（１）：４１－５５、Ｄｕｃｋｗｏｒｔｈ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．４６（４６）：８８１９－８８２２、Ｓｃｈａｅｆｆｅｒ ａｎｄ Ｄｉｘｏｎ（２００９）Ａｕｓｔｒａｌｉａｎ Ｊ．Ｃｈｅｍ．６２（１０）：１３２８－１３３２、Ｇｏｏｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２００９）Ｃｈｅｍｂｉｏｃｈｅｍ．１０（９）：１５５１－１５５７、及びＫｈａｔｗａｎｉ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２０（１４）：４５３２－４５３９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。タンパク質－核酸コンジュゲートを合成するための非共有戦略には、ビオチン－ストレプトアビジン及びニッケル－ヒスチジン法が含まれる。共有結合タンパク質－核酸コンジュゲートは、様々な化学物質を使用して適切に機能化された核酸とタンパク質を接続することによって合成できる。これらの化学物質のいくつかは、タンパク質表面のアミノ酸残基（例えば、リジンアミン又はシステインチオール）へのオリゴヌクレオチドの直接結合を含むが、他のより複雑なスキームは、タンパク質の翻訳後修飾又は触媒若しくは反応性タンパク質ドメインの関与を必要とする。タンパク質の核酸への共有結合の方法には、例えば、オリゴヌクレオチドのタンパク質リジン又はシステイン残基への化学的架橋、発現されたタンパク質ライゲーション、化学酵素的方法、及び光アプタマーの使用が含まれ得る。標識された核酸は、ＣａｓタンパクのＣ末端、Ｎ末端、又は内部領域に係留され得る。一例では、標識された核酸は、ＣａｓタンパクのＣ末端又はＮ末端に係留される。同様に、Ｃａｓタンパク質は、標識された核酸の５’末端、３’末端、又は内部領域に係留され得る。すなわち、標識された核酸は、任意の向き及び極性で係留され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、標識された核酸の５’末端又は３’末端に係留され得る。

【０４３３】

Ｃａｓタンパク質は、任意の形態で提供され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、ｇＲＮＡと複合体を形成したＣａｓタンパク質などのタンパク質の形態で提供され得る。代替的に、Ｃａｓタンパク質は、ＲＮＡ（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））又はＤＮＡなどの、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸の形態で提供され得る。任意選択的に、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞又は生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、細菌細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、又は任意の他の目的の宿主細胞においてより頻度高く使用される代替コドンへと修飾され得る。Ｃａｓタンパク質をコードする核酸が細胞に導入されると、Ｃａｓタンパク質は、一過性に、条件付きで、又は構成的に細胞内で発現され得る。

【０４３４】

Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、細胞のゲノムに安定して組み込まれ、細胞内で活性のあるプロモーターに作動可能に連結され得る。代替的に、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、発現構築物中のプロモーターに作動可能に連結され得る。発現構築物は、遺伝子又は他の目的の核酸配列（例えば、Ｃａｓ遺伝子）の発現を指示することができ、そのような目的の核酸配列を標的細胞に移入し得る任意の核酸構築物を含む。例えば、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡを含むベクター内に存在してもよい。代替的に、それは、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡを含むベクターとは別個

であるベクター又はプラスミド内にあり得る。発現構築物で使用され得るプロモーターには、例えば、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、多能性細胞、胚性幹（embryonic stem、ＥＳ）細胞、成体幹細胞、発達的に制限された前駆細胞、誘導多能性幹（induced pluripotent stem、ｉＰＳ）細胞、又は１細胞期胚のうちの１つ以上において活性なプロモーターが含まれる。そのようなプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、又は組織特異的プロモーターであり得る。任意選択的に、プロモーターは、一方向のＣａｓタンパク質及び他の方向のガイドＲＮＡの両方の発現を駆動する双方向プロモーターであり得る。かかる双方向プロモーターは、（１）遠位配列要素（distal sequence element、ＤＳＥ）、近位配列要素（proximal sequence element、ＰＳＥ）、及びＴＡＴＡボックスの３つの外部制御要素を含む完全な従来の一方向Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター、並びに（２）ＤＳＥの５’末端に逆方向に融合されたＰＳＥ及びＴＡＴＡボックスを含む第２の基本的なＰｏｌ　ＩＩＩプロモーターからなり得る。例えば、Ｈ１プロモーターでは、ＤＳＥはＰＳＥ及びＴＡＴＡボックスに隣接しており、プロモーターは、Ｕ６プロモーターに由来するＰＳＥ及びＴＡＴＡボックスを追加することによって逆方向の転写が制御されるハイブリッドプロモーターを作成することにより、双方向にすることができる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１６／００７４５３５号を参照されたい。双方向プロモーターを使用してＣａｓタンパク質及びガイドＲＮＡをコードする遺伝子を同時に発現させることにより、コンパクトな発現カセットを生成して送達を容易にすることを可能にする。

【０４３５】

様々なプロモーターを使用して、Ｃａｓ発現又はＣａｓ９発現を駆動できる。いくつかの方法では、Ｃａｓ又はＣａｓ９コード配列がＡＡＶ構築物に適合することができるように小さなプロモーターが使用される。例えば、Ｃａｓ又はＣａｓ９及び１つ以上のｇＲＮＡ（例えば、１つのｇＲＮＡ又は２つのｇＲＮＡ又は３つのｇＲＮＡ又は４つのｇＲＮＡ）は、ＬＮＰ媒介送達（例えば、ＲＮＡの形態）又はアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）媒介送達（例えば、ＡＡＶ２媒介送達、ＡＡＶ５媒介送達、ＡＡＶ８媒介送達又はＡＡＶ７ｍ８媒介送達）を介して送達することができる。例えば、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９であり得、内因性ヒトＡＬＢ遺伝子座のイントロン１を標的とするＣａｓ９ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡは、ＬＮＰ媒介送達又はＡＡＶ媒介送達を介して送達することができる。Ｃａｓ又はＣａｓ９及びｇＲＮＡは、単一のＡＡＶにおいて、又は２つの別個のＡＡＶを介して送達することができる。例えば、第１のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセットを担持することができ、第２のＡＡＶは、ｇＲＮＡ発現カセットを担持することができる。同様に、第１のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセットを担持することができ、第２のＡＡＶは、２つ以上のｇＲＮＡ発現カセットを担持することができる。代替的に、単一のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたＣａｓ又はＣａｓ９コード配列）及びｇＲＮＡ発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたｇＲＮＡコード配列）を担持することができる。同様に、単一のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたＣａｓ又はＣａｓ９コード配列）及び２つ以上のｇＲＮＡ発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたｇＲＮＡコード配列）を担持することができる。Ｕ６プロモーター又は小さなｔＲＮＡ　Ｇｌｎなど、様々なプロモーターを使用してｇＲＮＡの発現を駆動することができる。同様に、Ｃａｓ９の発現を駆動するために様々なプロモーターを使用できる。例えば、Ｃａｓ９コード配列がＡＡＶ構築物に適合することができるように小さなプロモーターが使用される。同様に、小さなＣａｓ９タンパク質（例えば、ＳａＣａｓ９又はＣｊＣａｓ９を使用して、ＡＡＶパッケージング容量を最大化する）。

【０４３６】

ｍＲＮＡとして提供されるＣａｓタンパク質は、安定性及び／又は免疫原性の特性を改

善するために修飾することができる。修飾は、ｍＲＮＡ内の１つ以上のヌクレオシドに対して行われ得る。ｍＲＮＡ核酸塩基への化学修飾の例としては、シュードウリジン、１－メチル－シュードウリジン、及び５－メチル－シチジンが挙げられる。Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡはまたキャップされ得る。キャップは、例えば、＋１リボヌクレオチドがリボースの２’Ｏ位置でメチル化されているキャップ１構造であり得る。キャッピングは、例えば、インビボで優れた活性を与えることができ（例えば、天然のキャップを模倣することによって）、宿主の自然免疫系の刺激を低減する天然の構造をもたらすことができる（例えば、自然免疫系におけるパターン認識受容体の活性化を低減することができる）。Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、ポリアデニル化することもできる（ポリ（Ａ）テールを含むため）。Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンを含むように修飾することもできる（例えば、シュードウリジンで完全に置換することができる）。別の例として、Ｎ１－メチル－シュードウリジンを含有するキャップ及びポリアデニル化されたＣａｓ　ｍＲＮＡを使用することができる。Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、Ｎ１－メチル－シュードウリジンを含むように修飾することもできる（例えば、Ｎ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換することができる）。別の例として、シュードウリジンで完全に置換されたＣａｓ　ｍＲＮＡを使用することができる（すなわち、全ての標準的なウラシル残基は、ウラシルが窒素－炭素ではなく炭素－炭素結合で結合しているウリジン異性体であるシュードウリジンで置換される）。別の例として、Ｎ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されたＣａｓ　ｍＲＮＡを使用することができる（すなわち、全ての標準ウラシル残基がＮ１－メチル－シュードウリジンで置換される）。同様に、Ｃａｓ　ｍＲＮＡは、同義のコドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾することができる。例えば、シュードウリジンで完全に置換されたキャップ及びポリアデニル化されたＣａｓ　ｍＲＮＡを使用することができる。例えば、Ｎ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換されたキャップ及びポリアデニル化されたＣａｓ　ｍＲＮＡを使用することができる。

【０４３７】

Ｃａｓ　ｍＲＮＡは、少なくとも１つ、複数、又は全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含むことができる。修飾ウリジンは、５位で修飾されたウリジンであり得る（例えば、ハロゲン、メチル、又はエチルで）。修飾ウリジンは、１位で修飾されたシュードウリジンであり得る（例えば、ハロゲン、メチル、又はエチルで）。修飾ウリジンは、例えば、シュードウリジン、Ｎ１－メチル－シュードウリジン、５－メトキシウリジン、５－ヨードウリジン、又はそれらの組み合わせであり得る。いくつかの例では、修飾ウリジンは、５－メトキシウリジンである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、Ｎ１－メチル－シュードウリジンである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、シュードウリジンとＮ１－メチル－シュードウリジンとの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、シュードウリジンと５－メトキシウリジンとの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、Ｎ１－メチルシュードウリジンと５－メトキシウリジンとの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンとＮ１－メチル－シュードウリジンとの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、シュードウリジンと５－ヨードウリジンとの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンと５－メトキシウリジンとの組み合わせである。

【０４３８】

本明細書に開示されるＣａｓ　ｍＲＮＡはまた、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、又はＣａｐ２などの５’キャップを含み得る。５’キャップは、一般に、５’－三リン酸を介して、ｍＲＮＡの５’から３’鎖の最初のヌクレオチドの５’位（すなわち、最初のキャップ近位ヌクレオチド）に連結された７－メチルグアニンリボヌクレオチド（例えば、ＡＲＣＡに関して更に修飾され得る）である。Ｃａｐ０では、ｍＲＮＡの第１及び第２のキャップ近位ヌクレオチドのリボースは両方とも、２’－ヒドロキシルを含む。Ｃａｐ１では、ｍＲＮＡの

第１及び第２の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ、２’－メトキシ及び２’－ヒドロキシルを含む。Ｃａｐ２では、ｍＲＮＡの第１及び第２のキャップ近位ヌクレオチドのリボースは両方とも、２’－メトキシを含む。例えば、Ｋａｔｉｂａｈ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．」１１１（３３）：１２０２５－３０、及びＡｂｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．」１１４（１１）：Ｅ２１０６－Ｅ２１１５を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ヒトｍＲＮＡなどの哺乳動物ｍＲＮＡを含むほとんどの内因性高等真核生物ｍＲＮＡは、Ｃａｐ１又はＣａｐ２を含む。Ｃａｐ１及びＣａｐ２とは異なるＣａｐ０及び他のキャップ構造は、ＩＦＩＴ－１及びＩＦＩＴ－５などの自然免疫系の構成要素によって非自己として認識されるため、ヒトなどの哺乳動物では免疫原性であり得、Ｉ型インターフェロンを含むサイトカインレベルの上昇を引き起こす可能性がある。ＩＦＩＴ－１及びＩＦＩＴ－５などの自然免疫系の構成要素もｅＩＦ４Ｅと競合して、ｍＲＮＡとＣａｐ１又はＣａｐ２以外のキャップとの結合を競合し、ｍＲＮＡの翻訳を阻害する可能性がある。

【０４３９】

キャップは共転写的に含むことができる。例えば、ＡＲＣＡ（アンチリバースキャップアナログ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃカタログ番号ＡＭ８０４５）は、グアニンリボヌクレオチドの５’位に連結された７－メチルグアニン３’－メトキシ－５’－三リン酸を含むキャップ類似体であり、開始時に転写物にインビトロで組み込むことができる。ＡＲＣＡは、最初のキャップ近位ヌクレオチドの２’位がヒドロキシルであるＣａｐ０キャップをもたらす。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｔｅｐｉｎｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）ＲＮＡ　７：１４８６－１４９５を参照されたい。

【０４４０】

ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ番号Ｎ－７１１３）又はＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧ、ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ番号Ｎ－７１３３）を使用して、Ｃａｐ１構造を共転写的に提供することができる。ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧ及びＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧの３’－Ｏ－メチル化バージョンはまた、それぞれ、カタログ番号Ｎ－７４１３及びＮ－７４３３としてＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能である。

【０４４１】

代替的に、転写後にキャップをＲＮＡに追加することもできる。例えば、ワクシニアキャッピング酵素は、市販されており（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓカタログ番号Ｍ２０８０Ｓ）、そのＤ１サブユニットによって提供されるＲＮＡトリホスファターゼ及びグアニリルトランスフェラーゼ活性、並びにそのＤ１２サブユニットによって提供されるグアニンメチルトランスフェラーゼを有する。したがって、Ｓ－アデノシルメチオニン及びＧＴＰの存在下で、ＲＮＡに７－メチルグアニンを付加してＣａｐ０を与えることができる。例えば、Ｇｕｏ　ａｎｄ　Ｍｏｓｓ（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．」８７：４０２３－４０２７及びＭａｏ　ａｎｄ　Ｓｈｕｍａｎ（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：２４４７２－２４４７９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０４４２】

Ｃａｓ　ｍＲＮＡは、ポリアデニル化（ポリＡ又はポリ（Ａ）又はポリアデニン）テールを更に含むことができる。ポリＡテールは、例えば、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、又は少なくとも１００のアデニン、及び任意選択的に最大３００のアデニンを含む。例えば、ポリＡテールは、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００の

アデニンヌクレオチドを含むことができる。

【０４４３】

（３）ガイドＲＮＡ

「ガイドＲＮＡ」又は「ｇＲＮＡ」は、Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９タンパク質）に結合し、かつＣａｓタンパク質を標的ＤＮＡ内の特定の位置に標的化するＲＮＡ分子である。ガイドＲＮＡは、２つのセグメント：「ＤＮＡ標的化セグメント」（「ガイド配列」とも呼ばれる）及び「タンパク質結合セグメント」を含むことができる。「セグメント」は、分子のセクション又は領域、例えば、ＲＮＡ中のヌクレオチドの連続ストレッチを含む。Ｃａｓ９についてのものなどのいくつかのｇＲＮＡは、２つの別個のＲＮＡ分子：「アクチベーターＲＮＡ」（例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ）及び「ターゲッターＲＮＡ」（例えば、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ又はｃｒＲＮＡ）を含むことができる。他のｇＲＮＡは、単一のＲＮＡ分子（単一のＲＮＡポリヌクレオチド）であり、これは「単一分子ｇＲＮＡ」、「単一ガイドＲＮＡ」、又は「ｓｇＲＮＡ」とも呼ばれ得る。例えば、国際公開第２０１３／１７６７７２号、国際公開第２０１４／０６５５９６号、国際公開第２０１４／０８９２９０号、国際公開第２０１４／０９３６２２号、国際公開第２０１４／０９９７５０号、国際公開第２０１３／１４２５７８号、及び国際公開第２０１４／１３１８３３号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ガイドＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）又はｃｒＲＮＡとトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）との組み合わせのいずれかを指し得る。ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、単一のＲＮＡ分子（単一ガイドＲＮＡ又はｓｇＲＮＡ）として、又は２つの別個のＲＮＡ分子（二重ガイドＲＮＡ又はｄｇＲＮＡ）において関連付けることができる。例えば、Ｃａｓ９の場合、単一ガイドＲＮＡは、（例えば、リンカーを介して）ｔｒａｃｒＲＮＡに融合したｃｒＲＮＡを含み得る。例えば、Ｃｐｆ１及びＣａｓΦの場合、標的配列への結合を達成するために必要なのはｃｒＲＮＡだけである。「ガイドＲＮＡ」及び「ｇＲＮＡ」という用語は、二重分子（すなわち、モジュラー）ｇＲＮＡ及び単一分子ｇＲＮＡの両方を含む。本明細書に開示される方法及び組成物のうちのいくつかでは、ｇＲＮＡは、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９　ｇＲＮＡ又はその同等物である。本明細書に開示される方法及び組成物のうちのいくつかでは、ｇＲＮＡは、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９　ｇＲＮＡ又はその同等物である。

【０４４４】

例示的な２分子ｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ様（「ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ」又は「ターゲッターＲＮＡ」又は「ｃｒＲＮＡ」又は「ｃｒＲＮＡリピート」）分子及び対応するｔｒａｃｒＲＮＡ様（「トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ」又は「アクチベーターＲＮＡ」又は「ｔｒａｃｒＲＮＡ」）分子を含む。ｃｒＲＮＡは、ｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント（一本鎖）、及びｇＲＮＡのタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二重鎖の半分を形成するヌクレオチドのストレッチの両方を含む。ＤＮＡ標的化セグメントの下流（３’）に位置するｃｒＲＮＡテール（例えば、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９とともに使用するための）の例は、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵ（配列番号１６）又はＧＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＵＵＵＵＧ（配列番号１７）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。本明細書に開示されるＤＮＡ標的化セグメントのうちのいずれかは、配列番号１６又は１７の５’末端に結合して、ｃｒＲＮＡを形成することができる。

【０４４５】

対応するｔｒａｃｒＲＮＡ（アクチベーター－ＲＮＡ）は、ｇＲＮＡのタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二重鎖の他の半分を形成するヌクレオチドのストレッチを含む。ｃｒＲＮＡのヌクレオチドのストレッチは、ｔｒａｃｒＲＮＡのヌクレオチドのストレッチと相補的であり、それをハイブリダイズして、ｇＲＮＡのタンパク質結合ドメインのｄｓＲＮＡ二重鎖を形成する。したがって、各ｃｒＲＮＡは、対応するｔｒａｃｒＲＮＡを有すると言われ得る。ｔｒａｃｒＲＮＡ配列（例えば、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９とともに使用するための）の例は、ＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ

ＵＵＵ（配列番号１８）、ＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ（配列番号１９）、又はＧＵＵＧＧＡＡＣＣＡＵＵＣＡＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（配列番号２０）のうちのいずれか１つを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【０４４６】

ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの両方が必要とされる系では、ｃｒＲＮＡ及び対応するｔｒａｃｒＲＮＡは、ハイブリダイズしてｇＲＮＡを形成する。ｃｒＲＮＡのみが必要な系では、ｃｒＲＮＡはｇＲＮＡであり得る。ｃｒＲＮＡは追加的に、標的ＤＮＡの相補的鎖にハイブリダイズする一本鎖ＤＮＡ標的化セグメントを提供する。細胞内での修飾に使用する場合、所与のｃｒＲＮＡ又はｔｒａｃｒＲＮＡ分子の正確な配列は、ＲＮＡ分子が使用される種に特異的になるように設計することができる。例えば、Ｍａｌｉ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３９（６１２１）：８２３－８２６、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３７（６０９６）：８１６－８２１、Ｈｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１（３）：２２７－２２９、Ｊｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１（３）：２３３－２３９、及びＣｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３９（６１２１）：８１９－８２３を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０４４７】

所与のｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント（ｃｒＲＮＡ）は、以下により詳細に記載されるように、標的ＤＮＡの相補的鎖上の配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。ｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントは、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対合）を介して配列特異的様式で標的ＤＮＡと相互作用する。したがって、ＤＮＡ標的化セグメントのヌクレオチド配列は変動してもよく、ｇＲＮＡ及び標的ＤＮＡが相互作用する標的ＤＮＡ内の位置を決定する。目的のｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントは、標的ＤＮＡ内の任意の所望の配列にハイブリダイズするように修飾され得る。天然に存在するｃｒＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系及び生物に応じて異なるが、２１～４６ヌクレオチド長の２つの直接反復（direct repeat、ＤＲ）が隣接する、２１～７２ヌクレオチド長の標的化セグメントを含有することが多い（例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１４／１３１８３３号を参照されたい）。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓの場合、ＤＲは３６ヌクレオチド長であり、標的セグメントは３０ヌクレオチド長である。３’に位置するＤＲは、対応するｔｒａｃｒＲＮＡに相補的であり、ハイブリダイズし、これが次に、Ｃａｓタンパク質に結合する。

【０４４８】

ＤＮＡ標的化セグメントは、例えば、少なくとも約１２、少なくとも約１５、少なくとも約１７、少なくとも約１８、少なくとも約１９、少なくとも約２０、少なくとも約２５、少なくとも約３０、少なくとも約３５、又は少なくとも約４０ヌクレオチドの長さを有し得る。そのようなＤＮＡ標的化セグメントは、例えば、約１２～約１００、約１２～約８０、約１２～約５０、約１２～約４０、約１２～約３０、約１２～約２５、又は約１２～約２０ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、ＤＮＡ標的化セグメントは、約１５～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７～約２０ヌクレオチド、又は約１７、１８、１９、若しくは２０ヌクレオチド）であり得る。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１６／００２４５２３号を参照されたい。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９の場合、典的なＤＮＡ標的セグメントは、１６～２０ヌクレオチド長、又は１７～２０ヌクレオチド長である。Ｓ．ａｕｒｅｕｓ由来のＣａｓ９の場合、典型的なＤＮＡ標的セグメントは、２１～２３ヌクレオチド長である。Ｃｐｆ１の場合、典型的なＤＮＡ標的化セグメントは、少なくとも１６ヌクレオチド長又は少なくとも１８ヌクレオチド長である。

【０４４９】
一例では、ＤＮＡ標的化セグメントは、約２０ヌクレオチド長であり得る。しかしながら、より短い配列及びより長い配列も標的化セグメントに使用することができる（例えば、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、又は２５ヌクレオチド長などの、１５～２５ヌクレオチド長）。ＤＮＡ標的化セグメントと対応するガイドＲＮＡ標的配列との間の同一性の程度（又はＤＮＡ標的化セグメントとガイドＲＮＡ標的配列の他の鎖との間の相補性の程度）は、例えば、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、又は約１００％であり得る。ＤＮＡ標的化セグメント及び対応するガイドＲＮＡ標的配列には、１つ以上のミスマッチが含まれ得る。例えば、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント及び対応するガイドＲＮＡ標的配列には、１～４、１～３、１～２、１、２、３、又は４つのミスマッチが含まれ得る（例えば、ガイドＲＮＡ標的配列の全長が、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０以上のヌクレオチドである）。例えば、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント及び対応するガイドＲＮＡ標的配列には、ガイドＲＮＡ標的配列の全長が、２０ヌクレオチドである、１～４、１～３、１～２、１、２、３、又は４つのミスマッチが含まれ得る。

【０４５０】
一例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含む

か、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドと３以下、２以下、又は１以下ヌクレオチドの異なる配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。

【０４５１】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つに示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドと３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。

【０４５２】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番

号３６に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３６に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドと３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。

【０４５３】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０

に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドと３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。

【０４５４】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３３に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３３に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３３に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３３に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３３に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３３に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又

は少なくとも２０の連続するヌクレオチドに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３３に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３３に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドと３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。

【０４５５】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４１に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４１に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４１に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４１に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４１に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４１に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４１に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４１に示される配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドと３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含むことができる。

【０４５６】

【表２】

表２．ヒトＡＬＢイントロン１ガイド配列。

ガイド配列	配列番号:
GAGCAACCUCACUCUUGUCU	30
AUGCAUUUGUUUCAAAAUAU	31
UGCAUUUGUUUCAAAAUAUU	32
AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	33
GAUCAACAGCACAGGUUUUG	34
UUAAAUAAAGCAUAGUGCAA	35
UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	36
UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU	37
UACUAAAACUUUAUUUUACU	38
AAAGUUGAACAAUAGAAAAA	39
AAUGCAUAAUCUAAGUCAAA	40
UAAUAAAAUUCAAACAUCCU	41
GCAUCUUUAAAGAAUUAUUU	42
UUUGGCAUUUAUUUCUAAAA	43
UGUAUUUGUGAAGUCUUACA	44
UCCUAGGUAAAAAAAAAAAA	45
UAAUUUUCUUUUGCGCACUA	46
UGACUGAAACUUCACAGAAU	47
GACUGAAACUUCACAGAAUA	48
UUCAUUUUAGUCUGUCUUCU	49
AUUAUCUAAGUUUGAAUAUA	50
AAUUUUUAAAAUAGUAUUCU	51
UGAAUUAUUCUUCUGUUUAA	52
AUCAUCCUGAGUUUUUCUGU	53
UUACUAAAACUUUAUUUUAC	54
ACCUUUUUUUUUUUUUUACCU	55
AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU	56
UGAUUCCUACAGAAAAACUC	57
UGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	58
CCUCACUCUUGUCUGGGCAA	59
ACCUCACUCUUGUCUGGGCA	60
UGAGCAACCUCACUCUUGUC	61

【０４５７】

【表３－１】

表３．ヒトＡＬＢイントロン１　ｓｇＲＮＡ配列。

完全配列	修飾された完全配列
GAGCAACCUCACUCUUGUCUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG UGCUUUU（配列番号62）	mG*mA*mG*CAACCUCACUCUUGUCUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号94）
AUGCAUUUGUUUCAAAAUAUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号63）	mA*mU*mG*CAUUUGUUUCAAAAUAUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号95）
UGCAUUUGUUUCAAAAUAUUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号64）	mU*mG*mC*AUUUGUUUCAAAAUAUUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号96）
AUUUAUGAGAUCAACAGCACGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号65を参照のこと）	mA*mU*mU*UAUGAGAUCAACAGCACGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号97）
GAUCAACAGCACAGGUUUUGGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号66）	mG*mA*mU*CAACAGCACAGGUUUUGGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号98）
UUAAAUAAAGCAUAGUGCAAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号67）	mU*mU*mA*AAUAAAGCAUAGUGCAAGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号99）
UAAAGCAUAGUGCAAUGGAUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号68）	mU*mA*mA*AGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号100）
UAGUGCAAUGGAUAGGUCUUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号69）	mU*mA*mG*UGCAAUGGAUAGGUCUUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号101）
UACUAAAACUUUAUUUUACUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号70）	mU*mA*mC*UAAAACUUUAUUUUACUGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号102）
AAAGUUGAACAAUAGAAAAAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号71）	mA*mA*mA*GUUGAACAAUAGAAAAAGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号103）
AAUGCAUAAUCUAAGUCAAAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号72）	mA*mA*mU*GCAUAAUCUAAGUCAAAGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号104）

【表３－２】

（表３の続き）

完全配列	修飾された完全配列
UAAUAAAAUUCAAACAUCCUGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号73）	mU*mA*mA*UAAAAUUCAAACAUCCUGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号105）
GCAUCUUUAAAGAAUUAUUUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号74）	mG*mC*mA*UCUUUAAAGAAUUAUUUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号106）
UUUGGCAUUUAUUUCUAAAAGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号75）	mU*mU*mU*GGCAUUUAUUUCUAAAAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号107）
UGUAUUUGUGAAGUCUUACAGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号76）	mU*mG*mU*AUUUGUGAAGUCUUACAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号108）
UCCUAGGUAAAAAAAAAAAAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号77）	mU*mC*mC*UAGGUAAAAAAAAAAAAGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号109）
UAAUUUUCUUUUGCGCACUAGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号78）	mU*mA*mA*UUUUCUUUUGCGCACUAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号110）
UGACUGAAACUUCACAGAAUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号79）	mU*mG*mA*CUGAAACUUCACAGAAUGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号111）
GACUGAAACUUCACAGAAUAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号80）	mG*mA*mC*UGAAACUUCACAGAAUAGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号112）
UUCAUUUUAGUCUGUCUUCUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号81）	mU*mU*mC*AUUUUAGUCUGUCUUCUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号113）
AUUAUCUAAGUUUGAAUAUAGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号82）	mA*mU*mU*AUCUAAGUUUGAAUAUAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号114）
AAUUUUUAAAAUAGUAUUCUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号83）	mA*mA*mU*UUUUAAAAUAGUAUUCUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号115）

【表３－３】

（表３の続き）

完全配列	修飾された完全配列
UGAAUUAUUCUUCUGUUUAAGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号84）	mU*mG*mA*AUUAUUCUUCUGUUUAAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号116）
AUCAUCCUGAGUUUUUCUGUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号85）	mA*mU*mC*AUCCUGAGUUUUUCUGUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号117）
UUACUAAAACUUUAUUUUACGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号86）	mU*mU*mA*CUAAAACUUUAUUUUACGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号118）
ACCUUUUUUUUUUUUUUACCUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号87）	mA*mC*mC*UUUUUUUUUUUUUUACCUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号119）
AGUGCAAUGGAUAGGUCUUUGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号88）	mA*mG*mU*GCAAUGGAUAGGUCUUUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号120）
UGAUUCCUACAGAAAAACUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号89）	mU*mG*mA*UUCCUACAGAAAAACUCGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号121）
UGGGCAAGGGAAGAAAAAAAGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号90）	mU*mG*mG*GCAAGGGAAGAAAAAAAGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号122）
CCUCACUCUUGUCUGGGCAAGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号91）	mC*mC*mU*CACUCUUGUCUGGGCAAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号123）
ACCUCACUCUUGUCUGGGCAGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号92）	mA*mC*mC*UCACUCUUGUCUGGGCAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号124）
UGAGCAACCUCACUCUUGUCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU（配列番号93）	mU*mG*mA*GCAACCUCACUCUUGUCGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号125）

【０４５８】

【表４】

表４．マウスＡｌｂイントロン１ガイド配列。

ガイド配列	配列番号:
CACUCUUGUCUGUGGAAACA	228

【０４５９】

【表５】

表５．マウスＡｌｂイントロン１　ｓｇＲＮＡ配列。

完全配列	修飾された完全配列
CACUCUUGUCUGUGGAAACAGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUU（配列番号２３０）	mC*mA*mC*UCUUGUCUGUGGAAACAGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号２３１）

【０４６０】

ＴｒａｃｒＲＮＡは、任意の形態（例えば、完全長ｔｒａｃｒＲＮＡ又は活性部分ｔｒａｃｒＲＮＡ）であり得、様々な長さのものであり得る。それらには、一次転写物又は処理された形態が含まれ得る。例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ（単一ガイドＲＮＡの一部として、又は２分子ｇＲＮＡの一部としての別個の分子として）は、野生型ｔｒａｃｒＲＮＡ配列（例えば、野生型ｔｒａｃｒＲＮＡ配列の約２０、２６、３２、４５、４８、５４、６３、６７、８５、又はそれ以上のヌクレオチド）の全て又は一部を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来の野生型ｔｒａｃｒＲＮＡ配列の例としては、１７１ヌクレオチド、８９ヌクレオチド、７５ヌクレオチド、及び６５ヌクレオチドのバージョンが挙げられる。例えば、Ｄｅｌｔｃｈｅｖａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｎａｔｕｒｅ４７１（７３４０）：６０２－６０７、国際公開第２０１４／０９３６６１号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）内のｔｒａｃｒＲＮＡの例には、ｓｇＲＮＡの＋４８、＋５４、＋６７、及び＋８５バージョン内に見出されるｔｒａｃｒＲＮＡセグメントが含まれ、ここで、「＋ｎ」は、野生型ｔｒａｃｒＲＮＡの最大＋ｎヌクレオチドがｓｇＲＮＡに含まれることを示す。全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第８，６９７，３５９号を参照されたい。

【０４６１】

ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補的鎖との間の相補性パーセントは、少なくとも６０％（例えば、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％）であり得る。ＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補的鎖との間の相補性パーセントは、約２０個の連続するヌクレオチドにわたって少なくとも６０％であり得る。一例として、ＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補的鎖との間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補的鎖の５’末端における１４個の連続するヌクレオチドにわたって１００％であってもよく、残りの部分にわたって０％まで低くてもよい。そのような場合、ＤＮＡ標的化セグメントは、１４ヌクレオチド長であるとみなされ得る。別の例として、ＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補的鎖との間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補的鎖の５’末端における７個の連続するヌクレオチドにわたって１００％であってもよく、残りの部分にわたって０％まで低くてもよい。そのような場合、ＤＮＡ標的化セグメントは、７ヌクレオチド長であるとみなされ得る。いくつかのガイドＲＮＡでは、ＤＮＡ標的化セグメント内の少なくとも１７個のヌクレオチドが標的ＤＮＡの相補的鎖に相補的である。例えば、ＤＮＡ標的化セグメントは、２０ヌクレオチド長であり得、標的ＤＮＡの相補的鎖との１、２、又は３つのミスマッチを含むことができる。一例では、ミスマッチは、プロトスペーサー隣接モチーフ（ｐｒｏｔｏｓｐａｃｅｒ　ａｄｊａｃｅｎｔ　ｍｏｔｉｆ、ＰＡＭ）配列に対応する相補的鎖（すなわち、ＰＡＭ配列の逆相補体）の領域に隣接していない（例えば、ミスマッチは、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントの５’末端におけるか、又はミスマッチは、ＰＡＭ配列に対応する相補的鎖の領域から、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、若しくは１９塩基対離れている）。

【０４６２】
ｇＲＮＡのタンパク質結合セグメントは、互いに相補的である２つのヌクレオチドのストレッチを含むことができる。タンパク質結合セグメントの相補的ヌクレオチドは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ二重鎖（ｄｓＲＮＡ）を形成する。対象のｇＲＮＡのタンパク質結合セグメントはＣａｓタンパク質と相互作用し、ｇＲＮＡは結合したＣａｓタンパク質をＤＮＡ標的化セグメントを介して標的ＤＮＡ内の特定のヌクレオチド配列に指向する。
【０４６３】
単一ガイドＲＮＡは、ＤＮＡ標的化セグメント及び足場配列（すなわち、ガイドＲＮＡのタンパク質結合又はＣａｓ結合配列）を含むことができる。例えば、そのようなガイドＲＮＡは、３’足場配列に結合された５’ＤＮＡ標的化セグメントを有することができる。例示的な足場配列（例えば、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９とともに使用するための）は、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵ（バージョン１、配列番号２１）、ＧＵＵＧＧＡＡＣＣＡＵＵＣＡＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン２、配列番号２２）、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン３、配列番号２３）、及びＧＵＵＵＡＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＧＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＵＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン４、配列番号２４）、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵＵＵＵＵ（バージョン５、配列番号２５）、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵＵ（バージョン６、配列番号２６）、ＧＵＵＵＡＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＧＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＵＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵＵＵＵ（バージョン７、配列番号２７）、又はＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン８、配列番号２８）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。いくつかのガイドｓｇＲＮＡでは、バージョン６の４つの末端Ｕ残基が存在しない。いくつかのガイドｓｇＲＮＡでは、バージョン６の４つの末端Ｕ残基のうちの１つ、２つ、又は３つしか存在しない。本明細書に開示されるガイドＲＮＡ標的配列のうちのいずれかを標的とするガイドＲＮＡは、例えば、ガイドＲＮＡの３’末端における例示的なガイドＲＮＡ足場配列のいずれかに融合したガイドＲＮＡの５’末端におけるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。すなわち、本明細書に開示されるＤＮＡ標的化セグメントのうちのいずれかは、上記の足場配列のうちのいずれか１つの５’末端に結合して、単一ガイドＲＮＡ（キメラガイドＲＮＡ）を形成することができる。
【０４６４】
ガイドＲＮＡは、追加の望ましい特徴（例えば、修飾又は調節された安定性、細胞内標的化、蛍光標識による追跡、タンパク質又はタンパク質複合体についての結合部位など）を提供する修飾又は配列を含むことができる。すなわち、ガイドＲＮＡは、１つ以上の修飾ヌクレオシド若しくはヌクレオチド、又は標準Ａ、Ｇ、Ｃ、及びＵ残基の代わりに、若しくはそれに加えて使用される１つ以上の非天然及び／若しくは天然に存在する成分若しくは構成を含み得る。そのような修飾の例には、例えば、５’キャップ（例えば、７－メチルグアニレートキャップ（ｍ７Ｇ））、３’ポリアデニル化テール（すなわち、３’ポリ（Ａ）テール）、リボスイッチ配列（例えば、タンパク質及び／又はタンパク質複合体による調節された安定性及び／又は調節されたアクセス可能性を可能にするため）、安定性

制御配列、ｄｓＲＮＡ二重鎖（すなわち、ヘアピン）を形成する配列、ＲＮＡを細胞内の位置（例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体など）に標的化する修飾又は配列、追跡を提供する修飾又は配列（例えば、蛍光分子への直接結合、蛍光検出を容易にする部分への複合体化、蛍光検出を可能にする配列など）、タンパク質（例えば、転写活性化因子、転写抑制因子、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ、ＤＮＡデメチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼなどを含む、ＤＮＡに作用するタンパク質）の結合部位を提供する修飾又は配列、並びにそれらの組み合わせが挙げられる。修飾の他の例には、操作されたステムループ二重構造、操作されたバルジ領域、ステムループ二重構造の操作されたヘアピン３’、又はそれらの任意の組み合わせが含まれる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１５／０３７６５８６号を参照されたい。バルジは、ｃｒＲＮＡ様領域と最小のｔｒａｃｒＲＮＡ様領域で構成される二重鎖内のヌクレオチドの対になっていない領域であり得る。バルジは、二重鎖の片側に、Ｘが任意のプリンであり、Ｙが反対側の鎖上のヌクレオチドとゆらぎ対を形成することができるヌクレオチドであり得る、対になっていない５’－ＸＸＸＹ－３’、及び二重鎖の他方の側に対になっていないヌクレオチド領域を含むことができる。

【０４６５】

ガイドＲＮＡは、例えば、以下のうちの１つ以上を含む修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドを含むことができる：（１）ホスホジエステル骨格連結において、非連結リン酸酸素の一方若しくは両方及び／又は連結リン酸酸素のうちの１つ以上の改変又は置換（例示的な骨格修飾）、（２）リボース糖での２’ヒドロキシルの改変又は置換などのリボース糖の成分の改変又は置換（例示的な糖修飾）、（３）リン酸部分のデホスホリンカーによる置換（例えば、大規模な置換）（例示的な骨格修飾）、（４）非標準核酸塩基を含む天然に存在する核酸塩基の修飾又は置換（例示的な塩基修飾）、（５）リボース－リン酸骨格の置換又は修飾（例示的な骨格修飾）、（６）オリゴヌクレオチドの３’末端又は５’末端の修飾（例えば、末端リン酸基の除去、修飾、若しくは置換、又は部分、キャップ、若しくはリンカーの複合（そのような３’又は５’キャップ修飾は、糖及び／又は骨格修飾を含み得る））、並びに（７）糖の修飾又は置換（例示的な糖修飾）。他の可能なガイドＲＮＡ修飾には、ウラシル又はポリ－ウラシルトラクトの修飾又は置換が含まれる。例えば、国際公開第２０１５／０４８５７７号及び米国特許出願公開第２０１６／０２３７４５５号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。同様の修飾を、Ｃａｓ　ｍＲＮＡなどのＣａｓコード核酸に行うことができる。例えば、Ｃａｓ　ｍＲＮＡは、同義のコドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾することができる。

【０４６６】

上にリストされるホースでのような化学修飾を組み合わせて、２、３、４、又はそれ以上の修飾を有することができる残基（ヌクレオシド及びヌクレオチド）を含む修飾ｇＲＮＡ及び／又はｍＲＮＡを提供することができる。例えば、修飾残基は、修飾された糖及び修飾された核酸塩基を有することができる。一例では、ｇＲＮＡの全ての塩基が修飾されている（例えば、全ての塩基は、ホスホロチオエート基などの修飾されたリン酸基を有する）。例えば、ｇＲＮＡの全て又は実質的に全てのリン酸基をホスホロチオエート基で置換することができる。代替的又は追加的に、修飾ｇＲＮＡは、５’末端又はその近くに少なくとも１つの修飾残基を含むことができる。代替的又は追加的に、修飾ｇＲＮＡは、３’末端又はその近くに少なくとも１つの修飾残基を含むことができる。

【０４６７】

いくつかのｇＲＮＡは、１つ、２つ、３つ、又はそれ以上の修飾残基を含む。例えば、修飾ｇＲＮＡにおける少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５

％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は１００％の位置は、修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドであり得る。

【０４６８】

修飾されていない核酸は分解されやすい可能性がある。外因性核酸はまた、自然免疫応答を誘導し得る。修飾は、安定性を導入し、免疫原性を低減させるのに役立ち得る。本明細書に記載のいくつかのｇＲＮＡは、細胞内又は血清ベースのヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、１つ以上の修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドを含むことができる。本明細書に記載のいくつかの修飾ｇＲＮＡは、細胞の集団に導入された場合、自然免疫応答の低減を示す可能性がある。

【０４６９】

本明細書に開示されるｇＲＮＡは、修飾残基のリン酸基が、酸素のうちの１つ以上を異なる置換基で置き換えることによって修飾され得る骨格修飾を含むことができる。修飾は、本明細書に記載されるように、修飾されていないリン酸部分を修飾されたリン酸基で大規模に置き換えすることを含み得る。リン酸骨格の骨格修飾には、非荷電リンカー又は非対称電荷分布を有する荷電リンカーのいずれかをもたらす改変も含まれ得る。

【０４７０】

修飾されたリン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレン酸、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキル又はアリールホスホネート及びホスホトリエステルが含まれる。修飾されていないリン酸基におけるリン原子は、アキラル性である。しかしながら、非架橋酸素のうちの１つを上記の原子又は原子の基のうちの１つと置き換えると、リン原子がキラルになる可能性がある。立体中心のリン原子は、「Ｒ」配置（Ｒｐ）又は「Ｓ」配置（Ｓｐ）のいずれかを有することができる。骨格は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに結合する酸素）を、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、及び炭素（架橋メチレンホスホネート）で置換することによっても修飾することができる。置き換えは、結合酸素のいずれか又は結合酸素の両方で生じる可能性がある。

【０４７１】

リン酸基は、ある特定の骨格修飾でリンを含まないコネクタに置き換えることができる。いくつかの実施形態では、荷電リン酸基は、中性部分によって置き換えることができる。リン酸基を置き換えることができる部分の例には、例えば、メチルホスホネート、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、及びメチレンオキシメチルイミノが含まれ得るが、これらに限定されない。

【０４７２】

核酸を模倣することができる足場はまた、リン酸リンカー及びリボース糖がヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド又はヌクレオチド代用物によって置き換えられるように構築され得る。そのような修飾は、骨格及び糖修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、代理骨格によってつながれ得る。例には、モルフォリノ、シクロブチル、ピロリジン、及びペプチド核酸（ｐｅｐｔｉｄｅ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ、ＰＮＡ）ヌクレオシド代用物が含まれるが、これらに限定されない。

【０４７３】

修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドは、糖基への１つ以上の修飾（糖修飾）を含むことができる。例えば、２’ヒドロキシル基（ＯＨ）を修飾することができる（例えば、いくつかの異なるオキシ又はデオキシ置換基で置き換えることができる）。２’－アルコキシドイオンを形成するためにヒドロキシルを脱プロトン化することができなくなるため、２’ヒドロキシル基への修飾は核酸の安定性を高めることができる。

【０４７４】

２’ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシ又はアリールオキシ（ＯＲ、「Ｒ」が、例

えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、又は糖であり得る）、ポリエチレングリコール（polyethyleneglycol、ＰＥＧ）、Ｏ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_n$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＲを含み得、Ｒは、例えば、Ｈ又は任意選択的に置換されたアルキルであり得、ｎは、０～２０（例えば、０～４、０～８、０～１０、０～１６、１～４、１～８、１～１０、１～１６、１～２０、２～４、２～８、２～１０、２～１６、２～２０、４～８、４～１０、４～１６、及び４～２０）の整数であり得る。２’ヒドロキシル基修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅであり得る。同様に、２’ヒドロキシル基修飾は、２’－フルオロ修飾であり得、これは２’ヒドロキシル基をフッ化物で置き換える。２’ヒドロキシル基修飾は、２’ヒドロキシルが、例えば、Ｃ$_{1～6}$アルキレン又はＣ$_{1～6}$ヘテロアルキレンブリッジによって、同じリボース糖の４’炭素に接続され得るロックされた核酸（ＬＮＡ）を含み得、例示的なブリッジは、メチレン、プロピレン、エーテル又はアミノブリッジ；Ｏ－アミノ（アミノは、例えば、ＮＨ$_2$；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン又はポリアミノであり得る）及びアミノアルコキシ、Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$－アミノ、（アミノは、例えば、ＮＨ$_2$；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、又はポリアミノであり得る）を含み得る。２’ヒドロキシル基修飾は、リボース環がＣ２’～Ｃ３’結合を欠いているアンロックされた核酸（unlocked nucleic acid、ＵＮＡ）を含み得る。２’ヒドロキシル基修飾は、メトキシエチル基（ＭＯＥ）（ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＣＨ$_3$、例えば、ＰＥＧ誘導体）を含み得る。

【０４７５】

デオキシ２’修飾には、水素（すなわち、例えば、部分的にｄｓＲＮＡのオーバーハング部分におけるデオキシリボース糖）、ハロ（例えば、ブロモ、クロロ、フルオロ又はヨード）、アミノ（アミノは、例えば、ＮＨ２、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、又はアミノ酸であり得る）、ＮＨ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＮＨ）$_n$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－アミノ（アミノは、例えば、本明細書に記載されるとおりであり得る）、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ（Ｒは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール又は糖であり得る）、シアノ、メルカプト、アルキル－チオ－アルキル、チオアルコキシ、並びにアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニル及びアルキニルを含み得、これらは、任意選択的に、例えば、本明細書に記載のアミノで置換することができる。

【０４７６】

糖修飾は、リボース中の対応する炭素とは反対の立体化学的配置を有する１つ以上の炭素を含み得る糖基を含むことができる。したがって、修飾核酸は、糖として、例えば、アラビノースを含むヌクレオチドを含み得る。修飾核酸はまた、脱塩基糖（abasic sugar）を含み得る。これらの脱塩基糖はまた、構成糖原子のうちの１つ以上で更に修飾することができる。修飾核酸はまた、Ｌ型における１つ以上の糖（例えば、Ｌ－ヌクレオシド）を含み得る。

【０４７７】

修飾核酸に組み込むことができる、本明細書に記載の修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドは、核酸塩基とも呼ばれる修飾塩基を含み得る。核酸塩基の例には、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）、及びウラシル（Ｕ）が含まれるが、これらに限定されない。これらの核酸塩基は、修飾核酸に組み込むことができる修飾残基を提供するために修飾され得るか、又は完全に置換され得る。ヌクレオチドの核酸塩基は、独立して、プリン、ピリミジン、プリン類似体、又はピリミジン類似体から選択することができる。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、例えば、塩基の天然に存在する合成誘導体を含み得る。

【０４７８】

二重ガイドＲＮＡでは、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの各々に修飾を含めることが

できる。そのような修飾は、ｃｒＲＮＡ及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡの一端又は両端にあり得る。ｓｇＲＮＡでは、ｓｇＲＮＡの一端又は両端の１つ以上の残基が化学的に修飾されており、かつ／又は内部ヌクレオシドが修飾されていおり、かつ／又はｓｇＲＮＡ全体が化学的に修飾されている可能性がある。いくつかのｇＲＮＡは、５’末端修飾を含む。いくつかのｇＲＮＡは、３’末端修飾を含む。

【０４７９】

本明細書に開示されるガイドＲＮＡは、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１８／１０７０２８（Ａ１）号に開示される修飾パターンのうちの１つを含むことができる。本明細書に開示されるガイドＲＮＡはまた、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１７／０１１４３３４号に開示される構造／修飾パターンのうちの１つを含むことができる。本明細書に開示されるガイドＲＮＡはまた、国際公開第２０１７／１３６７９４号、国際公開第２０１７／００４２７９号、米国特許出願公開第２０１８／０１８７１８６号、又は米国特許出願公開第２０１９／００４８３３８号に開示される構造／修飾パターンのうちの１つを含むことができ、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０４８０】

一例として、ガイドＲＮＡの５’又は３’末端におけるヌクレオチドは、ホスホロチオエート連結を含み得る（例えば、塩基は、ホスホロチオエート基である修飾されたリン酸基を有することができる）。例えば、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの５’又は３’末端における２、３、又は４つの末端ヌクレオチド間のホスホロチオエート連結を含み得る。別の例として、ガイドＲＮＡの５’及び／又は３’末端におけるヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル修飾を有することができる。例えば、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの５’及び／又は３’末端（例えば、５’末端）における２、３、又は４つの末端ヌクレオチドにおける２’－Ｏ－メチル修飾を含み得る。例えば、国際公開第２０１７／１７３０５４（Ａ１）号、及びＦｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ．２２（９）：２２２７－２２３５を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。他の可能な修飾は、本明細書の他の場所でより詳細に記載されている。具体的な例では、ガイドＲＮＡは、最初の３つの５’及び３’末端ＲＮＡ残基に２’－Ｏ－メチル類似体及び３’ホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。そのような化学修飾は、例えば、エキソヌクレアーゼからガイドＲＮＡへのより優れた安定性及び保護を提供し、それらが修飾されていないガイドＲＮＡよりも長く細胞内に存続することを可能にする。そのような化学修飾はまた、例えば、ＲＮＡを積極的に分解し得るか、又は細胞死につながる免疫カスケードを引き起こし得る自然細胞内免疫応答に対して保護することもできる。

【０４８１】

一例として、本明細書に記載のガイドＲＮＡのうちのいずれかは、少なくとも１つの修飾を含むことができる。一例では、少なくとも１つの修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ、ＰＳ）結合、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、又はそれらの組み合わせを含む。例えば、少なくとも１つの修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含むことができる。代替的又は追加的に、少なくとも１つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含むことができる。代替的又は追加的に、少なくとも１つの修飾は、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含むことができる。一例では、本明細書に記載のガイドＲＮＡは、１つ以上の２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド間の１つ以上のホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む。

【０４８２】

修飾は、ガイドＲＮＡにおいてどこにでも生じ得る。一例として、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの５’末端の最初の５つのヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾を含み、ガ

イドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの３’末端の最後の５つのヌクレオチドのうちの１つ以上での修飾、又はそれらの組み合わせを含む。例えば、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、ガイドＲＮＡの最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、又はそれらの組み合わせを含むことができる。代替的又は追加的に、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドでの２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含むことができ、ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３つのヌクレオチドでの２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、又はそれらの組み合わせを含むことができる。

【０４８３】

一例では、修飾ｇＲＮＡは、以下の配列：ｍＮ＊ｍＮ＊ｍＮ＊ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ（配列番号２９）を含むことができ、式中、「Ｎ」は、任意の天然又は非天然ヌクレオチドであってもよい。例えば、Ｎ残基の全体は、本明細書に記載のヒトＡＬＢイントロン１　ＤＮＡ標的化セグメントを含む（例えば、配列番号２９に示される配列であり、式中、Ｎ残基は、配列番号３０～６１のうちのいずれか１つのＤＮＡ標的化セグメント、配列番号３６、３０、３３、及び４１のうちのいずれか１つのＤＮＡ標的化セグメント、又は配列番号３６のＤＮＡ標的化セグメントで置き換えられる。例えば、修飾ｇＲＮＡは、表３における配列番号９４～１２５のうちのいずれか１つに示される配列、配列番号１００、９４、９７、及び１０５のうちのいずれか１つに示される配列、又は配列番号１００に示される配列を含むことができる。「ｍＡ」、「ｍＣ」、「ｍＵ」、及び「ｍＧ」という用語は、２’－Ｏ－Ｍｅで修飾されたヌクレオチド（それぞれ、Ａ、Ｃ、Ｕ、及びＧ）を示す。「＊」という記号は、ホスホロチオエート修飾を示す。ホスホロチオエート連結又は結合は、ホスホジエステル結合、例えばヌクレオチド塩基間の結合において、硫黄が１つの非架橋リン酸酸素の代わりに使用される結合を指す。ホスホロチオエートを使用してオリゴヌクレオチドを生成する場合、修飾オリゴヌクレオチドはＳ－オリゴと呼ばれることもあり得る。Ａ＊、Ｃ＊、Ｕ＊又はＧ＊という用語は、ホスホロチオエート結合で次の（例えば３’）ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドを示す。「ｍＡ＊」、「ｍＣ＊」、「ｍＵ＊」及び「ｍＧ＊」という用語は、２’－Ｏ－Ｍｅ置換され、ホスホロチオエート結合で次の（例えば、３’）ヌクレオチドに連結されるヌクレオチド（それぞれＡ、Ｃ、Ｕ、及びＧ）を示す。

【０４８４】

ヌクレオチド糖環に影響を与えることが示されている他の化学修飾は、ハロゲン置換である。例えば、ヌクレオチド糖環における２’－フルオロ（２’－Ｆ）置換は、オリゴヌクレオチド結合親和性及びヌクレアーゼ安定性を増加させることができる。脱塩基ヌクレオチドとは、窒素塩基を欠くヌクレオチドを指す。反転した塩基とは、通常の５’から３’への連結（すなわち、５’から５’への連結又は３’から３’への連結のいずれか）から反転している連結を有するものを指す。

【０４８５】

脱塩基ヌクレオチドは、反転した連結で結合することができる。例えば、脱塩基ヌクレオチドは、５’から５’への連結を介して末端５’ヌクレオチドに結合され得るか、又は脱塩基ヌクレオチドは、３’から３’への連結を介して末端３’ヌクレオチドに結合され得る。末端５’又は３’ヌクレオチドのいずれかにおける反転した脱塩基ヌクレオチドは、反転した脱塩基エンドキャップと呼ばれることもあり得る。

【０４８６】

一例では、５’末端の最初の３つ、４つ、又は５つのヌクレオチドのうちの１つ以上、及び３’末端の最後の３つ、４つ、又は５つのヌクレオチドのうちの１つ以上が修飾されている。修飾は、例えば、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｆ、反転した塩基性ヌクレオチド、ホスホロチオエート結合、又は安定性及び／若しくは性能を増加させることが周知の他のヌク

レオチド修飾であり得る。

【０４８７】

別の例では、５’末端の最初の４つのヌクレオチド、及び３’末端の最後の４つのヌクレオチドをホスホロチオエート結合で連結することができる。

【０４８８】

別の例では、５’末端の最初の３つのヌクレオチド、及び３’末端の最後の３つのヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含むことができる。別の例では、５’末端の最初の３つのヌクレオチド、及び３’末端の最後の３つのヌクレオチドは、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む。別の例では、５’末端の最初の３つのヌクレオチド、及び３’末端の最後の３つのヌクレオチドは、反転した塩基性ヌクレオチドを含む。

【０４８９】

ガイドＲＮＡは、任意の形態で提供され得る。例えば、ｇＲＮＡは、２つの分子（別個のｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡ）又は１つの分子（ｓｇＲＮＡ）のいずれかとしてＲＮＡの形態で、及び任意にＣａｓタンパク質との複合体の形態で提供され得る。ｇＲＮＡはまた、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡの形態で提供され得る。ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、単一ＲＮＡ分子（ｓｇＲＮＡ）又は別個のＲＮＡ分子（例えば、別個のｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードすることができる。後者の場合、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、１つのＤＮＡ分子として、又はそれぞれｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡをコードする別個のＤＮＡ分子として提供され得る。

【０４９０】

ｇＲＮＡがＤＮＡの形態で提供される場合、ｇＲＮＡは、一過性、条件付き、又は構成的に細胞内で発現され得る。ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、細胞のゲノムにおいて安定して組み込まれ、細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結され得る。代替的に、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、発現構築物中のプロモーターに作動可能に連結され得る。例えば、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸などの異種核酸を含むベクター内にあり得る。代替的に、それは、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含むベクターとは別個のベクター又はプラスミドであり得る。そのような発現構築物において使用され得るプロモーターには、例えば、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、多能性細胞、胚性幹（ＥＳ）細胞、成体幹細胞、発達的に制限された前駆細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、又は１細胞期胚のうちの１つ以上において活性なプロモーターが含まれる。そのようなプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、又は組織特異的プロモーターであり得る。そのようなプロモーターはまた、例えば、双方向プロモーターであり得る。好適なプロモーターの具体的な例には、ヒトＵ６プロモーター、ラットＵ６ポリメラーゼＩＩＩプロモーター、又はマウスＵ６ポリメラーゼＩＩＩプロモーターなどのＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターが含まれる。

【０４９１】

代替的に、ｇＲＮＡは、種々の他の方法によって調製され得る。例えば、ｇＲＮＡは、例えば、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを使用するインビトロ転写によって調製され得る（例えば、国際公開第２０１４／０８９２９０号及び国際公開第２０１４／０６５５９６号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。ガイドＲＮＡはまた、化学的合成によって調製された合成的に生成された分子であり得る。例えば、ガイドＲＮＡを化学的に合成して、最初の３つの５’及び３’末端ＲＮＡ残基に２’－Ｏ－メチル類似体及び３’ホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むことができる。

【０４９２】

ガイドＲＮＡ（又はガイドＲＮＡをコードする核酸）は、１つ以上のガイドＲＮＡ（例えば、１、２、３、４、又はそれ以上のガイドＲＮＡ）と、ガイドＲＮＡの安定性を増加

させる（例えば、所定の保存条件下（例えば、－２０℃、４℃、又は周囲温度）で、分解産物が閾値未満、例えば出発核酸又はタンパク質の０．５重量％未満のままである期間を延長するか、あるいはインビボでの安定性を増加させる）担体と、を含む組成物にあり得る。そのような担体の非限定的な例には、ポリ（乳酸）（poly(lactic acid)、ＰＬＡ）ミクロスフェア、ポリ（Ｄ，Ｌ－乳酸－コグリコール－酸）（poly(D,L-lactic-coglycolic-acid)、ＰＬＧＡ）ミクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コキレート（cochleate）、及び脂質微小管が含まれる。そのような組成物は、Ｃａｓ９タンパク質などのＣａｓタンパク質、又はＣａｓタンパク質をコードする核酸を更に含むことができる。

【０４９３】

一例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６２～１２５のうちのいずれか１つに示される配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６２～１２５のうちのいずれか１つに示されるＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一である配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６２～１２５のうちのいずれか１つに示されるＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一である配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６２～１２５のうちのいずれか１つに示される配列と３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【０４９４】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６８、１００、６２、９４、６５、９７、７３、及び１０５のうちのいずれか１つに示される配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６８、１００、６２、９４、６５、９７、７３、及び１０５のうちのいずれか１つに示されるＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一である配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６８、１００、６２、９４、６５、９７、７３、及び１０５のうちのいずれか１つに示されるＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一である配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６８、１００、６２、９４、６５、９７、７３、及び１０５のうちのいずれか１つに示される配列と３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【０４９５】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００に示される配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれ

からなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００に示されるＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一である配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００に示されるＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一である配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６８又は１００に示される配列と３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【０４９６】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４に示される配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４に示されるＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一である配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４に示されるＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一である配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６２又は９４に示される配列と３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【０４９７】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７に示される配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７に示されるＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一である配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７に示されるＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一である配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号６５又は９７に示される配列と３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【０４９８】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番

号７３又は１０５に示される配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５に示されるＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一である配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５に示されるＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一である配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号７３又は１０５に示される配列と３以下、２以下、又は１以下のヌクレオチドの異なる配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【０４９９】

（４）ガイドＲＮＡ標的配列

ガイドＲＮＡの標的ＤＮＡには、結合に十分な条件が存在する場合に、ｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントが結合するＤＮＡに存在する核酸配列が含まれる。好適なＤＮＡ／ＲＮＡ結合条件には、細胞に通常存在する生理学的条件が含まれる。他の好適なＤＮＡ／ＲＮＡ結合条件（例えば、無細胞系における条件）は、当該技術分野で既知である（例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ Ｅｄ．（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ ２００１）を参照されたい）。ｇＲＮＡに相補的であり、かつそれとハイブリダイズする標的ＤＮＡの鎖は、「相補的鎖」と呼ばれ得、「相補的鎖」に相補的である（したがって、Ｃａｓタンパク質又はｇＲＮＡに相補的ではない）標的ＤＮＡの鎖は、「非相補的鎖」又は「鋳型鎖」と呼ばれ得る。

【０５００】

標的ＤＮＡは、ガイドＲＮＡがハイブリダイズする相補的鎖上の配列と非相補的鎖上の対応する配列（例えば、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に隣接する）の両方を含む。「ガイドＲＮＡ標的配列」という用語は、本明細書で使用される場合、具体的には、ガイドＲＮＡが相補鎖上でハイブリダイズする配列に対応する（すなわち、その逆相補体）非相補的鎖上の配列を指す。すなわち、ガイドＲＮＡ標的配列は、ＰＡＭに隣接する非相補的鎖上の配列（例えば、Ｃａｓ９の場合、ＰＡＭの上流又は５’）を指す。ガイドＲＮＡ標的配列は、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントと同等であるが、ウラシルの代わりにチミンを含む。一例として、ＳｐＣａｓ９酵素のガイドＲＮＡ標的配列は、非相補的鎖上の５’－ＮＧＧ－３’ＰＡＭの上流の配列を指し得る。ガイドＲＮＡは、標的ＤＮＡの相補的鎖に対して相補性を有するように設計されており、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補的鎖との間のハイブリダイゼーションは、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する。ハイブリダイゼーションを引き起こし、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進するのに十分な相補性があれば、完全な相補性は必ずしも必要ではない。ガイドＲＮＡが本明細書でガイドＲＮＡ標的配列を標的とするものとして言及される場合、それは、ガイドＲＮＡが、非相補的鎖上のガイドＲＮＡ標的配列の逆相補体である標的ＤＮＡの相補的鎖配列にハイブリダイズすることを意味する。

【０５０１】

標的ＤＮＡ又はガイドＲＮＡ標的配列は、任意のポリヌクレオチドを含み得、例えば、細胞の核又は細胞質内、あるいはミトコンドリア又は葉緑体などの細胞の細胞小器官内に位置し得る。標的ＤＮＡ又はガイドＲＮＡ標的配列は、細胞に対して内因性又は外因性の任意の核酸配列であり得る。ガイドＲＮＡ標的配列は、遺伝子産物（例えば、タンパク質

）をコードする配列又は非コード配列（例えば、調節配列）であり得るか、又は両方を含み得る。

【０５０２】

Ｃａｓタンパク質による標的ＤＮＡの部位特異的結合及び切断は、（ｉ）ガイドＲＮＡと標的ＤＮＡの相補的鎖との間の塩基対合相補性、及び（ｉｉ）標的ＤＮＡの非相補的鎖におけるプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）と呼ばれる短いモチーフの両方によって決定される位置で起こり得る。ＰＡＭは、ガイドＲＮＡ標的配列に隣接し得る。任意選択的に、ガイドＲＮＡ標的配列は、３’末端でＰＡＭが隣接し得る（例えば、Ｃａｓ９の場合）。代替的に、ガイドＲＮＡ標的配列は、５’末端でＰＡＭが隣接し得る（例えば、Ｃｐｆ１の場合）。例えば、Ｃａｓタンパク質の切断部位は、ＰＡＭ配列の上流又は下流（例えば、ガイドＲＮＡ標的配列内）の約１～約１０又は約２～約５塩基対（例えば、３塩基対）であり得る。ＳｐＣａｓ９の場合、ＰＡＭ配列（すなわち、非相補的鎖上）は、５’－N_1ＧＧ－３’であり得、式中、N_1は、任意のＤＮＡヌクレオチドであり、ＰＡＭは、標的ＤＮＡの非相補的鎖上のガイドＲＮＡ標的配列の３’のすぐ近くである。したがって、相補的鎖上のＰＡＭに対応する（すなわち、逆相補体）配列は、５’－ＣＣN_2－３’であり、式中、N_2は、任意のＤＮＡヌクレオチドであり、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントが標的ＤＮＡの相補的鎖上でハイブリダイズする配列の５’のすぐ近くである。いくつかのそのような場合、N_1及びN_2は、相補的であり得、N_1～N_2塩基対は、任意の塩基対であり得る（例えば、N_1＝Ｃ及びN_2＝Ｇ、N_1＝Ｇ及びN_2＝Ｃ、N_1＝Ａ及びN_2＝Ｔ、又はN_1＝Ｔ及びN_2＝Ａ）。Ｓ．ａｕｒｅｕｓからの Ｃａｓ９の場合、ＰＡＭは、ＮＮＧＲＲＴ又はＮＮＧＲＲであり得、式中、Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｃ、又はＴであり得、Ｒは、Ｇ又はＡであり得る。Ｃ．ｊｅｊｕｎｉからのＣａｓ９の場合、ＰＡＭは、例えば、ＮＮＮＮＡＣＡＣ又はＮＮＮＮＲＹＡＣであり得、式中、Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｃ、又はＴであり得、Ｒは、Ｇ又はＡであり得る。場合によっては（例えば、ＦｎＣｐｆ１の場合）、ＰＡＭ配列は、５’末端の上流であり得、配列５’－ＴＴＮ－３’を有し得る。ＤｐｂＣａｓＸの場合、ＰＡＭは、配列５’－ＴＴＣＮ－３’を有し得る。Ｃａｓ Φの場合、ＰＡＭは、配列５’－ＴＢＮ－３’を有し得、式中、Ｂは、Ｇ、Ｔ、又はＣである。

【０５０３】

ガイドＲＮＡ標的配列の例は、ＳｐＣａｓ９タンパク質によって認識されるＮＧＧモチーフの直前の２０ヌクレオチドのＤＮＡ配列である。例えば、ガイドＲＮＡ標的配列及びＰＡＭの２つの例は、GN_{19}ＮＧＧ（配列番号５）又はN_{20}ＮＧＧ（配列番号６）である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１４／１６５８２５号を参照されたい。５’末端におけるグアニンは、細胞内のＲＮＡポリメラーゼによる転写を容易にすることができる。ガイドＲＮＡ標的配列及びＰＡＭの他の例は、インビトロでのＴ７ポリメラーゼによる効率的な転写を容易にするために、５’末端に２つのグアニンヌクレオチドを含み得る（例えば、ＧＧN_{20}ＮＧＧ、配列番号７）。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１４／０６５５９６号を参照されたい。他のガイドＲＮＡ標的配列及びＰＡＭは、５’Ｇ又はＧＧ及び３’ＧＧ又はＮＧＧを含む、配列番号５～７の４～２２ヌクレオチド長を有し得る。更に他のガイドＲＮＡ標的配列及びＰＡＭは、配列番号５～７の１４～２０ヌクレオチド長を有し得る。

【０５０４】

標的ＤＮＡにハイブリダイズしたＣＲＩＳＰＲ複合体の形成は、ガイドＲＮＡ標的配列（すなわち、標的ＤＮＡの非相補的鎖上のガイドＲＮＡ標的配列及びガイドＲＮＡがハイブリダイズする相補的鎖上の逆相補体）に対応する領域内又は領域の近くの標的ＤＮＡの一方又は両方の鎖の切断をもたらし得る。例えば、切断部位は、ガイドＲＮＡ標的配列内にあり得る（例えば、ＰＡＭ配列に対して定義された位置に）。「切断部位」は、Ｃａｓタンパク質が一本鎖切断又は二本鎖切断を生成する標的ＤＮＡの位置を含む。切断部位は、一本鎖のみ（例えば、ニッカーゼが使用される場合）又は二本鎖ＤＮＡの両方の鎖上にあり得る。切断部位は、両方の鎖の同じ位置（平滑末端を生成する、例えば、Ｃａｓ９）

にあってもよく、又は各鎖の異なる部位（付着末端（すなわち、オーバーハング）を生成する、例えば、Ｃｐｆ１）にあってもよい。付着末端は、例えば、その各々が異なる鎖上の異なる切断部位で一本鎖切断を生成し、それによって二本鎖切断を生成する２つのＣａｓタンパク質を使用することによって生成され得る。例えば、第１のニッカーゼは、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）の第１の鎖上に一本鎖切断を作製することができ、第２のニッカーゼは、オーバーハング配列が作製されるようにｄｓＤＮＡの第２の鎖上に一本鎖切断を作製することができる。場合によっては、第１の鎖上のニッカーゼのガイドＲＮＡ標的配列又は切断部位は、第２の鎖上のニッカーゼのガイドＲＮＡ標的配列又は切断部位から、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、７５、１００、２５０、５００、又は１，０００塩基対離れている。

【０５０５】

ガイドＲＮＡ標的配列は、オフターゲット修飾を最小限に抑えるか、又はオフターゲット効果を回避するように選択することもできる（例えば、オフターゲットゲノム配列とのミスマッチが２つ以下になることを回避することによって）。

【０５０６】

一例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１２６～１５７のうちのいずれか１つに示されるガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１２６～１５７のうちのいずれか１つに示されるガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを標的とすることができる。

【０５０７】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１３２、１２６、１２９、及び１３７のうちのいずれか１つに示されるガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１３２、１２６、１２９、及び１３７のうちのいずれか１つに示されるガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを標的とすることができる。

【０５０８】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１３２に示されるガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１３２に示されるガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを標的とすることができる。

【０５０９】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１２６に示されるガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１２６に示されるガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを標的とすることができる。

【０５１０】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１２９に示されるガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１２９に示されるガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを標的とすることができる。

【０５１１】

別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１３７に示されるガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１３７に示される

ガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、又は少なくとも２０の連続するヌクレオチドを標的とすることができる。

【０５１２】

【表６】

表６．ヒトＡＬＢイントロン１ガイドＲＮＡ標的配列。

ガイドRNA標的配列	配列番号:
GAGCAACCTCACTCTTGTCT	126
ATGCATTTGTTTCAAAATAT	127
TGCATTTGTTTCAAAATATT	128
ATTTATGAGATCAACAGCAC	129
GATCAACAGCACAGGTTTTG	130
TTAAATAAAGCATAGTGCAA	131
TAAAGCATAGTGCAATGGAT	132
TAGTGCAATGGATAGGTCTT	133
TACTAAAACTTTATTTTACT	134
AAAGTTGAACAATAGAAAAA	135
AATGCATAATCTAAGTCAAA	136
TAATAAAATTCAAACATCCT	137
GCATCTTTAAAGAATTATTT	138
TTTGGCATTTATTTCTAAAA	139
TGTATTTGTGAAGTCTTACA	140
TCCTAGGTAAAAAAAAAAAA	141
TAATTTTCTTTTGCGCACTA	142
TGACTGAAACTTCACAGAAT	143
GACTGAAACTTCACAGAATA	144
TTCATTTTAGTCTGTCTTCT	145
ATTATCTAAGTTTGAATATA	146
AATTTTTAAAATAGTATTCT	147
TGAATTATTCTTCTGTTTAA	148
ATCATCCTGAGTTTTTCTGT	149
TTACTAAAACTTTATTTTAC	150
ACCTTTTTTTTTTTTTTACCT	151
AGTGCAATGGATAGGTCTTT	152
TGATTCCTACAGAAAAACTC	153
TGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	154
CCTCACTCTTGTCTGGGCAA	155
ACCTCACTCTTGTCTGGGCA	156
TGAGCAACCTCACTCTTGTC	157

【０５１３】

【表７】

表７．マウスＡｌｂイントロン１ガイドＲＮＡ標的配列。

ガイドRNA標的配列	配列番号:
CACTCTTGTCTGTGGAAACA	229

【０５１４】

（５）ヌクレアーゼ剤を含む脂質ナノ粒子

ヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）を含む脂質ナノ粒子も提供される。脂質ナノ粒子は、代替的又は追加的に、本明細書に開示されるＦ９核酸構築物を含むことができる。例えば、脂質ナノ粒子は、ヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）を含むことができるか、Ｆ９核酸構築物を含むことができるか、又はヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）及びＦ９核酸構築物の両方を含むことができる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系に関して、脂質ナノ粒子は、任意の形態（例えば、タンパク質、ＤＮＡ、又はｍＲＮＡ）でＣａｓタンパク質を含むことができ、かつ／又は任意の形態（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ）でガイドＲＮＡを含むことができる。一例では、脂質ナノ粒子

は、ｍＲＮＡの形態でＣａｓタンパク質（例えば、本明細書に記載の修飾ＲＮＡ）及びＲＮＡの形態でガイドＲＮＡ（例えば、本明細書に開示される修飾ガイドＲＮＡ）を含む。別の例として、脂質ナノ粒子は、タンパク質の形態でＣａｓタンパク質及びＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含むことができる）。具体的な例では、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質はそれぞれ、同じＬＮＰでのＬＮＰ媒介送達を介してＲＮＡの形態で導入される。本明細書の他の場所でより詳細に論じられるように、ＲＮＡのうちの１つ以上が修飾され得る。例えば、ガイドＲＮＡは、５’末端及び／又は３’末端に１つ以上の安定化末端修飾を含むように修飾され得る。そのような修飾には、例えば、５’末端及び／若しくは３’末端の１つ以上のホスホロチオエート連結、並びに／又は５’末端及び／若しくは３’末端の１つ以上の２’－Ｏ－メチル修飾が含まれ得る。別の例として、Ｃａｓ　ｍＲＮＡ修飾は、シュードウリジンでの置換（例えば、シュードウリジンで完全に置換される）、５’キャップ、及びポリアデニル化を含み得る。別の例として、Ｃａｓ　ｍＲＮＡ修飾は、Ｎ１－メチル－シュードウリジンでの置換（例えば、Ｎ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換される）、５’キャップ、及びポリアデニル化を含み得る。他の修飾もまた、本明細書の他の場所に開示されるように企図される。そのような方法による送達は、一過性のＣａｓ発現及び／又は一過性のガイドＲＮＡの存在をもたらし得、生分解性脂質はクリアランスを改善し、忍容性を改善し、免疫原性を減少させる。脂質製剤は、生体分子を分解から保護すると同時に、細胞への取り込みを改善することができる。脂質ナノ粒子は、分子間力によって互いに物理的に結合した複数の脂質分子を含む粒子である。これらには、ミクロスフェア（単層及び多層ベシクル、例えば、リポソームを含む）、エマルジョン中の分散相、ミセル、又は懸濁液中の内相が含まれる。そのような脂質ナノ粒子は、送達のために１つ以上の核酸又はタンパク質をカプセル化するために使用することができる。カチオン性脂質を含む製剤は、核酸などのポリアニオンを送達するのに有用である。含めることができる他の脂質は、中性脂質（すなわち、非荷電又は両性イオン脂質）、アニオン性脂質、トランスフェクションを増強するヘルパー脂質、及びナノ粒子がインビボで存在することができる時間の長さを増加させるステルス脂質である。好適なカチオン性脂質、中性脂質、アニオン性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質の例は、全ての目的のためにそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１６／０１０８４０（Ａ１）号及び国際公開第２０１７／１７３０５４（Ａ１）号に見出すことができる。例示的な脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質及び１つ以上の他の成分を含むことができる。一例において、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質を含むことができる。別の例において、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質及びＤＳＰＣなどの中性脂質を含むことができる。別の例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質、ＤＳＰＣなどの任意選択的な中性脂質、及びＳ０１０、Ｓ０２４、Ｓ０２７、Ｓ０３１、又はＳ０３３などのステルス脂質を含むことができる。

【０５１５】

ＬＮＰは、以下のうちの１つ以上又は全てを含有してもよい：（ｉ）カプセル化及びエンドソーム脱出のための脂質、（ｉｉ）安定化のための中性脂質、（ｉｉｉ）安定化のためのヘルパー脂質、及び（ｉｖ）ステルス脂質。例えば、Ｆｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ．２２（９）：２２２７－２２３５及び国際公開第２０１７／１７３０５４（Ａ１）号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ある特定のＬＮＰにおいて、カーゴは、ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする核酸を含み得る。特定のＬＮＰにおいて、カーゴは、Ｃａｓ９などのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、及びガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする核酸を含み得る。ある特定のＬＮＰにおいて、カーゴは、本明細書の他の場所で記載されるようなＦ９核酸構築物を含み得る。ある特定のＬＮＰにおいて、カーゴは、Ｃａｓ９などのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする核酸、及びＦ９核酸構築物を含み得る。いくつかのＬＮＰにおいて、脂質成分は、生分解性のイオン化可能脂質などのアミン脂質を含む。いくつかの例では、脂質成分は、生分解性のイオン化可能脂質、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ－

ＤＭＧを含む。例えば、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡは、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアート）とも呼ばれるイオン化可能脂質（（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアート、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む脂質製剤を利用して細胞及び動物に送達することができる。

【０５１６】

いくつかの例では、ＬＮＰは、カチオン性脂質を含む。いくつかの例では、ＬＮＰは、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアート）とも呼ばれる、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアート、又は別のイオン化可能脂質を含む。例えば、国際公開第２０１９／０６７９９２号、国際公開第２０１７／１７３０５４号、国際公開第２０１５／０９５３４０号、及び国際公開第２０１４／１３６０８６号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの例では、ＬＮＰは、約４．５、約５．０、約５．５、約６．０、又は約６．５のカチオン性脂質アミン対ＲＮＡリン酸のモル比（Ｎ：Ｐ）を含む。いくつかの例では、ＬＮＰ脂質の文脈におけるカチオン性及びイオン化可能という用語は、互換的である（例えば、イオン化可能脂質はｐＨに応じてカチオン性である）。

【０５１７】

カプセル化及びエンドソーム脱出のための脂質は、カチオン性脂質であり得る。脂質はまた、生分解性イオン化可能脂質などの生分解性脂質であり得る。好適な脂質の一例は、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアートとも呼ばれる、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアートである脂質Ａ又はＬＰ０１である。例えば、Ｆｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ．２２（９）：２２２７－２２３５及び国際公開第２０１７／１７３０５４（Ａ１）号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。好適な脂質の別の例は、（（５－（（ジメチルアミノ）メチル）－１，３－フェニレン）ビス（オキシ））ビス（オクタン－８，１－ジイル）ビス（デカノアート）とも呼ばれる、（（５－（（ジメチルアミノ）メチル）－１，３－フェニレン）ビス（オキシ））ビス（オクタン－８，１－ジイル）ビス（デカノアート）である脂質Ｂである。好適な脂質の別の例は、２－（（４－（（（３－（ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）ヘキサデカノイル）オキシ）プロパン－１，３－ジイル（９Ｚ，９’Ｚ，１２Ｚ，１２’Ｚ）－ビス（オクタデカ－９，１２－ジエノアート）である脂質Ｃである。好適な脂質の別の例は、３－（（（３－（ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）－１３－（オクタノイルオキシ）トリデシル３－オクチルウンデカノアートである脂質Ｄである。他の好適な脂質には、ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタノアート（[（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル]４－（ジメチルアミノ）ブタノアート又はＤｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（ＭＣ３））としても既知である）が含まれる。

【０５１８】

本明細書に記載のＬＮＰにおける使用に好適ないくつかのそのような脂質は、インビボ

で生分解性である。例えば、そのような脂質を含むＬＮＰには、脂質の少なくとも７５％が、８、１０、１２、２４、若しくは４８時間以内、又は３、４、５、６、７、若しくは１０日以内に血漿から除去されるものが含まれる。別の例として、ＬＮＰの少なくとも５０％が、８、１０、１２、２４、若しくは４８時間以内、又は３、４、５、６、７、若しくは１０日以内に血漿から除去される。

【０５１９】

そのような脂質は、それらが含まれる培地のｐＨに応じてイオン化可能であり得る。例えば、わずかに酸性の培地では、脂質は、プロトン化され、したがって正電荷を帯びることができる。逆に、例えば、ｐＨが約７．３５である血液などのわずかに塩基性の媒体では、脂質はプロトン化されない可能性があり、したがって電荷を帯びない可能性がある。いくつかの実施形態では、脂質は、少なくとも約９、９．５、又は１０のｐＨでプロトン化され得る。そのような脂質が電荷を帯びる能力は、その固有のｐＫａに関連している。例えば、脂質は、独立して、約５．８～約６．２の範囲のｐＫａを有し得る。

【０５２０】

中性脂質は、ＬＮＰを安定化し、そのプロセシングを改善するよう機能する。好適な中性脂質の例には、様々な中性、非荷電、又は両性イオン脂質が含まれる。本開示における使用に好適な中性リン脂質の例には、５－ヘプタデシルベンゼン－１，３－ジオール（レゾルシノール）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（dipalmitoylphosphatidylcholine、ＤＰＰＣ）、ジステロイルホスファチジルコリン、又は１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、ホスホコリン（phosphocholine、ＤＯＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（dimyristoylphosphatidylcholine、ＤＭＰＣ）、ホスファチジルコリン（phosphatidylcholine、ＰＬＰＣ）、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（1,2-diarachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine、ＤＡＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン（phosphatidylethanolamine、ＰＥ）、卵ホスファチジルコリン（egg phosphatidylcholine、ＥＰＣ）、ジラウリロイルホスファチジルコリン（dilauryloylphosphatidylcholine、ＤＬＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（dimyristoylphosphatidylcholine、ＤＭＰＣ）、１－ミリストイル－２－パルミトイルホスファチジルコリン（1-myristoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine、ＭＰＰＣ）、１－パルミトイル－２－ミリストイルホスファチジルコリン（1-palmitoyl-2-myristoyl phosphatidylcholine、ＰＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－ステアロイルホスファチジルコリン（1-palmitoyl-2-stearoyl phosphatidylcholine、ＰＳＰＣ）、１，２－ジアラキドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine、ＤＢＰＣ）、１－ステアロイル－２－パルミトイルホスファチジルコリン（1-stearoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine、ＳＰＰＣ）、１，２－ジエイコセノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（1,2-dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine、ＤＥＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（palmitoyloleoyl phosphatidylcholine、ＰＯＰＣ）、リソホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（dioleoyl phosphatidylethanolamine、ＤＯＰＥ）、ジリノレオイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（dilinoleoylphosphatidylcholine distearoyl phosphatidylethanolamine、ＤＳＰＥ）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（dimyristoyl phosphatidylethanolamine、ＤＭＰＥ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（dipalmitoyl phosphatidylethanolamine、ＤＰＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（palmitoyloleoyl phosphatidylethanolamine、ＰＯＰＥ）、イソホスファチジルエタノールアミン、１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine、ＳＯＰＣ）、及びそれらの組み合わせが含まれるが、それらに限定されない。例えば、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、及びジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（

ＤＭＰＥ）からなる群から選択され得る。
【０５２１】
ヘルパー脂質には、トランスフェクションを増強する脂質が含まれる。ヘルパー脂質がトランスフェクションを増強する機構は、粒子安定性を増強することを含み得る。場合によっては、ヘルパー脂質は、膜の融合性を増強することができる。ヘルパー脂質は、ステロイド、ステロール、及びアルキルレゾルシノールを含む。好適な好適なヘルパー脂質の例には、コレステロール、５－ヘプタデシルレゾルシノール、及びヘミコハク酸コレステロールが含まれる。一例では、ヘルパー脂質は、コレステロール又はヘミコハク酸コレステロールであり得る。
【０５２２】
ステルス脂質は、ナノ粒子がインビボで存在することができる時間の長さを変える脂質を含む。ステルス脂質は、例えば、粒子凝集を低減させ、粒子サイズを制御することによって、製剤化プロセスにおいて支援し得る。ステルス脂質は、ＬＮＰの薬物動態特性を調節し得る。好適なステルス脂質には、脂質部分に連結された親水性頭部基を有する脂質が含まれる。
【０５２３】
ステルス脂質の親水性頭部基は、例えば、ＰＥＧ（しばしば、ポリ（エチレンオキシド）と称される）、ポリ（オキサゾリン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（グリセロール）、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリアミノ酸、及びポリＮ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドに基づくポリマーから選択されるポリマー部分を含むことができる。ＰＥＧという用語は、ポリエチレングリコール又は他のポリアルキレンエーテルポリマーを意味する。特定のＬＮＰ製剤において、ＰＥＧはＰＥＧ２０００とも呼ばれるＰＥＧ－２Ｋであり、平均分子量は約２，０００ダルトンである。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１７／１７３０５４（Ａ１）号を参照されたい。
【０５２４】
ステルス脂質の脂質部分は、例えば、独立して約Ｃ４～約Ｃ４０の飽和又は不飽和の炭素原子を含むアルキル鎖長を有するジアルキルグリセロール又はジアルキルグリカミド基を含むものを含むジアシルグリセロール又はジアシルグリカミドに由来し得、ここで鎖は１つ以上の、例えば、アミド又はエステルなどの官能基を含み得る。ジアルキルグリセロール又はジアルキルグリカミド基は、１つ以上の置換アルキル基を更に含み得る。
【０５２５】
一例として、ステルス脂質は、ＰＥＧ－ジラウロイルグリセロール、ＰＥＧ－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリセロール、ＰＥＧ－ジステアロイルグリセロール（PEG-distearoylglycerol、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）、ＰＥＧ－ジラウリルグリカミド、ＰＥＧ－ジミリスチルグリカミド、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリカミド、及びＰＥＧ－ジステアロイルグリカミド、ＰＥＧ－コレステロール（ｌ－［８’－（コレスト－５－エン－３［ベータ］－オキシ）カルボキシアミド－３’，６’－ジオキサオクタニル］カルバモイル－［オメガ］－メチル－ポリ（エチレングリコール）、ＰＥＧ－ＤＭＢ（３，４－ジテトラデコキシルベンジル－［オメガ］－メチル－ポリ（エチレングリコール）エーテル）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＰＥ）、又は１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メチルポリオキシエチレングリコール－２０００（ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]、ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＰＥ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（1,2-distearoyl-sn-glycerol、methoxypoly ethylene glycol、ＰＥＧ

２ｋ－ＤＳＧ）、ポリ（エチレングリコール）－２０００－ジメタクリレート（poly(ethylene glycol)-2000-dimethacrylate、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＡ）、及び１，２－ジステアリルオキシプロピル－３－アミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（1,2-distearyloxypropyl-3-amine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]、ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＡ）から選択され得る。１つの特定の例では、ステルス脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧであり得る。

【０５２６】

いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質は、グリセロール基を含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ジミリストイルグリセロール（ＤＭＧ）基を含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ脂質は、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００である。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧは、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００である。

【０５２７】

ＬＮＰは、製剤中の成分脂質の異なるそれぞれのモル比を含むことができる。ＣＣＤ脂質のモル％は、例えば、約３０モル％～約６０モル％、約３５モル％～約５５モル％、約４０モル％～約５０モル％、約４２モル％～約４７モル％、又は約４５％であり得る。ヘルパー脂質のモル％は、例えば、約３０モル％～約６０モル％、約３５モル％～約５５モル％、約４０モル％～約５０モル％、約４１モル％～約４６モル％、又は約４４モル％であり得る。中性脂質のモル％は、例えば、約１モル％～約２０モル％、約５モル％～約１５モル％、約７モル％～約１２モル％、又は約９モル％であり得る。ステルス脂質のモル％は、例えば、約１モル％～約１０モル％、約１モル％～約５モル％、約１モル％～約３モル％、約２モル％、又は約１モル％であり得る。

【０５２８】

ＬＮＰは、生分解性脂質（Ｎ）の正に帯電したアミン基と、カプセル化される核酸の負に帯電したリン酸基（Ｐ）との間で異なる比を有することができる。これは、方程式Ｎ／Ｐによって数学的に表すことができる。例えば、Ｎ／Ｐ比は、約０．５～約１００、約１～約５０、約１～約２５、約１～約１０、約１～約７、約３～約５、約４～約５、約４、約４．５、又は約５であり得る。Ｎ／Ｐ比はまた、約４～約７又は約４．５～約６であり得る。具体的な例では、Ｎ／Ｐ比は、４．５であり得るか、又は６であり得る。

【０５２９】

いくつかのＬＮＰにおいて、カーゴは、Ｃａｓ　ｍＲＮＡ（例えば、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ）及びｇＲＮＡを含むことができる。Ｃａｓ　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡは、異なる比にあり得る。例えば、ＬＮＰ製剤は、約２５：１～約１：２５の範囲、約１０：１～約１：１０の範囲、約５：１～約１：５の範囲、又は約１：１のＣａｓ　ｍＲＮＡとｇＲＮＡ核酸との比を含み得る。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１～約１：５、又は約１０：１のＣａｓ　ｍＲＮＡとｇＲＮＡ核酸との比を含み得る。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１０、２５：１、１０：１、５：１、３：１、１：１、１：３、１：５、１：１０、又は１：２５のＣａｓ　ｍＲＮＡとｇＲＮＡ核酸との比を含み得る。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約２：１～約１：２のＣａｓ　ｍＲＮＡとｇＲＮＡ核酸との比を含み得る。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１～約１：２の、Ｃａｓ　ｍＲＮＡとｇＲＮＡ核酸との比を含み得る。具体的な例では、Ｃａｓ　ｍＲＮＡとｇＲＮＡとの比は、約１：１であり得る。具体的な例では、Ｃａｓ　ｍＲＮＡとｇＲＮＡとの比は、約１：２であり得る。具体的な例では、Ｃａｓ　ｍＲＮＡとｇＲＮＡとの比は、約２：１であり得る。

【０５３０】

ＬＮＰの例示的な投薬は、総ＲＮＡ（Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ）カーゴ含有量に関して約０．１、約０．２５、約０．３、約０．５、約１、約２、約３、約４、約５、約６、約８、若しくは約１０ｍｇ／ｋｇ体重（ｍｐｋ）、又は約０．１～約１０、約０．

２５～約１０、約０．３～約１０、約０．５～約１０、約１～約１０、約２～約１０、約３～約１０、約４～約１０、約５～約１０、約６～約１０、約８～約１０、約０．１～約８、約０．１～約６、約０．１～約５、約０．１～約４、約０．１～約３、約０．１～約２、約０．１～約１、約０．１～約０．５、約０．１～約０．３、約０．１～約０．２５、約０．２５～約８、約０．３～約６、約０．５～約５、約１～約５、若しくは約２～約３ｍｇ／ｋｇ体重を含む。そのようなＬＮＰは、例えば、静脈内に投与することができる。一例では、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ、約０．１～約１０ｍｇ／ｋｇ、又は約０．０１～約０．３ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量を使用することができる。例えば、約０．０１、約０．０３、約０．１、約０．３、約０．５、約１、約２、約３、約４、約５、約６、約８又は約１０ｍｇ／ｋｇ（ｍｐｋ）体重、又は約０．１～約１０、約０．２５～約１０、約０．３～約１０、約０．５～約１０、約１～約１０、約２～約１０、約３～約１０、約４～約１０、約５～約１０、約６～約１０、約８～約１０、約０．１～約８、約０．１～約６、約０．１～約５、約０．１～約４、約０．１～約３、約０．１～約２、約０．１～約１、約０．１～約０．５、約０．１～約０．３、約０．１～約０．２５、約０．２５～約８、約０．３～約６、約０．５～約５、約１～約５、若しくは約２～約３ｍｇ／ｋｇの体重が含まれる。そのようなＬＮＰは、例えば、静脈内に投与することができる。一例では、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ、約０．１～約１０ｍｇ／ｋｇ、又は約０．０１～約０．３ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量を使用することができる。例えば、約０．０１、約０．０３、約０．１、約０．３、約０．５、約１、約２、約３、又は約１０ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量を使用することができる。別の例では、約０．５～約１０、約０．５～約５、約０．５～約３、約１～約１０、約１～約５、約１～約３、又は約１～約２ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量を使用することができる。別の例では、約０．５～約３、約０．５～約２．５、約０．５～約２、約０．５～約１．５、約０．５～約１、約１～約３、約１～約２．５、約１～約２、又は約１～約１．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量を使用することができる。別の例では、約１ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量を使用することができる。

【０５３１】

いくつかのＬＮＰにおいて、カーゴは、Ｆ９核酸構築物及びｇＲＮＡを含むことができる。Ｆ９核酸構築物及びｇＲＮＡは、異なる比にあり得る。例えば、ＬＮＰ製剤は、約２５：１～約１：２５の範囲、約１０：１～約１：１０の範囲、約５：１～約１：５の範囲、又は約１：１のＦ９核酸構築物とｇＲＮＡ核酸との比を含み得る。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１～約１：５、約５：１～約１：１、約１０：１、又は約１：１０のＦ９核酸構築物とｇＲＮＡ核酸との比を含み得る。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１０、約２５：１、約１０：１、約５：１、約３：１、約１：１、約１：３、約１：５、約１：１０、又は約１：２５のＦ９核酸構築物とｇＲＮＡ核酸との比を含み得る。

【０５３２】

好適なＬＮＰの具体的な例は、約４．５の窒素対リン酸塩（Ｎ／Ｐ）比を有し、約４５：４４：９：２のモル比（約４５：約４４：約９：約２）で生分解性カチオン性脂質、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含有する。生分解性カチオン性脂質は、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアートとも呼ばれる、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアートであり得る。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｆｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ．２２（９）：２２２７－２２３５を参照されたい。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約１：１（約１：約１）にすることができる。好適なＬＮＰの別の具体的な例は、約５０：３

８．５：１０：１．５のモル比（約５０：約３８．５：約１０：約１．５）で、Ｄｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（ＭＣ３）、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ－ＤＭＧを含有する。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約１：２（約１：約２）にすることができる。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約１：１（約１：約１）にすることができる。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約２：１（約２：約１）にすることができる。

【０５３３】

好適なＬＮＰの別の具体的な例は、約６の窒素対リン酸塩（Ｎ／Ｐ）比を有し、約５０：３８：９：３のモル比（約５０：約３８：約９：約３）で生分解性カチオン性脂質、コレステロール、ＤＳＰＣ、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含有する。生分解性カチオン性脂質は、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアート）とも呼ばれる、脂質Ａ（（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアートであり得る。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約１：２（約１：約２）にすることができる。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約１：１（約１：約１）にすることができる。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約２：１（約２：約１）にすることができる。

【０５３４】

好適なＬＮＰの別の具体的な例は、約３の窒素対リン酸塩（Ｎ／Ｐ）比を有し、約５０：１０：３８．５：１．５の比（約５０：約１０：約３８．５：約１．５）又は約４７：１０：４２：１の比（約４７：約１０：約４２：約１）で、カチオン性脂質、構造脂質、コレステロール（例えば、コレステロール（ヒツジ）（Ａｖａｎｔｉ　７００００））、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ（例えば、ＰＥＧ－ＤＭＧ　２０００（ＮＯＦ　Ａｍｅｒｉｃａ－ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ（登録商標）ＧＭ－０２０（ＤＭＧ－ＰＥＧ））を含有する。構造脂質は、例えば、ＤＳＰＣ（例えば、ＤＳＰＣ（Ａｖａｎｔｉ　８５０３６５））、ＳＯＰＣ、ＤＯＰＣ、又はＤＯＰＥであり得る。カチオン性／イオン化可能脂質は、例えば、Ｄｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（例えば、Ｄｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（Ｂｉｏｆｉｎｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ））であり得る。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約１：２（約１：約２）にすることができる。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約１：１（約１：約１）にすることができる。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約２：１（約２：約１）にすることができる。

【０５３５】

好適なＬＮＰの別の具体的な例は、約４５：９：４４：２の比（約４５：約９：約４４：約２）でＤｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ脂質を含有する。好適なＬＮＰの別の具体的な例は、約５０：１０：３９：１の比（約５０：約１０：約３９：約１）でＤｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＯＰＥ、コレステロール、及びＰＥＧ脂質又はＰＥＧ　ＤＭＧを含有する。好適なＬＮＰの別の具体的な例は、約５５：１０：３２．５：２．５の比（約５５：約１０：約３２．５：約２．５）でＤｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを有する。好適なＬＮＰの別の具体的な例は、約５０：１０：３８．５：１．５の比（約５０：約１０：約３８．５：約１．５）でＤｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ－ＤＭＧを有する。好適なＬＮＰの別の具体的な例は、約５０：１０：３８．５：１．５の比（約５０：約１０：約３８．５：約１．５）でＤｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、コレステロール、及びＰＥＧ－ＤＭＧを有する。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約１：２（約１：約２）にすることができる。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約１：１（約１：約１）にすることができる。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で約２：１（約２：約１）にすることができる。

【０５３６】

好適なＬＮＰの他の例は、例えば、国際公開第２０１９／０６７９９２号、国際公開第２０２０／０８２０４２号、米国特許出願公開第２０２０／０２７０６１７号、国際公開第２０２０／０８２０４１号、米国特許出願公開第２０２０／０２６８９０６号、国際公開第２０２０／０８２０４６号（例えば、ｐｐ．８５－８６を参照されたい）、及び米国特許出願公開第２０２０／０２８９６２８号に見出すことができ、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０５３７】

（６）ヌクレアーゼ剤を含むベクター

本明細書に開示されるヌクレアーゼ剤（例えば、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ）は、発現のためのベクターで提供され得る。ベクターは、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を含むことができる。

【０５３８】

いくつかのベクターは、環状であり得る。代替的に、ベクターは、直線状であり得る。ベクターは、脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、又はウイルスキャプシドを介して送達されるようにパッケージすることができる。非限定的な例示的なベクターとしては、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体、ミニ染色体、トランスポゾン、ウイルスベクター、及び発現ベクターが挙げられる。

【０５３９】

核酸の導入は、ＡＡＶ媒介送達又はレンチウイルス媒介送達などのウイルス媒介送達によっても達成することができる。ベクターは、例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターなどのウイルスベクターであり得る。ＡＡＶは任意の好適な血清型であり得、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）又は自己相補的ＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）であり得る。他の例示的なウイルス／ウイルスベクターには、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、及び単純ヘルペスウイルスが含まれる。ウイルスは、分裂細胞、非分裂細胞、又は分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染し得る。ウイルスは、宿主ゲノムに組み込むことができるか、又は代替的に宿主ゲノムに組み込まない。このようなウイルスは、免疫力が低減するように操作することもできる。ウイルスは、複製可能であり得、複製欠損性（例えば、ビリオン複製及び／又はパッケージングの追加ラウンドに必要な１つ以上の遺伝子に欠損がある）であり得る。ウイルスは、一過性の発現、長期的な発現（例えば、少なくとも１週間、２週間、１ヶ月、２ヶ月、又は３ヶ月）、又は永続的な発現（例えば、Ｃａｓ及び／又はｇＲＮＡの）を引き起こし得る。ウイルスベクターは、それらの野生型対応物から遺伝的に修飾され得る。例えば、ウイルスベクターは、クローニングを容易にするために、又はベクターの１つ以上の特性が変化するように、１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含み得る。そのような特性には、パッケージング容量、形質導入効率、免疫原性、ゲノム組み込み、複製、転写、及び翻訳が含まれ得る。いくつかの例では、ウイルスゲノムの一部は、ウイルスがより大きなサイズを有する外因性配列をパッケージングすることができるように欠失され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、増強された形質導入効率を有し得る。いくつかの例では、宿主においてウイルスによって誘導される免疫応答が低減され得る。いくつかの例では、宿主ゲノムへのウイルス配列の組み込みを促進するウイルス遺伝子（インテグラーゼなど）は、ウイルスが非組み込み型になるように変異され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、複製欠損性であり得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、ベクター上のコード配列の発現を駆動するための外因性転写又は翻訳制御配列を含み得る。いくつかの例では、ウイルスは、ヘルパー依存性であり得る。例えば、ウイルスは、ベクターを増幅してウイルス粒子にパッケージングするのに必要とされるウイルス成分（ウイルスタンパク質など）を供給するために、１つ以上のヘルパーウイルスを必要とし得る。そのような場合、ウイルス成分をコードする１つ以上のベクターを含む１つ以上のヘルパー成分が、本明細書に記載のベクター系とともに宿主細胞又は宿主細胞の集団に導入され得る。他の例では、ウイルスは、ヘルパーフリーであり得る。例えば、ウイルスは、ヘルパー

ウイルスなしでベクターを増幅及びパッケージングすることが可能であり得る。いくつかの例では、本明細書に記載のベクター系はまた、ウイルス増幅及びパッケージングに必要とされるウイルス成分をコードし得る。

【０５４０】

例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）としては、約10^{12}、約10^{13}、約10^{14}、約10^{15}及び約10^{16}のベクターゲノム（ｖｇ）／ｍＬ、又は約10^{12}～約10^{16}、約10^{12}～約10^{15}、約10^{12}～約10^{14}、約10^{12}～約10^{13}、約10^{13}～約10^{16}、約10^{14}～約10^{16}、約10^{15}～約10^{16}、若しくは約10^{13}～約10^{15}ｖｇ／ｍＬが挙げられる。他の例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）としては、約10^{12}、約10^{13}、約10^{14}、約10^{15}及び約10^{16}のベクターゲノム（ｖｇ）／ｋｇの体重、又は約10^{12}～約10^{16}、約10^{12}～約10^{15}、約10^{12}～約10^{14}、約10^{12}～約10^{13}、約10^{13}～約10^{16}、約10^{14}～約10^{16}、約10^{15}～約10^{16}、若しくは約10^{13}～約10^{15}ｖｇ／ｋｇの体重が挙げられる。一例では、ウイルス力価は、約10^{13}～約10^{14}ｖｇ／ｍＬ又はｖｇ／ｋｇである。別の例では、ウイルス力価は、約10^{12}～約10^{13}ｖｇ／ｍＬ又はｖｇ／ｋｇ（例えば、約10^{12}～約10^{13}ｖｇ／ｋｇ）である。別の例では、ウイルス力価は、約10^{12}～約10^{14}ｖｇ／ｍＬ又はｖｇ／ｋｇ（例えば、約10^{12}～約10^{14}ｖｇ／ｋｇ）である。例えば、ウイルス力価は、約１．５Ｅ１２～約１．５Ｅ１３ｖｇ／ｋｇであり得るか、約１．５Ｅ１２ｖｇ／ｋｇであり得るか、又は約１．５Ｅ１３ｖｇ／ｋｇであり得る。別の例では、ウイルス力価は、約２Ｅ１３ｖｇ／ｍＬ又はｖｇ／ｋｇである。

【０５４１】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、ヒト及び非ヒト霊長類（ＮＨＰ）を含む複数の種に固有である。現在までに、少なくとも１２種の天然血清型及び数百種の天然バリアントが単離され、特徴付けられている。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．２１：２５５－２７２を参照されたい。ＡＡＶ粒子は、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）ゲノムを含有する非エンベロープ二十面体タンパク質キャプシドから天然に構成される。ＤＮＡゲノムには、ウイルスの複製起点及びパッケージングシグナルとして働く２つの逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接している。ｒｅｐ遺伝子は、ウイルス複製及びパッケージングに必要とされる４つのタンパク質をコードするが、ｃａｐ遺伝子は、ＡＡＶ血清型を規定する３つの構造的キャプシドサブユニット、及びいくつかの血清型においてビリオンアセンブリを促進するアセンブリ活性化タンパク質（ＡＡＰ）をコードする。

【０５４２】

組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）は、現在、治療用導入遺伝子を標的細胞にインビボで送達することによってヒト疾患を治療するための遺伝子療法において使用される最も一般的に使用されるウイルスベクターのうちの１つである。実際、ｒＡＡＶベクターは、天然のＡＡＶに類似した二十面体キャプシドから構成されるが、ｒＡＡＶビリオンは、ＡＡＶタンパク質コード配列又はＡＡＶ複製配列をキャプシド化しない。これらのウイルスベクターは非複製性である。ｒＡＡＶベクターにおいて必要とされる唯一のウイルス配列は、２つのＩＴＲであり、これらは、ｒＡＡＶベクターの製造中にゲノム複製及びパッケージングを誘導するために必要とされる。ｒＡＡＶゲノムは、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠いており、インビボでそれらを非複製性にする。ｒＡＡＶベクターは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を、ＡＡＶ　ＩＴＲに隣接する意図された導入遺伝子カセットと組み合わせて、追加のウイルスヘルパータンパク質とともにトランスで発現させることによって生成される。

【０５４３】

治療用ｒＡＡＶゲノムでは、遺伝子発現カセットは、ＩＴＲ配列の間に配置される。典型的には、ｒＡＡＶゲノムカセットは、治療用導入遺伝子の発現を駆動するためのプロモーター、続いてポリアデニル化配列を含む。ｒＡＡＶ発現カセットに隣接するＩＴＲは、

通常、単離され、組換えウイルスベクターに変換される最初の血清型であるＡＡＶ２に由来する。それ以来、ほとんどのｒＡＡＶ生成方法は、ＡＡＶ２　Ｒｅｐベースのパッケージング系に依存している。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｃｏｌｅｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．８：８７－１０４を参照されたい。

【０５４４】

使用され得るＩＴＲのいくつかの非限定的な例には、配列番号１９６、配列番号１９７、又は配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるＩＴＲが含まれる。ＩＴＲの他の例は、配列番号１９６、配列番号１９７、又は配列番号１９８と比較して１つ以上の変異を含み、配列番号１９６、配列番号１９７、又は配列番号１９８に対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であり得る。本明細書に開示されるいくつかのｒＡＡＶゲノムでは、ヌクレアーゼ剤（又はその成分）をコードする核酸は、両側に同じＩＴＲ（すなわち、５’末端におけるＩＴＲ、及び３’末端におけるＩＴＲの逆相補体）が隣接している。一例では、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。別の例では、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９７を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。一例では、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、５’末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、３’末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。一例では、少なくとも１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、５’末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、３’末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、各末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。本明細書に開示される他のｒＡＡＶゲノムでは、ヌクレアーゼ剤（又はその成分）をコードする核酸は、各末端に異なるＩＴＲが隣接している。一例では、１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり、他の末端におけるＩＴＲは、配列番号１９７を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。別の例では、１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９６を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり、他の末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一例では、１つの末端におけるＩＴＲは、配列番号１９７を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり、他の末端におけるＩＴＲは、配列番号１９８を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【０５４５】

組換えＡＡＶベクターの特定の血清型は、特定の組織に対するそのインビボ指向性に影響を及ぼす。ＡＡＶキャプシドタンパク質は、標的細胞への付着及び侵入を仲介し、続いてエンドソーム脱出及び核への輸送を担う。したがって、ｒＡＡＶベクターを開発する場合の血清型の選択は、どの細胞型及び組織にベクターがインビボで注射された場合に結合及び形質導入する可能性が最も高いかに影響を与える。ｒＡＡＶ８を含むｒＡＡＶのいくつかの血清型は、マウス、ＮＨＰ及びヒトにおいて全身的に送達された場合、肝臓に形質導入することができる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．２１：２５５－２７２を参照されたい。

【０５４６】

核に入ると、ｓｓＤＮＡゲノムはビリオンから放出され、相補的ＤＮＡ鎖が合成されて

二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）分子が生成される。二本鎖ＡＡＶゲノムは、それらのＩＴＲを介して自然に環状化し、染色体外で核内に存続するエピソームになる。したがって、エピソーム遺伝子療法プログラムのために、ｒＡＡＶ送達ｒＡＡＶエピソームは、非分裂細胞において長期のプロモーター駆動遺伝子発現を提供する。しかしながら、このｒＡＡＶ送達エピソームＤＮＡは、細胞が分裂するにつれて希釈される。対照的に、本明細書に記載の遺伝子療法は、長期の遺伝子発現を可能にする遺伝子挿入に基づく。

【０５４７】

特定の配列（例えば、特定の双方向性構築物配列又は特定の一方向性構築物配列）を含む特定のｒＡＡＶが本明細書に開示される場合、それらは、開示される配列又はその配列の逆相補体を包含することを意味する。例えば、本明細書に開示される双方向性又は一方向性構築物が仮定配列５’－ＣＴＧＧＡＣＣＧＡ－３’からなる場合、それはまた、その配列の逆相補体（５’－ＴＣＧＧＴＣＣＡＧ－３’）を包含することを意味する。同様に、双方向性又は一方向性構築物要素を含むｒＡＡＶが特定の５’から３’への順序で本明細書に開示される場合、それらはまた、それらの要素の順序の逆相補体を包含することを意味する。例えば、５’から３’に、第１のスプライスアクセプター、第１のコード配列、第１のターミネーター、第２のターミネーターの逆相補体、第２のコード配列の逆相補体、及び第２のスプライスアクセプターの逆相補体を含む双方向性構築物を含むｒＡＡＶが本明細書に開示される場合、それはまた、５’から３’に、第２のスプライスアクセプター、第２のコード配列、第２のターミネーター、第１のターミネーターの逆相補体、第１のコード配列の逆相補体、及び第１のスプライスアクセプターの逆相補体を含む構築物を包含することを意味する。一本鎖ＡＡＶゲノムは、センス（プラス鎖）又はアンチセンス（マイナス鎖ゲノム）のいずれかとしてパッケージされ、＋及び－極性の一本鎖ＡＡＶゲノムは、等しい頻度で成熟ｒＡＡＶビリオンにパッケージされる。例えば、ＬＩＮＧ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．Ｍｅｄ．９（３）：１７５、Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１６（３）：４９４－４９９、及びＳａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６１：３０９６－３１０１を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０５４８】

ｓｓＤＮＡ　ＡＡＶゲノムは、２つのオープンリーディングフレーム、Ｒｅｐ及びＣａｐからなり、相補的ＤＮＡ鎖の合成を可能にする２つの逆位末端反復が隣接している。ＡＡＶトランスファープラスミドを構築する場合、導入遺伝子は、２つのＩＴＲの間に配置され、Ｒｅｐ及びＣａｐは、トランスで供給され得る。Ｒｅｐ及びＣａｐに加えて、ＡＡＶはアデノウイルスからの遺伝子を含有するヘルパープラスミドを必要とする場合がある。これらの遺伝子（Ｅ４、Ｅ２ａ、及びＶＡ）はＡＡＶ複製を仲介する。例えば、トランスファープラスミド、Ｒｅｐ／Ｃａｐ、及びヘルパープラスミドをアデノウイルス遺伝子Ｅ１＋を含むＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトして、感染性ＡＡＶ粒子を生成することができる。代替的に、Ｒｅｐ、Ｃａｐ、及びアデノウイルスヘルパー遺伝子を組み合わせて単一のプラスミドとすることもできる。同様のパッケージングセル及び方法は、レトロウイルスなどの他のウイルスにも使用できる。

【０５４９】

ＡＡＶの複数の血清型が確認されている。これらの血清型は、感染する細胞の種類（すなわち、それらの指向性）が異なり、特定の細胞型の優先的な形質導入を可能にする。ＡＡＶという用語は、例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶｒｈ．６４Ｒ１、ＡＡＶｈｕ．３７、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．３２．３３、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ－ＤＪ、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶＬＫ０３、ＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、及びそれらのハイブリッド、トリＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、霊長類ＡＡＶ、非霊長類ＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶを含む。ＡＡＶの種々の血清型のゲノム配列、並びにネイティブ末端反復（ＴＲ）、Ｒｅｐタンパク質、及びキャプシドサブユ

ニットの配列は、当該技術分野で既知である。そのような配列は、文献又はＧｅｎＢａｎｋなどの公開データベースに見出すことができる。「ＡＡＶベクター」は、本明細書で使用される場合、ＡＡＶ起源ではない異種配列（すなわち、ＡＡＶに対して異種の核酸配列）を含むＡＡＶベクターを指し、典型的には、目的の異種ポリペプチドをコードする配列を含む。構築物は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶｒｈ．６４Ｒ１、ＡＡＶｈｕ．３７、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．３２．３３、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ－ＤＪ、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶＬＫ０３、ＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、及びそれらのハイブリッド、トリＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、霊長類ＡＡＶ、非霊長類ＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶキャプシド配列を含み得る。一般に、異種核酸配列（導入遺伝子）は、少なくとも１つ、及び一般に２つのＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）が隣接している。ＡＡＶベクターは、一本鎖（ｓｓＡＡＶ）又は自己相補的（ｓｃＡＡＶ）のいずれかであり得る。肝臓組織の血清型の例には、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ．７４、及びＡＡＶｈｕ．３７が含まれ、特にＡＡＶ８が含まれる。具体的な例では、核酸構築物を含むＡＡＶベクターは、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）であり得る。本明細書に記載のｒＡＡＶ８ベクターは、キャプシドがＡＡＶ８からのものであるベクターである。例えば、ＡＡＶ２からのＩＴＲ及びＡＡＶ８のキャプシドを使用するＡＡＶベクターは、本明細書においてｒＡＡＶ８ベクターであるとみなされる。

【０５５０】

指向性は、キャプシド及び異なるウイルス血清型からのゲノムの混合である偽型付けによって更に洗練することができる。例えば、ＡＡＶ２／５は、血清型５のキャプシドにパッケージされた血清型２のゲノムを含むウイルスを示す。偽型ウイルスの使用は、形質導入効率を改善するだけでなく、指向性を変えることができる。異なる血清型に由来するハイブリッドキャプシドを使用して、ウイルスの指向性を改変することもできる。例えば、ＡＡＶ－ＤＪは、８つの血清型からのハイブリッドキャプシドを含有しており、インビボで幅広い細胞型にわたって高い感染力を示す。ＡＡＶ－ＤＪ８は、ＡＡＶ－ＤＪの特性を示すが、脳への取り込みが増強された別の例である。ＡＡＶ血清型は、変異によっても修飾することができる。ＡＡＶ２の変異修飾の例には、Ｙ４４４Ｆ、Ｙ５００Ｆ、Ｙ７３０Ｆ、及びＳ６６２Ｖが含まれる。ＡＡＶ３の変異修飾の例には、Ｙ７０５Ｆ、Ｙ７３１Ｆ、及びＴ４９２Ｖが含まれる。ＡＡＶ６の変異修飾の例には、Ｓ６６３Ｖ及びＴ４９２Ｖが含まれる。他の偽型／修飾ＡＡＶバリアントには、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／６、ＡＡＶ２／７、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／９、ＡＡＶ２．５、ＡＡＶ８．２、及びＡＡＶ／ＳＡＳＴＧが含まれる。

【０５５１】

導入遺伝子の発現を加速するために、自己相補的ＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）バリアントを使用することができる。ＡＡＶは細胞のＤＮＡ複製機構に依存して、ＡＡＶの一本鎖ＤＮＡゲノムの相補的鎖を合成するため、導入遺伝子の発現が遅れる可能性がある。この遅延に対処するために、感染時に自発的にアニーリングすることができる相補的配列を含むｓｃＡＡＶを使用することができ、宿主細胞のＤＮＡ合成の必要性を排除する。しかしながら、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターも使用できる。

【０５５２】

パッケージング容量を増加させるために、より長い導入遺伝子を、１つ目は３’スプライスドナー、２つ目は５’スプライスアクセプターである２つのＡＡＶトランスファープラスミドとの間に分割することができる。細胞の共感染時に、これらのウイルスはコンカテマーを形成し、一緒にスプライシングされ、完全長導入遺伝子を発現させることができる。これにより、より長い導入遺伝子の発現が可能になるが、発現の効率は低下する。容量を増加させるための同様の方法は、相同組換えを利用する。例えば、導入遺伝子は２つのトランスファープラスミドの間に分割することができるが、共発現が相同組換え及び完全長導入遺伝子の発現を誘導するように、実質的な配列の重複がある。

【０５５３】
ベクター（例えば、組換えＡＡＶ８などのＡＡＶ）は、例えば、１０ｍＭのリン酸ナトリウム、１８０ｍＭの塩化ナトリウム、及び０．００５％のポロキサマー１８８において、ｐＨ７．３で製剤化することができる。
【０５５４】
ある特定のＡＡＶにおいて、カーゴは、１つ以上のガイドＲＮＡをコードする核酸（例えば、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ、又は２つ以上のガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ）を含み得る。ある特定のＡＡＶにおいて、カーゴは、Ｃａｓ９などのＣａｓヌクレアーゼをコードする核酸（例えば、ＤＮＡ）、及び１つ以上のガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ（例えば、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ、又は２つ以上のガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ）を含み得る。ある特定のＡＡＶにおいて、カーゴは、Ｆ９核酸構築物を含み得る。ある特定のＡＡＶにおいて、カーゴは、Ｃａｓ９などのＣａｓヌクレアーゼをコードする核酸（例えば、ＤＮＡ）、ガイドＲＮＡ（又は複数のガイドＲＮＡ）をコードするＤＮＡ、及びＦ９核酸構築物を含み得る。
【０５５５】
例えば、Ｃａｓ又はＣａｓ９及び１つ以上のｇＲＮＡ（例えば、１つのｇＲＮＡ又は２つのｇＲＮＡ又は３つのｇＲＮＡ又は４つのｇＲＮＡ）は、ＬＮＰ媒介送達（例えば、ＲＮＡの形態）又はアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）媒介送達（例えば、ｒＡＡＶ８媒介送達）を介して送達することができる。例えば、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡは、ＬＮＰ媒介送達を介して送達することができるか、又はＣａｓ９をコードするＤＮＡ及びｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、ＡＡＶ媒介送達を介して送達することができる。Ｃａｓ又はＣａｓ９及びｇＲＮＡは、単一のＡＡＶにおいて、又は２つの別個のＡＡＶを介して送達することができる。例えば、第１のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセットを担持することができ、第２のＡＡＶは、ｇＲＮＡ発現カセットを担持することができる。同様に、第１のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセットを担持することができ、第２のＡＡＶは、２つ以上のｇＲＮＡ発現カセットを担持することができる。代替的に、単一のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたＣａｓ又はＣａｓ９コード配列）及びｇＲＮＡ発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたｇＲＮＡコード配列）を担持することができる。同様に、単一のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたＣａｓ又はＣａｓ９コード配列）及び２つ以上のｇＲＮＡ発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたｇＲＮＡコード配列）を担持することができる。Ｕ６プロモーター又は小さなｔＲＮＡ　Ｇｌｎなど、様々なプロモーターを使用してｇＲＮＡの発現を駆動することができる。同様に、Ｃａｓ９の発現を駆動するために様々なプロモーターを使用できる。例えば、Ｃａｓ９コード配列がＡＡＶ構築物に適合することができるように小さなプロモーターが使用される。同様に、小さなＣａｓ９タンパク質（例えば、ＳａＣａｓ９又はＣｊＣａｓ９を使用して、ＡＡＶパッケージング容量を最大化する）。
【０５５６】
Ｃ．細胞又は動物又はゲノム
上記の組成物のうちのいずれか（例えば、Ｆ９核酸構築物、ヌクレアーゼ剤、ベクター、脂質ナノ粒子、又はそれらの任意の組み合わせ）を含む細胞又は動物（すなわち、対象）もまた本明細書で提供される。そのような細胞又は動物（又はゲノム）は、本明細書に開示される方法によって生成することができる。例えば、細胞又は動物は、本明細書に記載のＦ９核酸構築物のうちのいずれか、本明細書に開示されるヌクレアーゼ剤のうちのいずれか、又はその両方を含むことができる。そのような細胞又は動物（又はゲノム）は、新生児細胞又は動物（又はゲノム）であり得る。代替的に、そのような細胞又は動物（又はゲノム）は、非新生児細胞又は動物（又はゲノム）であり得る。
【０５５７】
新生児対象（例えば、動物）は、１歳（５２週齢）以下、好ましくは２４週齢以下、より好ましくは１２週齢以下、より好ましくは８週齢以下、及び更により好ましくは４週齢

以下のヒト対象であり得る。ある特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大４週齢である。ある特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大８週齢である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後３週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後２週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後１週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後７日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後６日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後５日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後４日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後３日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後２日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後１日以内である。上に開示される時間窓は、ヒト対象のためのものであり、他の動物のための対応する発生時間窓を包含することも意図される。本明細書で使用される場合、「新生児細胞」は、新生児対象の細胞であり、新生児細胞の集団は、新生児対象の細胞の集団である。

【０５５８】

新生児細胞は、任意の新生児対象のものであり得る。例えば、新生児細胞は、１歳（５２週齢）以下、好ましくは２４週齢以下、より好ましくは１２週齢以下、より好ましくは８週齢以下、及び更により好ましくは４週齢以下のヒト対象からのものであり得る。ある特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大４週齢である。ある特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大８週齢である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後３週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後２週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後１週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後７日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後６日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後５日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後４日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後３日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後２日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後１日以内である。上に開示される時間窓は、ヒト対象のためのものであり、他の動物のための対応する発生時間窓を包含することも意図される。本明細書で使用される場合、「新生児細胞」は、新生児対象の細胞であり、新生児細胞の集団は、新生児対象の細胞の集団である。

【０５５９】

いくつかのそのような細胞又は動物又はゲノムでは、Ｆ９核酸構築物は、セーフハーバー遺伝子座などの標的ゲノム遺伝子座（例えば、ＡＬＢ遺伝子座又はヒトＡＬＢ遺伝子座のイントロン１などのＡＬＢ遺伝子座又はヒトＡＬＢ遺伝子座）にゲノムに組み込まれ得る。いくつかのそのような細胞、動物、又はゲノムでは、Ｆ９核酸構築物は、細胞、動物、又はゲノムにおいて発現される。例えば、Ｆ９核酸構築物がＡＬＢ遺伝子座（例えば、ヒトＡＬＢ遺伝子座のイントロン１）に組み込まれる場合、ＦＩＸタンパク質はＡＬＢ遺伝子座から発現され得る。ＦＩＸコード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得るか、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。核酸構築物が本明細書に開示される双方向性核酸構築物である場合、ゲノム、細胞、又は動物は、第１のＦＩＸタンパク質を発現させることができるか、又は第２のＦＩＸタンパク質を発現させることができる。いくつかのゲノム、細胞、又は動物では、標的ゲノム遺伝子座は、ＡＬＢ遺伝子座である。例えば、核酸構築物は、内因性ＡＬＢ遺伝子座のイントロン１にゲノムに組み込まれ得る。次いで、内因性ＡＬＢエキソン１は、核酸構築物中のＦＩＸタンパク質のコード配列にスプライスすることができる。

【０５６０】

核酸構築物が安定して組み込まれる標的ゲノム遺伝子座は、核酸構築物からのＦＩＸコード配列についてヘテロ接合であり得るか、又は核酸構築物からのＦＩＸコード配列についてホモ接合であり得る。二倍体生物は、各遺伝子座に２つの対立遺伝子を有する。対立遺伝子の各対は、特定の遺伝子遺伝子座の遺伝子型を表す。遺伝子型は、特定の遺伝子座

に２つの同一の対立遺伝子がある場合はホモ接合であり、２つの対立遺伝子が異なる場合はヘテロ接合であると記載される。

【０５６１】

細胞、動物、又はゲノムは、真核細胞若しくは真核生物、又は哺乳動物細胞若しくは哺乳動物（例えば、非ヒト哺乳動物細胞若しくは非ヒト哺乳動物、又はヒト細胞若しくはヒト）などの任意の好適な種からのものであり得る。哺乳動物は、例えば、非ヒト哺乳動物、ヒト、げっ歯動物、ラット、マウス、又はハムスターであり得る。他の非ヒト哺乳動物には、例えば、非ヒト霊長類、サル、類人猿、ネコ、イヌ、ウサギ、ウマ、雄ウシ、シカ、バイソン、家畜（例えば、ウシ、去勢牛などのウシ種、ヒツジ、ヤギなどのヒツジ種、並びにブタ、及びイノシシなどのブタ種）が含まれる。鳥類には、例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、ダチョウ、ガチョウ、アヒルなどが含まれる。飼育動物及び農業用動物も含まれる。「非ヒト」という用語はヒトを除外する。例には、ヒト細胞／ヒト、げっ歯類細胞／げっ歯類、マウス細胞／マウス、ラット細胞／ラット、及び非ヒト霊長類細胞／非ヒト霊長類が含まれるが、これらに限定されない。具体的な例では、細胞はヒト細胞であるか、又は動物はヒトである。同様に、細胞は、任意の好適なタイプの細胞であり得る。具体的な例では、細胞は、肝細胞などの肝臓細胞（例えば、ヒト肝臓細胞又はヒト肝細胞）である。

【０５６２】

細胞は、単離された細胞（例えば、インビトロ）、エクスビボ細胞であり得るか、又は動物内（すなわち、対象内）でインビボであり得る。細胞は、有糸分裂能力のある細胞又は有糸分裂的に不活性な細胞、減数分裂能力のある細胞又は減数分裂的に不活性な細胞であり得る。同様に、細胞はまた、初代体細胞又は初代体細胞ではない細胞であり得る。体細胞には、配偶子、生殖細胞、配偶子細胞、又は未分化幹細胞ではない任意の細胞が含まれる。例えば、細胞は、肝細胞（例えば、マウス、非ヒト霊長類、又はヒト肝細胞）などの肝臓細胞であり得る。

【０５６３】

本明細書で提供される細胞は、正常で健康な細胞であり得るか、又は病変した細胞若しくは変異体を担持する細胞であり得る。例えば、細胞は、ＦＩＸ欠乏症を有し得るか、又はＦＩＸ欠乏症若しくは血友病（例えば、血友病Ｂ）を有する対象からのものであり得る。

【０５６４】

本明細書で提供される細胞は、非分裂細胞であり得る。非分裂細胞は、最終的に分化し、分裂しない細胞、並びに分裂しないが細胞分裂及び増殖に再び入る能力を保持する静止細胞を指す。例えば、肝臓細胞は、（例えば、損傷又は切除された場合に）分裂する能力を保持するが、典型的には分裂しない。有糸分裂細胞分裂の間、相同組換えは、ゲノムが保護され、二本鎖切断が修復される機構である。非分裂細胞は、相同組換え（ＨＲ）が、（例えば、対照分裂細胞と比較して）二本鎖ＤＮＡ切断が細胞において修復される主要な機構ではない細胞を指し得る。非分裂細胞は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）が、（例えば、対照分裂細胞と比較して）二本鎖ＤＮＡ切断が細胞において修復される主要な機構である細胞を指し得る。非分裂細胞型は、例えば、活性ＮＨＥＪ二本鎖ＤＮＡ切断修復機構によって、文献に記載されている。例えば、Ｉｙａｍａ，ＤＮＡ　Ｒｅｐａｉｒ（Ａｍｓｔ．）２０１３，１２（８）：６２０－６３６を参照されたい。

【０５６５】

ＩＩＩ．Ｆ９核酸を導入するか、組み込むか、若しくは発現させるための方法、又は血友病Ｂ若しくはＦＩＸ欠乏症の治療のための方法

本明細書に開示される核酸構築物及び組成物は、Ｆ９核酸を細胞に導入する方法、Ｆ９核酸を標的ゲノム遺伝子座に組み込む方法、細胞におけるＦＩＸの発現方法、及び対象における血友病Ｂ又はＦＩＸ欠乏症を治療する方法において使用することができる。本明細書に開示される核酸構築物及び組成物は、Ｆ９核酸を細胞若しくは細胞の集団又は対象に導入する方法、Ｆ９核酸を標的ゲノム遺伝子座に挿入又は組み込む方法、細胞若しくは細

胞の集団又は対象においてＦＩＸタンパク質を発現させる方法、及び対象における血友病Ｂ又はＦＩＸ欠乏症を治療する方法において使用することができる。

【０５６６】

Ａ．血友病Ｂ

本明細書に開示される組成物（例えば、Ｆ９核酸構築物、又はヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）との組み合わせにおけるＦ９核酸構築物は、ＦＩＸ欠乏症若しくは血友病Ｂの治療及び／又はＦＩＸ欠乏症若しくは血友病Ｂに関連する少なくとも１つの症状の回復に有用である。同様に、本明細書に開示される組成物は、ＦＩＸ欠乏症又は血友病Ｂを有する対象を治療するための薬学的組成物又は医薬の調製に使用することができる。

【０５６７】

症状及び原因。止血は、正常な条件下で血液を流体状態に維持し、血管損傷の場合に迅速に血餅を形成するための凝固促進活性と抗凝固活性との間のバランスである。凝固は、血小板をコラーゲン及び血管外組織因子に曝露する内皮の破壊によって開始される。これは、ＦＩＸを含む凝血因子の活性化カスケードをもたらし、フィブリンモノマーの活性化及び重合がプラグを形成して血流を遮断し、止血を達成するまで凝固反応を増幅する（図１）。凝固プロセスは、凝血封じ込め、創傷治癒、凝血溶解、組織再生、及びリモデリングを伴う。

【０５６８】

血友病Ｂは、Ｘ染色体上に存在するＦ９遺伝子における遺伝性又は自然発生的な劣性変異によって引き起こされる稀な先天性障害であり、機能不全又は欠乏ＦＩＸタンパク質の発現をもたらす。機能するＦＩＸタンパクの不在は、凝固カスケードを妨害し、血餅の正常な形成が大幅に制限され、異常出血をもたらす。バリアントの劣性の性質に起因して、血友病は通常、男性のみに影響を及ぼすが、女性保因者は、軽度から中程度の症状を経験し得、治療を必要とし得る。

【０５６９】

血友病は通常、母体のＸ染色体から遺伝するが、前向き研究は、重度の血友病Ｂを有すると新たに診断された人々の４３％が血友病の以前の家族歴を有しないことを報告している。例えば、Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ ｅｔ ａｌ．（２０２０）Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ ２６．６：１－１５８、及びＫａｓｐｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ １３：９０－９２を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。Ｗｏｒｌｄ Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａによって２０１９年に実施されたＡｎｎｕａｌ Ｇｌｏｂａｌ Ｓｕｒｖｅｙに関する報告は、３１，９９７人の患者が世界中で血友病Ｂとともに生活し、４，０９３人の患者が米国で生活していることを報告した。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｗｏｒｌｄ Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ，「Ｒｅｐｏｒｔ ｏｎ ｔｈｅ Ａｎｎｕａｌ Ｇｌｏｂａｌ Ｓｕｒｖｅｙ ２０１９」Ｗｏｒｌｄ Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ（２０２０）を参照されたい。世界中の血友病Ｂの推定発生率（出生時の有病率）は、男性１００，０００人当たり５．０症例であり、重度の血友病Ｂについては男性１００，０００人当たり１．５症例である。血友病を有する人々についての死亡率がより高いため、年齢群にわたる推定有病率はより低く、男性１００，０００人当たり１．１症例の重度の血友病を含む男性１００，０００人当たり３．８症例の血友病Ｂである。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｗｏｒｌｄ Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ，「Ｒｅｐｏｒｔ ｏｎ ｔｈｅ Ａｎｎｕａｌ Ｇｌｏｂａｌ Ｓｕｒｖｅｙ ２０１９」Ｗｏｒｌｄ Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ（２０２０）を参照されたい。

【０５７０】

血友病及び出血症状の重症度は、凝血因子の活性レベルの程度と相関する（表８）。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｒｉｖａｓ

ｔａｖａ ｅｔ ａｌ．（２０２０）Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ ２６．６：１－１５８を参照されたい。高所得市場では、血友病Ｂ患者のうちの３４％が軽度の血友病を有し、約３１％が中程度の血友病を有し、３３％が重度の血友病を有すると推定される。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｗｏｒｌｄ Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ，「Ｒｅｐｏｒｔ ｏｎ ｔｈｅ Ａｎｎｕａｌ Ｇｌｏｂａｌ Ｓｕｒｖｅｙ ２０１９」Ｗｏｒｌｄ Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ（２０２０）を参照されたい。

【０５７１】

【表８】

表８．凝血因子活性レベルに基づく血友病Ｂの重症度分類。

重症度	FIX活性レベル	臨床症状
軽度	正常の6～49%、 0．06～0．40IU／mL	典型的には、重篤な損傷、外傷又は手術後にのみ出血を経験する。 成人期に十分に入るまで診断されない場合がある。 自然出血は稀であるが、正常なFIX活性レベルの約15～30%未満を有する患者において起こり得る。
中程度	正常の1～5%、 0．01～0．05IU／mL	出血の頻度が少なく、軽い手術又は損傷後に長期出血を経験する。 自発出血は、一般に1ヶ月当たり1回未満で起こり得る。
重度	正常の1%未満、 0．01IU／mL未満	損傷後に出血を経験し、関節及び筋肉を含む、1ヶ月当たり数回の頻繁な自発出血を有し得る。

【０５７２】

血友病Ｂの臨床症状には、容易な挫傷、関節、筋肉及び軟組織における「自然」出血、疼痛、外傷又は手術後の過剰な出血、並びに生命を脅かす頭蓋内出血の観察が含まれる。

【０５７３】

自然出血は最も一般的には関節で起こり、膝（全ての出血事象の５０％超）、肘、足首、肩、及び手首が最も影響を受ける。関節における出血の再発は、関節の腫脹を伴う炎症、軟骨の変性、及び血友病性関節症と呼ばれる関節腔の進行性破壊をもたらす。関節症が関節において発症するにつれて、正常な体重負荷などの最小限の関節ストレスが加えられた場合であっても、出血がますます頻繁になり、慢性滑膜炎、疼痛、線維症及び進行性関節硬直をもたらす。血友病性関節症の最終段階では、軟骨の進行性かつ浸食性の破壊が関節空間を狭め、関節の崩壊又は硬化をもたらす。

【０５７４】

筋肉内出血は、出血事象の３０％を表している。筋膜筋のような限られた腔に局在する場合、虚血、壊疽、拘縮及び神経障害を伴う重要な構造の顕著な圧縮をもたらし得る。骨盤腔における出血は、大腿神経圧迫をもたらし得、神経障害が発生した場合、潜在的な永続的障害をもたらす。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｎａｐｏｌｉｔａｎｏ ｅｔ ａｌ．，「Ｃｈａｐｔｅｒ ３－Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ Ａ ａｎｄ Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ Ｂ，」Ｃｏｎｓｕｌｔａｔｉｖｅ Ｈｅｍｏｓｔａｓｉｓ ａｎｄ Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ ４（２０１９）：３９－５８を参照されたい。

【０５７５】

鼻血、口腔及び胃腸出血は、咳又は嘔吐のような軽い外傷後にも起こり得る。腹壁又は腸壁における出血も起こり得、例えば虫垂炎と誤診されることが多い重度の疼痛を生じる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｈｏｏｔｓ ｅｔ ａｌ．，「Ｃｌｉｎｉｃａｌ ｍａｎｉｆｅｓｔａｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ｏｆ ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ」ＵｐｔｏＤａｔｅ（２０１９）を参照されたい。血尿は重度の血友病の頻繁な症状であるが、通常は良性であり、腎機能の進行性喪失に関連しない。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｈｏｏｔｓ ｅｔ ａｌ．，「Ｃｌｉｎｉｃａｌ ｍａｎｉｆｅｓｔａｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ｏｆ ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ」ＵｐｔｏＤａｔｅ（２０１９）を参照されたい。

【０５７６】
頭蓋内出血は、血友病を有する個体の約２．７％において生じると推定され、罹患した成人において５０％の確率で自然発生的である。その低い発生率にもかかわらず、頭蓋内出血は、血友病患者における出血からの死亡の最も一般的な原因である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｎａｐｏｌｉｔａｎｏ ｅｔ ａｌ．，「Ｃｈａｐｔｅｒ ３－Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ Ａ ａｎｄ Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ Ｂ，」Ｃｏｎｓｕｌｔａｔｉｖｅ Ｈｅｍｏｓｔａｓｉｓ ａｎｄ Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ ４（２０１９）：３９－５８を参照されたい。

【０５７７】
血友病Ｂを有する患者の全体期待寿命は、患者が適切な治療を受けるかどうかによって変化する。米国で利用可能なものなどの予防及びオンデマンド治療では、２０１８年にオランダで実施された研究において、平均期待寿命は健康な男性より６年短いことが見出された（７７歳対８３歳）。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｈａｓｓａｎ ｅｔ ａｌ．（２０２１）Ｊ．Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．１９：６４５－６５３を参照されたい。

【０５７８】
診断。重度の血友病Ｂを有する患者は通常、臨床的特徴に基づいて２歳より前に診断されるが、軽度の血友病を有する患者は、出血症状が傷害又は手術時にのみ現れる場合、より高齢で診断され得る。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｂｅｒｎｔｏｒｐ ｅｔ ａｌ．（２０２１）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｉｓ．Ｐｒｉｍｅｒｓ ７．４５を参照されたい。

【０５７９】
一般的な血友病の診断は、最初に臨床的特徴に基づき、次いで、正常な血小板計数、正常なプロトロンビン時間（prothrombin time、ＰＴ）アッセイであるが、活性化部分トロンボプラスチン時間（ＡＰＴＴ）の延長を伴うスクリーニング検査結果によって確認される。例えば、Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ ｅｔ ａｌ．（２０２０）Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ ２６．６：１－１５８及びＨｏｏｔｓ ｅｔ ａｌ．，「Ｃｌｉｎｉｃａｌ ｍａｎｉｆｅｓｔａｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ｏｆ ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ」ＵｐｔｏＤａｔｅ（２０１９）を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。血友病Ｂの最終診断は、正常の４０％未満のＦＩＸ活性レベルを測定する一段階ＦＩＸアッセイの結果に基づく。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ ｅｔ ａｌ．（２０２０）Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ ２６．６：１－１５８を参照されたい。稀な状況では、血友病Ｂ患者のＦＩＸ活性レベルは４０％以上であり得、病原性ＦＩＸレベルが調査され得る。

【０５８０】
遺伝子診断は、疾患の生物学を定義し、困難な症例における診断を確立し、阻害因子発生のリスクを予測し、女性保因者を同定し、必要に応じて出生前診断を提供するために実施することができる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ ｅｔ ａｌ．（２０２０）Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ ２６．６：１－１５８を参照されたい。遺伝子検査は必ずしも正確な変異を同定しない可能性があることが認識されているが、血友病Ｂの原因である変異は、症例の９８％においてＦ９遺伝子において同定されると推定される。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｃａｒｃａｏ ｅｔ ａｌ．，「Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ Ａ ａｎｄ Ｂ」Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ ７（２０１８）：２００１－２０２２を参照されたい。初生児は、第ＩＸ因子レベルを測定するための血液検査を介して血友病Ｂについて検査され得る。例えば、血液は臍帯から採取することができる。

【０５８１】
治療及び満たされていない医学的必要性。血友病Ｂ治療の主な目的は、急性出血の予防

又は治療のために、失われた血餅因子を止血的に適切な血漿レベルに置き換えることによって出血を予防又は治療することである。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｎａｐｏｌｉｔａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｃｈａｐｔｅｒ３－Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ　Ａ　ａｎｄ　Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ　Ｂ，」Ｃｏｎｓｕｌｔａｔｉｖｅ　Ｈｅｍｏｓｔａｓｉｓ　ａｎｄ　Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ４（２０１９）：３９－５８を参照されたい。

【０５８２】

現在の標準治療は、血友病Ｂの予防又は治療のための、血漿由来又は組換えＦＩＸ凝血因子濃縮物（ＣＦＣ）の使用である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ　２６．６：１－１５８を参照されたい。ＣＦＣの定期的投与による予防は、中程度から重度の血友病Ｂを有する患者における自然出血を予防して、ＦＩＸレベルを１％を超えて維持するために推奨される。軽い若しくは中程度の出血を制御するために、又は再発性自然出血を予防するために、正常の３０～５０％のＦＩＸ活性レベルが必要とされ（Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ　２６．６：１－１５８）、これは血友病治療を専門とする医師の監督下で行われる、標準ＦＩＸ　ＣＦＣの週当たり２～３回の静脈内注入に相当する。例えば、Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ　２６．６：１－１５８、及びＰｏｗｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３６９．２４：２３１３－２３２３を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。投与頻度を毎週又は２週間毎に低減させるために、延長された半減期のＣＦＣが開発されている。例えば、Ｐｏｗｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３６９．２４：２３１３－２３２３を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。予防の開始は、開始時の年齢が長期臨床転帰の強力な予測因子であることが実証されているので、可能な限り早く、好ましくは３歳前に推奨される。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ　２６．６：１－１５８を参照されたい。新生児段階及び乳児段階中の血友病患者に対する遺伝子療法は、血友病性関節症及び頭蓋内出血などの不可逆性症状及び生命を脅かす事象を予防することができる。

【０５８３】

出血又は外科的処置の場合、エピソード療法又はオンデマンド療法を予防に追加することができ、その場合、正常なＦＩＸ活性の５０～１００％のレベルが達成され、最低７～１０日間維持されるべきである。例えば、Ｃａｒｃａｏ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ　Ａ　ａｎｄ　Ｂ」Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ　７（２０１８）：２００１－２０２２、及びＮａｐｏｌｉｔａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｃｈａｐｔｅｒ３－Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ　Ａ　ａｎｄ　Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ　Ｂ，」Ｃｏｎｓｕｌｔａｔｉｖｅ　Ｈｅｍｏｓｔａｓｉｓ　ａｎｄ　Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ４（２０１９）：３９－５８を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。オンデマンド療法は、自然出血を経験しない中程度の形態の血友病Ｂを有する患者に対する唯一の処置であり得る。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｉａ　２６．６：１－１５８を参照されたい。

【０５８４】

予防治療に対する高いアドヒアランスを有する患者は、より低いレベルの年間出血率（ａｎｎｕａｌｉｚｅｄ　ｂｌｅｅｄｉｎｇ　ｒａｔｅ、ＡＢＲ）を有することが観察されている。ｒＣＦＣの効力に関する最近の研究では、研究全体にわたる平均ＡＢＲが０～４の範囲であることが観察された。例えば、Ｄａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１９）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｅｃｏｎ．２２．１０：１０１４－１０２１、及びＣｈｈａｂｒａ（２０２０）Ｂｌｏｏｄ　Ｃｏａｇｕｌ．Ｆｉｂｒｉｎｏｌｙｓｉｓ　３１．３：１８６－１９２を参照されたく、それらの

各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０５８５】
薬理学的治療に加えて、一般的に少なくとも血液病専門医、看護師、及び理学療法士からなる、血友病に関して患者の治癒及び教育を支援する多領域のチームが配置される。
【０５８６】
米国におけるＣＦＣの使用は、疾患の全体的な経過を変化させているが、血友病Ｂ患者に対する満たされていない医学的必要性が残っている。第一に、ＣＦＣから投与された外因性ＦＩＸに対する中和抗体の発生は、出血を治療する能力を大きく妨害し得る重度のＦＩＸ欠乏症を有する個体の約１０％において起こることが報告されている。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｍａｌｅ ｅｔ ａｌ．（２０２１）Ｈｅｍｏｐｈｉｌｉａ １０６．１：１２３－１２９を参照されたい。第二に、専用センターでの週当たり数回の注射又は２週間毎の注射を必要とする予防治療は、患者に対する顕著な治療負担並びに医療システム及び社会に対する顕著な経済的負担を表す。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｂｕｒｋｅ ｅｔ ａｌ．（２０２１）Ｏｒｐｈａｎｅｔ．Ｊ．Ｒａｒｅ Ｄｉｓ．１６：１４３を参照されたい。予防が自然関節出血のリスクを下げるとしても、それは完全には排除されず、残存する慢性疼痛及び障害につながる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｂｕｒｋｅ ｅｔ ａｌ．（２０２１）Ｏｒｐｈａｎｅｔ．Ｊ．Ｒａｒｅ Ｄｉｓ．１６：１４３を参照されたい。したがって、機能的ＦＩＸタンパク質の血漿レベルを長期に持続させる治療が依然として必要とされている。
【０５８７】
アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター遺伝子療法は、血友病Ｂについて調査中である。臨床試験データは、一部の患者においてＦＩＸの持続する内因性生成を実証しており、これは、置き換えＦＩＸの注入に対する必要性の排除をもたらす。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｖｏｎ Ｄｒｙｇａｌｓｋｉ（２０２０）Ｂｌｏｏｄ １３６（ｓｕｐｐ １）：１３を参照されたい。しかしながら、ＦＩＸのＡＡＶ発現はエピソーム性であり、したがって、効力に関する更なる長期データが生成されるまで、発現の耐久性は未知のままである。
【０５８８】
いくつかの組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）ベクターエピソーム遺伝子治療は、血友病Ｂについて第３相調査下にある。これらのｒＡＡＶベクターは、肝臓特異的プロモーターと関連するコドン最適化されたＰａｄｕａバリアントヒトＦ９遺伝子を肝細胞の核に送達し、そこで染色体外環状エピソームとして維持される。得られた発現ＰａｄｕａＦＩＸタンパク質は、野生型ＦＩＸタンパク質のバリアントであり、野生型ＦＩＸと比較してＦＩＸ特異的活性が８倍増加していると推定される。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、ＶａｎｄｅｎＤｒｉｅｓｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ．（２０１８）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．２６．１：１４－１６を参照されたい。しかしながら、ＦＩＸのＡＡＶ発現はエピソーム性であり、したがって、効力に関する更なる長期データが生成されるまで、発現の耐久性は未知のままである。
【０５８９】
Ｂ．方法
Ｆ９核酸を細胞に導入する方法、Ｆ９核酸を標的ゲノム遺伝子座に組み込む方法、細胞におけるＦＩＸの発現方法、及び対象における血友病Ｂ又はＦＩＸ欠乏症を治療する方法が提供される。Ｆ９核酸を細胞又は細胞の集団（又は対象における細胞若しくは細胞の集団）に導入する方法、Ｆ９核酸を細胞又は細胞の集団（又は対象における細胞若しくは細胞の集団）における標的ゲノム遺伝子座に挿入する方法、細胞又は細胞の集団（又は対象における細胞若しくは細胞の集団）においてＦＩＸタンパク質を発現させる方法、対象における血友病Ｂ又はＦＩＸ欠乏症を治療する方法が提供される。
【０５９０】
細胞又は細胞の集団は、新生児細胞又は新生児細胞の集団であり得、対象は、いくつか

の方法において新生児対象であり得る。新生児対象は、１歳（５２週齢）以下、好ましくは２４週齢以下、より好ましくは１２週齢以下、より好ましくは８週齢以下、及び更により好ましくは４週齢以下のヒト対象であり得る。ある特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大４週齢である。ある特定の実施形態では、新生児ヒト対象は、最大８週齢である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後３週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後２週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後１週間以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後７日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後６日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後５日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後４日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後３日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後２日以内である。別の実施形態では、新生児ヒト対象は、出生後１日以内である。上に開示される時間窓は、ヒト対象のためのものであり、他の動物のための対応する発生時間窓を包含することも意図される。本明細書で使用される場合、「新生児細胞」は、新生児対象の細胞であり、新生児細胞の集団は、新生児対象の細胞の集団である。

【０５９１】

細胞又は細胞の集団は、幼若細胞又は幼若細胞の集団であり得、対象は、いくつかの方法において幼若対象であり得る。ヒトの文脈における幼若対象は、１８歳未満のヒト対象を包含する。一実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後１７年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後１６年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後１５年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後１４年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後１３年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後１２年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後１１年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後１０年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後９年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後８年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後７年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後６年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後５年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後４年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後３年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後２年以内の対象である。別の実施形態では、ヒト幼若対象は、出生後１年以内の対象である。上に開示される時間窓は、ヒト対象のためのものであり、他の動物のための対応する発生時間窓を包含することも意図される。本明細書で使用される場合、幼若細胞は、幼若対象の細胞であり、幼若細胞の集団は、幼若対象の細胞の集団である。

【０５９２】

いくつかの方法では、対象は、活発に成長している肝臓を有するか、又は細胞若しくは細胞の集団は、活発に成長している肝臓からのものである。他の方法では、対象は、活発に成長している肝臓を有しないか、又は細胞若しくは細胞の集団は、活発に成長している肝臓からのものではない。

【０５９３】

一例では、Ｆ９核酸の導入を必要とする細胞又は対象にＦ９核酸を導入する方法が本明細書で提供される。そのような方法は、本明細書に記載のＦ９核酸構築物のうちのいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のＦ９核酸構築物を含む組成物のうちのいずれか）を細胞に投与することを含み得る。Ｆ９核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に投与され得るか、又は単独で投与され得る。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的遺伝子内のヌクレアーゼ標的配列を切断して切断部位を作製し得、Ｆ９核酸構築物は、切断部位に挿入されて、修飾された標的遺伝子を作製し得、ＦＩＸタンパク質は、修飾された標的遺伝子から発現され得る。ＦＩＸコード配列は

、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得るか、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、標的遺伝子は、ＡＬＢ（例えば、ＡＬＢのイントロン１）である。そのような方法では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質をＡＬＢ遺伝子のイントロン１内のガイドＲＮＡ標的配列に標的とすることができ、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡ標的配列を切断して切断部位を作製することができ、核酸構築物は、切断部位に挿入されて、修飾されたＡＬＢ遺伝子を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、修飾されたＡＬＢ遺伝子から発現することができる。

【０５９４】

一例では、Ｆ９核酸の導入を必要とする細胞若しくは細胞の集団又は対象に（例えば、対象における細胞又は細胞の集団に）Ｆ９核酸を導入する方法が本明細書で提供される。細胞又は細胞の集団は、新生児細胞又は新生児細胞の集団であり得、対象は、いくつかの方法において新生児対象であり得る。他の方法では、細胞又は細胞の集団は、新生児細胞ではなく、新生児細胞の集団ではなく、対象は、新生児対象ではない。細胞又は細胞の集団は、幼若細胞又は幼若細胞の集団であり得、対象は、いくつかの方法において幼若対象であり得る。他の方法では、細胞又は細胞の集団は、幼若細胞ではなく、幼若細胞の集団ではなく、対象は、幼若対象ではない。そのような方法は、本明細書に記載のＦ９核酸構築物のうちのいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のＦ９核酸構築物を含む組成物のうちのいずれか）を細胞に投与することを含み得る。Ｆ９核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に投与され得るか、又は単独で投与され得る。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に（例えば、同時に又は任意の順序で逐次的に）投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、標的遺伝子）内のヌクレアーゼ標的配列を切断することができ、Ｆ９核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現することができる。Ｆ９コード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得るか、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、標的遺伝子は、ＡＬＢ（例えば、ＡＬＢのイントロン１）である。そのような方法では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質をＡＬＢ遺伝子のイントロン１内のガイドＲＮＡ標的配列に標的とすることができ、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡ標的配列を切断することができ、核酸構築物は、ＡＬＢ遺伝子に挿入されて、修飾されたＡＬＢ遺伝子を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、修飾されたＡＬＢ遺伝子から発現することができる。

【０５９５】

別の例では、ＦＩＸの発現を必要とする細胞又は対象においてＦＩＸを発現させる方法が本明細書で提供される。そのような方法は、本明細書に記載のＦ９核酸構築物のうちのいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のＦ９核酸構築物を含む組成物のうちのいずれか）を細胞に投与することを含み得る。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物又はＦ９核酸構築物を含む組成物は、ヌクレアーゼ剤なしで投与され得る（例えば、Ｆ９核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座への組み込みなしにＦＩＸの発現に必要とされる要素を含む場合）。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的遺伝子内のヌクレアーゼ標的配列を切断して切断部位を作製することができ、Ｆ９核酸構築物は、切断部位に挿入されて、修飾された標的遺伝子を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、修飾された標的遺伝子から発現することができる。ＦＩＸコード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得るか、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、標的遺伝子は、ＡＬＢ（例

えば、ＡＬＢのイントロン１）である。そのような方法では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質をＡＬＢ遺伝子のイントロン１内のガイドＲＮＡ標的配列に標的とすることができ、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡ標的配列を切断して切断部位を作製することができ、核酸構築物は、切断部位に挿入されて、修飾されたＡＬＢ遺伝子を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、修飾されたＡＬＢ遺伝子から発現することができる。

【０５９６】

別の例では、ＦＩＸタンパク質の発現を必要とする細胞若しくは細胞の集団又は対象において（例えば、対象における細胞又は細胞の集団において）ＦＩＸタンパク質を発現させる方法が本明細書で提供される。細胞又は細胞の集団は、新生児細胞又は新生児細胞の集団であり得、対象は、いくつかの方法において新生児対象であり得る。他の方法では、細胞又は細胞の集団は、新生児細胞ではなく、新生児細胞の集団ではなく、対象は、新生児対象ではない。細胞又は細胞の集団は、幼若細胞又は幼若細胞の集団であり得、対象は、いくつかの方法において幼若対象であり得る。他の方法では、細胞又は細胞の集団は、幼若細胞ではなく、幼若細胞の集団ではなく、対象は、幼若対象ではない。そのような方法は、本明細書に記載のＦ９核酸構築物のうちのいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のＦ９核酸構築物を含む組成物のうちのいずれか）を細胞に投与することを含み得る。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物又はＦ９核酸構築物を含む組成物は、ヌクレアーゼ剤なしで投与され得る（例えば、Ｆ９核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座への組み込みなしにＦＩＸタンパク質の発現に必要とされる要素を含む場合）。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に（例えば、同時に又は任意の順序で逐次的に）投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、標的遺伝子）内のヌクレアーゼ標的配列を切断することができ、Ｆ９核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現することができる。Ｆ９コード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得るか、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、標的遺伝子は、ＡＬＢ（例えば、ＡＬＢのイントロン１）である。そのような方法では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質をＡＬＢ遺伝子のイントロン１内のガイドＲＮＡ標的配列に標的とすることができ、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡ標的配列を切断することができ、核酸構築物は、ＡＬＢ遺伝子に挿入されて、修飾されたＡＬＢ遺伝子を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、修飾されたＡＬＢ遺伝子から発現することができる。

【０５９７】

別の例では、Ｆ９核酸構築物の組み込みを必要とする細胞又は対象における標的ゲノム遺伝子座にＦ９核酸構築物を組み込む方法が本明細書で提供される。そのような方法は、本明細書に記載のＦ９核酸構築物のうちのいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のＦ９核酸構築物を含む組成物のうちのいずれか）を細胞に投与することを含み得る。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物又はＦ９核酸構築物を含む組成物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的遺伝子内のヌクレアーゼ標的配列を切断して切断部位を作製することができ、Ｆ９核酸構築物は、切断部位に挿入されて、修飾された標的遺伝子を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、修飾された標的遺伝子から発現することができる。ＦＩＸコード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得るか、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、標的遺伝子は、ＡＬＢ（例えば、ＡＬＢのイントロン１）である。そのような方法では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質をＡＬＢ遺伝子のイントロン１内のガイドＲＮＡ標的配列に標的とすることができ、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮ

ＡＬＢ遺伝子から発現することができる。

【０５９８】

別の例では、Ｆ９核酸構築物の挿入又は組み込みを必要とする細胞若しくは細胞の集団又は対象における（例えば、対象における細胞又は細胞の集団における）標的ゲノム遺伝子座に、Ｆ９核酸構築物を挿入又は組み込む方法が本明細書で提供される。細胞又は細胞の集団は、新生児細胞又は新生児細胞の集団であり得、対象は、いくつかの方法において新生児対象であり得る。他の方法では、細胞又は細胞の集団は、新生児細胞ではなく、新生児細胞の集団ではなく、対象は、新生児対象ではない。細胞又は細胞の集団は、幼若細胞又は幼若細胞の集団であり得、対象は、いくつかの方法において幼若対象であり得る。他の方法では、細胞又は細胞の集団は、幼若細胞ではなく、幼若細胞の集団ではなく、対象は、幼若対象ではない。そのような方法は、本明細書に記載のＦ９核酸構築物のうちのいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のＦ９核酸構築物を含む組成物のうちのいずれか）を細胞に投与することを含み得る。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物又はＦ９核酸構築物を含む組成物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に（例えば、同時に又は任意の順序で逐次的に）投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、標的遺伝子）内のヌクレアーゼ標的配列を切断することができ、Ｆ９核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現することができる。Ｆ９コード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得るか、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、標的遺伝子は、ＡＬＢ（例えば、ＡＬＢのイントロン１）である。そのような方法では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質をＡＬＢ遺伝子のイントロン１内のガイドＲＮＡ標的配列に標的とすることができ、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡ標的配列を切断することができ、核酸構築物は、ＡＬＢ遺伝子に挿入されて、修飾されたＡＬＢ遺伝子を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、修飾されたＡＬＢ遺伝子から発現することができる。

【０５９９】

上記方法のうちのいずれかにおいて、細胞は、真核細胞又は哺乳動物細胞（例えば、非ヒト哺乳動物細胞又はヒト細胞）などの任意の好適な種からのものであり得る。哺乳動物は、例えば、非ヒト哺乳動物、ヒト、げっ歯動物、ラット、マウス、又はハムスターであり得る。他の非ヒト哺乳動物には、例えば、非ヒト霊長類、サル、類人猿、ネコ、イヌ、ウサギ、ウマ、雄ウシ、シカ、バイソン、家畜（例えば、ウシ、去勢牛などのウシ種、ヒツジ、ヤギなどのヒツジ種、並びにブタ、及びイノシシなどのブタ種）が含まれる。鳥類には、例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、ダチョウ、ガチョウ、アヒルなどが含まれる。飼育動物及び農業用動物も含まれる。「非ヒト」という用語はヒトを除外する。具体的な例には、ヒト細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、及び非ヒト霊長類細胞が含まれるが、これらに限定されない。具体的な例では、細胞は、ヒト細胞である。同様に、細胞は、任意の好適なタイプの細胞であり得る。具体的な例では、細胞は、肝細胞などの肝臓細胞（例えば、ヒト肝臓細胞又はヒト肝細胞）である。

【０６００】

細胞は、単離された細胞（例えば、インビトロ）、エクスビボ細胞であり得るか、又は動物内（すなわち、対象内）でインビボであり得る。具体的な例では、細胞は、インビボである（例えば、ＦＩＸ欠乏症又は血友病（例えば、血友病Ｂ）を有する対象において）。細胞は、有糸分裂能力のある細胞又は有糸分裂的に不活性な細胞、減数分裂能力のある細胞又は減数分裂的に不活性な細胞であり得る。同様に、細胞はまた、初代体細胞又は初代体細胞ではない細胞であり得る。体細胞には、配偶子、生殖細胞、配偶子細胞、又は未分化幹細胞ではない任意の細胞が含まれる。例えば、細胞は、肝細胞（例えば、マウス、

非ヒト霊長類、又はヒト肝細胞）などの肝臓細胞であり得る。

【０６０１】

本明細書で提供される細胞は、正常で健康な細胞であり得るか、又は病変した細胞若しくは変異体を担持する細胞であり得る。例えば、細胞は、ＦＩＸ欠乏症を有し得るか、又はＦＩＸ欠乏症若しくは血友病（例えば、血友病Ｂ）を有する対象からのものであり得る。

【０６０２】

細胞は、分裂細胞（例えば、活発に分裂している細胞）であり得る。細胞はまた、非分裂細胞であり得る。非分裂細胞は、最終的に分化し、分裂しない細胞、並びに分裂しないが細胞分裂及び増殖に再び入る能力を保持する静止細胞を指す。例えば、肝臓細胞は、（例えば、損傷又は切除された場合に）分裂する能力を保持するが、典型的には分裂しない。有糸分裂細胞分裂の間、相同組換えは、ゲノムが保護され、二本鎖切断が修復される機構である。非分裂細胞は、相同組換え（ＨＲ）が、（例えば、対照分裂細胞と比較して）二本鎖ＤＮＡ切断が細胞において修復される主要な機構ではない細胞を指し得る。非分裂細胞は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）が、（例えば、対照分裂細胞と比較して）二本鎖ＤＮＡ切断が細胞において修復される主要な機構である細胞を指し得る。非分裂細胞型は、例えば、活性ＮＨＥＪ二本鎖ＤＮＡ切断修復機構によって、文献に記載されている。例えば、Ｉｙａｍａ，ＤＮＡ　Ｒｅｐａｉｒ（Ａｍｓｔ．）２０１３，１２（８）：６２０－６３６を参照されたい

【０６０３】

対象におけるＦＩＸ欠乏症を治療する方法、及び対象における血友病Ｂを治療する方法、及び血友病Ｂを有する対象における自然出血を予防又は阻害する方法も提供される。血友病Ｂは、任意のタイプの血友病Ｂ（例えば、軽度の血友病Ｂ、中程度の血友病Ｂ、又は重度の血友病Ｂ）であり得る。血友病Ｂは、本明細書の他の場所でより詳細に記載されている。そのような方法は、対象において治療有効レベルのＦＩＸ発現を達成するように、本明細書に記載のＦ９核酸構築物のうちのいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のＦ９核酸構築物を含む組成物のうちのいずれか）を対象に投与することを含み得る。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物又はＦ９核酸構築物を含む組成物は、ヌクレアーゼ剤なしで投与され得る（例えば、Ｆ９核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座への組み込みなしにＦＩＸの発現に必要とされる要素を含む場合）。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的遺伝子内のヌクレアーゼ標的配列を切断して切断部位を作製することができ、Ｆ９核酸構築物は、切断部位に挿入されて、修飾された標的遺伝子を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、対象において治療有効レベルのＦＩＸ発現を達成するように、修飾された標的遺伝子から発現することができる。ＦＩＸコード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得るか、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、標的遺伝子は、ＡＬＢ（例えば、ＡＬＢのイントロン１）である。そのような方法では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質をＡＬＢ遺伝子のイントロン１内のガイドＲＮＡ標的配列に標的とすることができ、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡ標的配列を切断して切断部位を作製することができ、核酸構築物は、切断部位に挿入されて、修飾されたＡＬＢ遺伝子を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、対象において治療有効レベルのＦＩＸ発現を達成するように、修飾されたＡＬＢ遺伝子から発現することができる。

【０６０４】

対象におけるＦＩＸ欠乏症を治療する方法、及び対象における血友病Ｂを治療する方法、及び血友病Ｂを有する対象における自然出血を予防又は阻害する方法も提供される。対象は、いくつかの方法において新生児対象であり得る。他の方法では、対象は、新生児対象ではない。対象は、いくつかの方法において幼若対象であり得る。他の方法では、対象

は、幼若対象ではない。血友病Ｂは、任意のタイプの血友病Ｂ（例えば、軽度の血友病Ｂ、中程度の血友病Ｂ、又は重度の血友病Ｂ）であり得る。血友病Ｂは、本明細書の他の場所でより詳細に記載されている。そのような方法は、対象において治療有効レベルのＦＩＸタンパク質発現又は治療有効レベルの循環ＦＩＸタンパク質を達成するように、本明細書に記載のＦ９核酸構築物のうちのいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子を含む、本明細書に記載のＦ９核酸構築物を含む組成物のうちのいずれか）を対象に投与することを含み得る。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物又はＦ９核酸構築物を含む組成物は、ヌクレアーゼ剤なしで投与され得る（例えば、Ｆ９核酸構築物が、標的ゲノム遺伝子座への組み込みなしにＦＩＸタンパク質の発現に必要とされる要素を含む場合）。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に（例えば、同時に又は任意の順序で逐次的に）投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、標的遺伝子）内のヌクレアーゼ標的配列を切断することができ、Ｆ９核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に挿入されて、修飾された標的ゲノム遺伝子座を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、（例えば、対象において治療有効レベルのＦＩＸタンパク質発現又は治療有効レベルの循環ＦＩＸタンパク質を達成するように）修飾された標的ゲノム遺伝子座から発現することができる。Ｆ９コード配列は、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれると、標的ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結され得るか、又は核酸構築物に存在する外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、標的遺伝子は、ＡＬＢ（例えば、ＡＬＢのイントロン１）である。そのような方法では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質をＡＬＢ遺伝子のイントロン１内のガイドＲＮＡ標的配列に標的とすることができ、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡ標的を切断することができ、核酸構築物は、ＡＬＢ遺伝子に挿入されて、修飾されたＡＬＢ遺伝子を作製することができ、ＦＩＸタンパク質は、（例えば、対象において治療有効レベルのＦＩＸタンパク質発現又は治療有効レベルの循環ＦＩＸタンパク質を達成するように）修飾されたＡＬＢ遺伝子から発現することができる。

【０６０５】

治療は、対象における疾患又は障害のための治療薬の任意の投与又は適用を指し、疾患を阻害すること、その発症を阻止すること、疾患の１つ以上の症状を軽減すること、疾患を治癒すること、又は疾患の１つ以上の症状の再発を予防することを含む。例えば、血友病Ｂの治療は、血友病Ｂの症状を緩和することを含み得る。１つの具体的な例では、血友病Ｂを有する対象における自然出血を予防又は阻害する方法が提供される。血友病Ｂは、上で詳細に記載されており、欠損又は欠陥Ｆ９遺伝子又はＦＩＸポリペプチドによって引き起こされる障害を指す。障害は、遺伝性及び／又は後天性（例えば、遺伝子における自然発生的な変異によって引き起こされる）状態を含む。欠陥Ｆ９遺伝子又はＦＩＸポリペプチドは、血漿中のＦＩＸレベルの低減及び／又はＦＩＸの凝固活性の低減をもたらし得る。血友病Ｂには、軽度、中程度、及び重度の血友病Ｂが含まれる。例えば、約１％未満の活性因子を有する個体は重度の血友病を有すると分類され、約１～５％の活性因子を有する個体は中程度の血友病を有し、軽度の血友病を有する個体は約５～４０％の正常レベルの活性凝血因子を有する。本明細書で使用される場合、「正常な」又は「健康な」個体は、５０～１６０％のＦＩＸ活性及び抗原レベルの正常なプール血漿レベルを有する個体を含む。一例では、正常な血漿ＦＩＸレベルは、約３～５μｇ／ｍＬである。具体的な例では、正常なＦＩＸ活性は、ＦＩＸ活性の正常なプール血漿レベルの約１００％であるとみなされるか、又はＦＩＸ活性の正常なプール血漿レベルの１００％であるとみなされる。具体的な例では、正常な血漿ＦＩＸレベルは、約５μｇ／ｍＬであるとみなされるか、又は５μｇ／ｍＬであるとみなされる。いくつかの実施形態では、ＦＩＸ（例えば、循環ＦＩＸ）のレベルは、凝固及び／又は免疫学的アッセイによって測定され得る。ＦＩＸ凝固促進活性は、患者の血漿がＦＩＸ欠乏血漿の凝血時間を補正する能力によって決定され得る。

【０６０６】

いくつかの方法では、治療有効量のＦ９核酸構築物又はＦ９核酸構築物を含む組成物又はＦ９核酸構築物とヌクレアーゼ剤との組み合わせ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）が対象に投与される。治療有効量は、それが投与される所望の効果を生み出す量である。正確な量は、治療の目的に依存し、既知の技術を使用して当業者によって確認可能である。例えば、Ｌｌｏｙｄ（１９９９）Ｔｈｅ Ａｒｔ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｉｎｇを参照されたい。

【０６０７】

本明細書に開示される組成物を含む治療用又は薬学的組成物は、好適な担体、賦形剤、及び改善された移入、送達、耐性などを提供するために製剤に組み込まれる他の薬剤とともに投与され得る。多数の適切な製剤は、全ての薬剤師に既知である処方集に見出すことができる：Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ。また、Ｐｏｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ.「Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ ｏｆ ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ ｆｏｒ ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ」ＰＤＡ（１９９８）Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．５２：２３８－３１１も参照されたい。

【０６０８】

本明細書に開示される組成物は、ＦＩＸ欠乏症又は血友病Ｂの症状のうちの１つ以上の重症度を軽減又は予防又は減少させるために投与され得る。そのような症状は、本明細書の他の場所でより詳細に記載されている。

【０６０９】

上記方法のうちのいずれかにおける対象は、ＦＩＸ欠乏症又は血友病Ｂの回復又は治療を必要とする対象であり得る。上記方法のうちのいずれかにおける対象は、真核生物又は哺乳動物などの任意の好適な種からのものであり得る。哺乳動物は、例えば、非ヒト哺乳動物、ヒト、げっ歯動物、ラット、マウス、又はハムスターであり得る。他の非ヒト哺乳動物には、例えば、非ヒト霊長類、サル、類人猿、ネコ、イヌ、ウサギ、ウマ、雄ウシ、シカ、バイソン、家畜（例えば、ウシ、去勢牛などのウシ種、ヒツジ、ヤギなどのヒツジ種、並びにブタ、及びイノシシなどのブタ種）が含まれる。鳥類には、例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、ダチョウ、ガチョウ、アヒルなどが含まれる。飼育動物及び農業用動物も含まれる。「非ヒト」という用語はヒトを除外する。好適な種の具体的な例には、ヒト、げっ歯類、マウス、ラット、及び非ヒト霊長類が含まれるが、これらに限定されない。具体的な例では、対象は、ヒトである。

【０６１０】

Ｆ９核酸構築物がゲノムに組み込まれる方法では、セーフハーバー遺伝子座（セーフハーバー遺伝子）又は内因性Ｆ９遺伝子座などの、遺伝子を発現することができる任意の標的ゲノム遺伝子座を使用することができる。そのような遺伝子座は、本明細書の他の場所でより詳細に説明されている。具体的な例では、標的ゲノム遺伝子座は、内因性ヒトＡＬＢ遺伝子座などの内因性ＡＬＢ遺伝子座であり得る。例えば、核酸構築物は、内因性ＡＬＢ遺伝子座のイントロン１にゲノムに組み込まれ得る。次いで、内因性ＡＬＢエキソン１は、核酸構築物中のＦＩＸタンパク質のコード配列にスプライスすることができる。

【０６１１】

ＦＩＸコード配列を含むＦ９核酸構築物の標的ゲノム遺伝子座、及び特に内因性ＡＬＢ遺伝子座への標的化挿入は、複数の利点を提供する。そのような方法は、ＦＩＸコード配列の安定した長期の発現を可能にするための安定した修飾をもたらす。ＡＬＢ遺伝子座に関して、そのような方法は、内因性ＡＬＢプロモーター及び調節領域を利用して、治療有効レベルの発現を達成することができる。例えば、核酸構築物中のＦＩＸコード配列は、プロモーターを含まない遺伝子を含み得、挿入された核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、ＡＬＢ遺伝子座）において内因性プロモーターに作動可能に連結され得る。内因性プロモーターの使用は、核酸構築物にプロモーターを含める必要がなく、（例えば、ＡＡＶでは）通常効率的にパッケージングされない可能性があるより大きな導入遺伝子の

パッケージングを可能にするため、有利である。代替的に、核酸構築物中のＦＩＸコード配列は、核酸構築物中の外因性プロモーターに作動可能に連結され得る。使用され得るプロモーターのタイプの例は、本明細書の他の場所で開示されている。

【０６１２】

任意選択的に、標的ゲノム遺伝子座における内因性遺伝子（例えば、内因性ＡＬＢ遺伝子）のいくつか又は全てを、核酸構築物からのＦＩＸコード配列の挿入時に発現させることができる。代替的に、いくつかの方法では、標的ゲノム遺伝子座の内因性遺伝子のいずれも発現されない。一例として、核酸構築物の組み込み後の修飾された標的ゲノム遺伝子座（例えば、修飾されたＡＬＢ遺伝子座）は、内因性分泌シグナル（例えば、アルブミン分泌シグナル）を含むキメラタンパク質及び核酸構築物によってコードされるＦＩＸタンパク質をコードし得る。別の例では、ＡＬＢ遺伝子座の第１のイントロンを標的とすることができる。ＡＬＢの分泌シグナルペプチドは、ＡＬＢ遺伝子のエキソン１によってコードされる。そのようなシナリオでは、スプライスアクセプター及びＦＩＸコード配列を担持するプロモーターを含まないカセットが、ＦＩＸタンパク質の発現及び分泌を支持する。内因性ＡＬＢエキソン１と組み込まれたＦＩＸコード配列との間のスプライシングは、組み込まれた核酸構築物によってコードされるＦＩＸタンパク質配列に作動可能に連結されたエキソン１によってコードされる内因性ＡＬＢ配列を含むキメラｍＲＮＡ及びタンパク質を作製する。

【０６１３】

Ｆ９核酸構築物は、本明細書の他の場所で記載されているように、相同組換え（ＨＲ）及び非相同末端結合（ＮＨＥＪ）を含む任意の手段によって標的ゲノム遺伝子座に挿入することができる。具体的な例では、Ｆ９核酸構築物は、ＮＨＥＪによって挿入される（例えば、ホモロジーアームを含まず、ＮＨＥＪによって挿入される）。

【０６１４】

別の具体的な例では、核酸構築物は、ホモロジー非依存性標的化組み込み（例えば、方向性のあるホモロジー非依存性標的化組み込み）を介して挿入することができる。例えば、核酸構築物中のＦＩＸコード配列は、各側にヌクレアーゼ剤の標的部位が隣接していてもよい（例えば、標的ゲノム遺伝子座と同じ標的部位、及び同じヌクレアーゼ剤が標的ゲノム遺伝子座における標的部位を切断するために使用される）。次いで、ヌクレアーゼ剤は、ＦＩＸコード配列に隣接する標的部位を切断することができる。具体的な例では、核酸構築物は、ＡＡＶ媒介送達で送達され、ＦＩＸコード配列に隣接する標的部位の切断は、ＡＡＶの逆位末端反復（ＩＴＲ）を除去することができる。ＩＴＲを除去すると、繰り返された配列のために配列決定作業が妨げられる可能性があるため、成功したターゲティングの評価が容易になる。いくつかの方法では、ＦＩＸコード配列が正しい向きで標的ゲノム遺伝子座に挿入されている場合、標的ゲノム遺伝子座における標的部位（例えば、隣接するプロトスペーサー隣接モチーフを含むｇＲＮＡ標的配列）はもはや存在しないが、ＦＩＸタンパク質コード配列が逆の向きで標的ゲノム遺伝子座に挿入されると再形成される。これは、ＦＩＸコード配列が発現のために正しい向きで挿入されることを確実にするのに役立ち得る。

【０６１５】

上記方法のうちのいずれかにおいて、Ｆ９核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）と同時に投与され得るか、又は同時に投与され得ない（例えば、任意の組み合わせで逐次的に）。例えば、Ｆ９核酸構築物及びヌクレアーゼ剤を含む組成物を投与することを含む方法では、それらは別々に投与され得る。例えば、Ｆ９核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤の前に、ヌクレアーゼ剤の後に、又はヌクレアーゼ剤と同時に投与され得る。核酸構築物及びヌクレアーゼ剤を細胞に投与する任意の好適な方法、特に、肝臓に投与する方法を使用することができ、そのような方法の例は、本明細書の他の場所で詳細に記載されている。治療方法又は対象においてインビボで細胞を標的とする方法では、核酸構築物は、対象における特定のタイプの細胞に挿入され得る。Ｆ９核酸構築物及び／又はヌクレアーゼ剤を対象に導入するための方法及びビヒクルは、対象において、どの

タイプの細胞が標的化されるかに影響を及ぼし得る。いくつかの方法では、例えば、核酸構築物は、肝細胞などの肝臓細胞における標的ゲノム遺伝子座（例えば、内因性ＡＬＢ遺伝子座）に挿入される。そのような構築物及びヌクレアーゼ剤を対象に導入するための方法及びビヒクル（脂質ナノ粒子媒介送達及びＡＡＶ媒介送達（例えば、ｒＡＡＶ８媒介送達）並びに静脈内注射などの、肝臓又は肝細胞を標的とする方法及びビヒクルを含む）は、本明細書の他の場所により詳細に開示されている。

【０６１６】

核酸構築物（又はベクター若しくはＬＮＰ）及びヌクレアーゼ剤を含む組成物が投与される方法では（すなわち、核酸構築物（又はベクター若しくはＬＮＰ）及びヌクレアーゼ剤の両方が投与される方法では）、核酸構築物及びヌクレアーゼ剤は、同時に投与され得る。代替的に、核酸構築物及びヌクレアーゼ剤は、任意の順序で逐次的に投与され得る。例えば、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤の後に投与され得るか、又はヌクレアーゼ剤は、核酸構築物の後に投与され得る。例えば、ヌクレアーゼ剤は、核酸構築物の投与の約１時間～約４８時間、約１時間～約２４時間、約１時間～約１２時間、約１時間～約６時間、約１時間～約２時間、約２時間～約４８時間、約２時間～約２４時間、約２時間～約１２時間、約２時間～約６時間、約３時間～約４８時間、約６時間～約４８時間、約１２時間～約４８時間、又は約２４時間～約４８時間の前後に投与され得る。

【０６１７】

一例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与する約４時間、約８時間、約１２時間、約１８時間、約１日、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、又は約１週間前に投与される。別の例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与する少なくとも約４時間、少なくとも約８時間、少なくとも約１２時間、少なくとも約１８時間、少なくとも約１日、少なくとも約２日、少なくとも約３日、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、又は少なくとも約１週間前に投与される。別の例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与する約４時間～約２４時間、約４時間～約１２時間、約４時間～約８時間、約８時間～約２４時間、約１２時間～約２４時間、約１日～約７日、約１日～約６日、約１日～約５日、約１日～約４日、約１日～約３日、約１日～約２日、約２日～約７日、約３日～約７日、約４日～約７日、約５日～約７日、約６日～約７日、又は約１日～約３日前に投与される。

【０６１８】

一例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与してから約４時間、約８時間、約１２時間、約１８時間、約１日、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、又は約１週間後に投与される。別の例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与してから少なくとも約４時間、少なくとも約８時間、少なくとも約１２時間、少なくとも約１８時間、少なくとも約１日、少なくとも約２日、少なくとも約３日、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、又は少なくとも約１週間後に投与される。別の例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与してから約４時間～約２４時間、約４時間～約１２時間、約４時間～約８時間、約８時間～約２４時間、約１２時間～約２４時間、約１日～約７日、約１日～約６日、約１日～約５日、約１日～約４日、約１日～約３日、約１日～約２日、約２日～約７日、約３日～約７日、約４日～約７日、約５日～約７日、約６日～約７日、又は約１日～約３日後に投与される。

【０６１９】

上記方法のうちのいずれかにおいて、Ｆ９核酸構築物及びヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）は、任意の好適な送達系及び既知の方法を使用して投与され得る。ヌクレアーゼ剤成分及びＦ９核酸構築物（例えば、ガイドＲＮＡ、Ｃａｓタンパク質、及びＦ９核酸構築物）は、必要に応じて同じ又は異なる送達方法を使用して、個別に又は任意の組み合わせで一緒に送達され得る。

【０６２０】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系が使用される方法では、ガイドＲＮＡは、例えば、ＲＮＡ（例えば、本明細書に開示される修飾ガイドＲＮＡなどのインビトロ転写ＲＮＡ）の形態で、

又はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡの形態で、対象又は細胞に導入又は投与され得る。ＤＮＡの形態で導入されると、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡは、細胞内で又は対象における細胞内で活性であるプロモーターに作動可能に連結され得る。例えば、ガイドＲＮＡは、ＡＡＶを介して送達され、Ｕ６プロモーターの下で、インビボで発現され得る。そのようなＤＮＡは、１つ以上の発現構築物中にあり得る。例えば、そのような発現構築物は、単一の核酸分子の構成要素であり得る。代替的に、それらは、２つ以上の核酸分子の間で任意の組み合わせで分離することができる（すなわち、１つ以上のＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡをコードするＤＮＡ及び１つ以上のｔｒａｃｒＲＮＡをコードするＤＮＡは、別個の核酸分子の構成要素であり得る）。

【０６２１】

同様に、Ｃａｓタンパク質は、任意の形態で対象又は細胞に導入され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、ｇＲＮＡと複合体を形成したＣａｓタンパク質などのタンパク質の形態で提供され得る。代替的に、Ｃａｓタンパク質は、本明細書に開示される修飾ｍＲＮＡなどのＲＮＡ（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））又はＤＮＡ）などの、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸の形態で提供され得る。任意選択的に、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞又は生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、哺乳動物細胞、ヒト細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、又は任意の他の目的の宿主細胞においてより高い頻度で使用される代替コドンへと修飾され得る。Ｃａｓタンパク質をコードする核酸が細胞又は対象に導入されると、Ｃａｓタンパク質は、一過性に、条件付きで、又は構成的に細胞内で又は対象における細胞内で発現され得る。

【０６２２】

一例では、Ｃａｓタンパク質は、ｍＲＮＡ（例えば、本明細書に開示される修飾ｍＲＮＡ）の形態で導入され、ガイドＲＮＡは、本明細書に開示される修飾ｇＲＮＡなどのＲＮＡの形態で（例えば、同じ脂質ナノ粒子内に一緒に）導入される。ガイドＲＮＡは、本明細書の他の場所に開示されるように修飾され得る。同様に、Ｃａｓ　ｍＲＮＡは、本明細書の他の場所に開示されるように修飾され得る。

【０６２３】

遺伝子編集系（例えば、Ｃａｓタンパク質）による切断後にＦ９核酸構築物が挿入される方法では、遺伝子編集系（例えば、Ｃａｓタンパク質）は、標的ゲノム遺伝子座を切断して一本鎖切断（ニック）又は二本鎖切断を作製することができ、切断された又はニックの入った遺伝子座は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）媒介挿入又は相同組換え修復を介してＦ９核酸構築物の挿入によって修復することができる。任意選択的に、Ｆ９核酸構築物による修復は、ガイドＲＮＡ標的配列を除去又は破壊し、その結果、標的化されている対立遺伝子は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ試薬によって再標的化され得ない。

【０６２４】

本明細書の他の場所でより詳細に説明されるように、Ｆ９核酸構築物は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はリボ核酸（ＲＮＡ）を含み得、それらは一本鎖又は二本鎖であり得、それらは直線状又は環状の形態であり得る。Ｆ９核酸構築物は、ネイキッド核酸であり得るか、又はＡＡＶなどのウイルスによって送達され得る。具体的な例では、Ｆ９核酸構築物は、ＡＡＶを介して送達され得、非相同末端結合によって標的ゲノム遺伝子座（例えば、セーフハーバー遺伝子、ＡＬＢ遺伝子、又はＡＬＢ遺伝子のイントロン１）に挿入することが可能であり得る（例えば、Ｆ９核酸構築物は、ホモロジーアームを含まないものであり得る）。

【０６２５】

いくつかのＦ９核酸構築物は、非相同末端結合によって挿入することが可能である。場合によっては、そのようなＦ９核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。例えば、そのようなＦ９核酸構築物は、Ｃａｓタンパク質による切断後の平滑末端二本鎖切断に挿入され得る。具体的な例では、Ｆ９核酸構築物は、ＡＡＶを介して送達され得、非相同末端

結合によって挿入することが可能であり得る（例えば、Ｆ９核酸構築物は、ホモロジーアームを含まないものであり得る）。

【０６２６】

別の例では、Ｆ９核酸構築物は、ホモロジー非依存性標的化組み込みを介して挿入され得る。例えば、Ｆ９核酸構築物は、各側にガイドＲＮＡ標的配列（例えば、標的ゲノム遺伝子座と同じ標的部位、及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ試薬（Ｃａｓタンパク質及びガイドＲＮＡ）が標的ゲノム遺伝子座における標的部位を切断するために使用される）が隣接していてもよい。次いで、Ｃａｓタンパク質は、核酸インサートに隣接する標的部位を切断することができる。具体的な例では、Ｆ９核酸構築物は、ＡＡＶ媒介送達で送達され、核酸インサートに隣接する標的部位の切断は、ＡＡＶの逆位末端反復（ＩＴＲ）を除去することができる。いくつかの方法では、核酸インサートが正しい向きで標的ゲノム遺伝子座に挿入されている場合、標的ゲノム遺伝子座における標的部位（例えば、隣接するプロトスペーサー隣接モチーフを含むガイドＲＮＡ標的配列）はもはや存在しないが、核酸インサートが逆の向きで標的ゲノム遺伝子座に挿入されると再形成される。

【０６２７】

本明細書に開示される方法は、Ｆ９核酸構築物、及び任意選択的に、核酸（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ）、タンパク質、又は核酸－タンパク質複合体の形態を含む、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ試薬などのヌクレアーゼ剤を、対象（例えば、動物又はヒトなどの哺乳動物）又は細胞に導入又は投与することを含み得る。「導入すること」又は「投与すること」は、細胞の内部又は対象内の細胞の内部にアクセスできるような様式で、細胞又は対象に分子（例えば、核酸又はタンパク質）を提示することが含まれる。導入することは、任意の手段によって達成され得、構成要素のうちの２つ以上（例えば、構成要素のうちの２つ、又は構成要素の全て）を、任意の組み合わせで同時に又は逐次的に細胞又は動物に導入し得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡの導入前に細胞又は対象に導入され得るか、又はガイドＲＮＡの導入後に導入され得る。別の例として、Ｆ９核酸構築物は、Ｃａｓタンパク質及びガイドＲＮＡの導入前に導入され得るか、又はＣａｓタンパク質及びガイドＲＮＡの導入後に導入され得る（例えば、Ｆ９核酸構築物は、Ｃａｓタンパク質及びガイドＲＮＡの導入の約１、２、３、４、８、１２、２４、３６、４８、又は７２時間前又は後に投与され得る）。例えば、米国特許出願公開第２０１５／０２４０２６３号及び米国特許出願公開第２０１５／０１１０７６２号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。加えて、構成要素のうちの２つ以上は、同じ送達方法又は異なる送達方法によって細胞又は対象に導入され得る。同様に、構成要素のうちの２つ以上は、同じ投与経路又は異なる投与経路によって対象に導入され得る。

【０６２８】

ガイドＲＮＡは、例えば、ＲＮＡ（例えば、インビトロ転写ＲＮＡ）の形態で、又はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡの形態で、対象又は細胞に導入され得る。ガイドＲＮＡは、本明細書の他の場所に開示されるように修飾され得る。ＤＮＡの形態で導入されると、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡは、細胞内で又は対象における細胞内で活性であるプロモーターに作動可能に連結され得る。例えば、ガイドＲＮＡは、ＡＡＶを介して送達され、Ｕ６プロモーターの下で、インビボで発現され得る。そのようなＤＮＡは、１つ以上の発現構築物中にあり得る。例えば、そのような発現構築物は、単一の核酸分子の構成要素であり得る。代替的に、それらは、２つ以上の核酸分子の間で任意の組み合わせで分離することができる（すなわち、１つ以上のＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡをコードするＤＮＡ及び１つ以上のｔｒａｃｒＲＮＡをコードするＤＮＡは、別個の核酸分子の構成要素であり得る）。

【０６２９】

同様に、Ｃａｓタンパク質は、任意の形態で提供され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、ｇＲＮＡと複合体を形成したＣａｓタンパク質などのタンパク質の形態で提供され得る。代替的に、Ｃａｓタンパク質は、ＲＮＡ（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ

））又はＤＮＡなどの、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸の形態で提供され得る。Ｃａｓ　ＲＮＡは、本明細書の他の場所に開示されるように修飾され得る。任意選択的に、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞又は生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、哺乳動物細胞、ヒト細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、又は任意の他の目的の宿主細胞においてより高い頻度で使用される代替コドンへと修飾され得る。Ｃａｓタンパク質をコードする核酸が細胞又は対象に導入されると、Ｃａｓタンパク質は、一過性に、条件付きで、又は構成的に細胞内で又は対象における細胞内で発現され得る。

【０６３０】

Ｃａｓタンパク質又はガイドＲＮＡをコードする核酸は、発現構築物中のプロモーターに作動可能に連結され得る。発現構築物は、遺伝子又は他の目的の核酸配列（例えば、Ｃａｓ遺伝子）の発現を指示することができ、そのような目的の核酸配列を標的細胞に移入することができる任意の核酸構築物を含む。例えば、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、１つ以上のｇＲＮＡをコードするＤＮＡを含むベクター内に存在し得る。代替的に、それは、１つ以上のｇＲＮＡをコードするＤＮＡを含むベクターとは別のベクター又はプラスミドであり得る。発現構築物で使用され得る好適なプロモーターには、例えば、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、ウサギ細胞、多能性細胞、胚性幹（ＥＳ）細胞、成体幹細胞、発達的に制限された前駆細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、又は１細胞期胚のうちの１つ以上において活性なプロモーターが含まれる。例えば、好適なプロモーターは、肝細胞などの肝臓細胞において活性であり得る。そのようなプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、又は組織特異的プロモーターであり得る。任意選択的に、プロモーターは、一方向のＣａｓタンパク質及び他の方向のガイドＲＮＡの両方の発現を駆動する双方向プロモーターであり得る。そのような双方向プロモーターは、（１）遠位配列要素（ＤＳＥ）、近位配列要素（ＰＳＥ）、及びＴＡＴＡボックスの３つの外部制御要素を含む完全な従来の一方向Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター、並びに（２）ＤＳＥの５’末端に逆方向に融合されたＰＳＥ及びＴＡＴＡボックスを含む第２の基本的なＰｏｌ　ＩＩＩプロモーターからなり得る。例えば、Ｈ１プロモーターでは、ＤＳＥはＰＳＥ及びＴＡＴＡボックスに隣接しており、プロモーターは、Ｕ６プロモーターに由来するＰＳＥ及びＴＡＴＡボックスを追加することによって逆方向の転写が制御されるハイブリッドプロモーターを作成することにより、双方向にすることができる。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１６／００７４５３５号を参照されたい。双方向プロモーターを使用してＣａｓタンパク質及びガイドＲＮＡをコードする遺伝子を同時に発現させることにより、コンパクトな発現カセットを生成して送達を容易にすることを可能にする。

【０６３１】

対象又は細胞に導入された分子（例えば、Ｃａｓタンパク質又はガイドＲＮＡ又は核酸をコードする）は、導入された分子の安定性を増加させる（例えば、所定の保存条件下（例えば、－２０℃、４℃、又は周囲温度）で、分解産物が閾値未満、例えば出発核酸又はタンパク質の０．５重量％未満のままである期間を延長するか、又はインビボでの安定性を増加させる）担体を含む組成物で提供され得る。そのような担体の非限定的な例には、ポリ（乳酸）（ＰＬＡ）ミクロスフェア、ポリ（Ｄ，Ｌ－乳酸－コグリコール－酸）（ＰＬＧＡ）ミクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コキレート、及び脂質微小管が含まれる。

【０６３２】

細胞又は対象への分子（例えば、核酸又はタンパク質）の導入を可能にするために、種々の方法及び組成物が本明細書で提供される。分子を種々の細胞型に導入するための方法は既知であり、例えば、安定したトランスフェクション法、一過性トランスフェクション法、及びウイルス媒介法が含まれる。

【０６３３】
トランスフェクションプロトコル、及び分子を細胞に導入するためのプロトコルは異なり得る。非限定的なトランスフェクション法には、リポソーム、ナノ粒子、リン酸カルシウム（Ｇｒａｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．（１９７３）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ５２（２）：４５６－６７、Ｂａｃｃｈｅｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９７７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．」７４（４）：１５９０－４、及びＫｒｉｅｇｌｅｒ，Ｍ（１９９１）．Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ａｎｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ．Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ．ｐｐ．９６－９７）、デンドリマー、又はＤＥＡＥ－デキストラン若しくはポリエチレンイミンなどのカチオン性ポリマーを使用する化学的ベースのトランスフェクション法が含まれる。非化学的方法には、電気穿孔法、ソノポレーション、及び光トランスフェクションが含まれる。粒子ベースのトランスフェクションには、遺伝子銃の使用、又はマグネットアシストトランスフェクション（Ｂｅｒｔｒａｍ（２００６）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　７，２７７－２８）が含まれる。ウイルス法もトランスフェクションに使用され得る。

【０６３４】
細胞への核酸又はタンパク質の導入はまた、電気穿孔法、細胞質内注射、ウイルス感染、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、トランスフェクション、脂質媒介トランスフェクション、又はヌクレオフェクションによって媒介され得る。ヌクレオフェクションは、核酸基質を細胞質だけでなく核膜を介して核に送達することを可能にする改善された電気穿孔法技術である。加えて、本明細書に開示される方法でのヌクレオフェクションの使用は、典型的には、通常の電気穿孔法よりもはるかに少ない細胞を必要とする（例えば、通常の電気穿孔法による７００万に対してわずか約２００万）。一例では、ヌクレオフェクションは、ＬＯＮＺＡ（登録商標）ＮＵＣＬＥＯＦＥＣＴＯＲ（商標）系を使用して実施される。

【０６３５】
細胞（例えば、接合子）への分子（例えば、核酸又はタンパク質）の導入は、マイクロインジェクションによっても達成され得る。接合子（すなわち、１細胞期胚）では、マイクロインジェクションは母体及び／又は父方の前核又は細胞質に行うことができる。マイクロインジェクションが１つの前核のみに行われる場合は、サイズが大きいため、父方の前核が適している。ｍＲＮＡのマイクロインジェクションは、好ましくは細胞質へ（例えば、ｍＲＮＡを翻訳機構に直接送達するために）のものであるが、一方で、Ｃａｓタンパク質若しくはＣａｓタンパク質をコードするか又はＲＮＡをコードするポリヌクレオチドのマイクロインジェクションは、核／前核へのものが好ましい。代替的に、マイクロインジェクションは、核／前核及び細胞質の両方への注射によって実施することができ、針を最初に核／前核に導入し、最初の量を注射することができ、１細胞期胚から針を除去しながら、２番目の量を細胞質に注射することができる。Ｃａｓタンパク質が細胞質に注入される場合、Ｃａｓタンパク質は、核／前核への送達を確実にするために、核局在化シグナルを含むことが好ましい。マイクロインジェクションを実施する方法は周知である。例えば、Ｎａｇｙ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｇｙ　Ａ，Ｇｅｒｔｓｅｎｓｔｅｉｎ　Ｍ，Ｖｉｎｔｅｒｓｔｅｎ　Ｋ，Ｂｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｒ．，２００３，Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ　ｔｈｅ　Ｍｏｕｓｅ　Ｅｍｂｒｙｏ．Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ）を参照されたく、また、Ｍｅｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０１０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．」１０７：１５０２２－１５０２６、及びＭｅｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．」１０９：９３５４－９３５９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０６３６】
分子（例えば、核酸又はタンパク質）を細胞又は対象に導入するための他の方法には、

例えば、ベクター送達、粒子媒介送達、エクソソーム媒介送達、脂質ナノ粒子媒介送達、細胞透過性ペプチド媒介送達、又は埋め込み型デバイス媒介送達が含まれ得る。具体的な例として、核酸又はタンパク質は、ポリ（乳酸）（ＰＬＡ）マイクロスフェア、ポリ（Ｄ，Ｌ－乳酸－コグリコール酸）（ＰＬＧＡ）マイクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コキレート、又は脂質微小管などの担体中で、細胞又は対象に導入され得る。対象への送達のいくつかの具体的な例には、流体力学的送達、ウイルス媒介送達（例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）媒介送達）、及び脂質ナノ粒子媒介送達が含まれる。

【０６３７】

細胞又は対象への核酸及びタンパク質の導入は、流体力学的送達（hydrodynamic delivery、ＨＤＤ）によって達成され得る。実質細胞への遺伝子送達では、必須のＤＮＡ配列のみを選択した血管から注射する必要があり、現在のウイルス及び合成ベクターに関連する安全性の懸念が排除される。ＤＮＡは血流に注入されると、血液にアクセスできる様々な組織の細胞に到達することができる。流体力学的送達は、循環中の非圧縮性血液への大量の溶液の迅速な注射によって生成される力を利用して、大きくかつ膜不透過性の化合物が実質細胞に入るのを妨げる内皮及び細胞膜の物理的障壁を克服する。ＤＮＡの送達に加えて、この方法は、ＲＮＡ、タンパク質、及び他の小さな化合物をインビボで効率的に細胞内に送達するのに有用である。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｂｏｎａｍａｓｓａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．２８（４）：６９４－７０１を参照されたい。

【０６３８】

核酸の導入は、ＡＡＶ媒介送達又はレンチウイルス媒介送達などのウイルス媒介送達によっても達成することができる。他の例示的なウイルス／ウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、及び単純ヘルペスウイルスが含まれる。ウイルスは、分裂細胞、非分裂細胞、又は分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染し得る。ウイルスは、宿主ゲノムに組み込むことができるか、又は代替的に宿主ゲノムに組み込まない。このようなウイルスは、免疫力が低減するように操作することもできる。ウイルスは、複製可能であり得、複製欠損性（例えば、ビリオン複製及び／又はパッケージングの追加ラウンドに必要な１つ以上の遺伝子に欠損がある）であり得る。ウイルスは、一過性の発現、長期的な発現（例えば、少なくとも１週間、２週間、１ヶ月、２ヶ月、又は３ヶ月）、又は永続的な発現（例えば、Ｃａｓ９及び／又はｇＲＮＡの）を引き起こし得る。ウイルスベクターは、それらの野生型対応物から遺伝的に修飾され得る。例えば、ウイルスベクターは、クローニングを容易にするために、又はベクターの１つ以上の特性が変化するように、１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含み得る。そのような特性には、パッケージング容量、形質導入効率、免疫原性、ゲノム組み込み、複製、転写、及び翻訳が含まれ得る。いくつかの例では、ウイルスゲノムの一部は、ウイルスがより大きなサイズを有する外因性配列をパッケージングすることができるように欠失され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、増強された形質導入効率を有し得る。いくつかの例では、宿主においてウイルスによって誘導される免疫応答が低減され得る。いくつかの例では、宿主ゲノムへのウイルス配列の組み込みを促進するウイルス遺伝子（インテグラーゼなど）は、ウイルスが非組み込み型になるように変異され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、複製欠損性であり得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、ベクター上のコード配列の発現を駆動するための外因性転写又は翻訳制御配列を含み得る。いくつかの例では、ウイルスは、ヘルパー依存性であり得る。例えば、ウイルスは、ベクターを増幅してウイルス粒子にパッケージングするのに必要とされるウイルス成分（ウイルスタンパク質など）を供給するために、１つ以上のヘルパーウイルスを必要とし得る。そのような場合、ウイルス成分をコードする１つ以上のベクターを含む１つ以上のヘルパー成分が、本明細書に記載のベクター系とともに宿主細胞又は宿主細胞の集団に導入され得る。他の例では、ウイルスは、ヘルパーフリーであり得る。例えば、ウイルスは、ヘルパーウイルスなしでベクターを増幅及びパッケージングすることが可能であり得る。いくつかの例では、本明細書に記載のベクター系はまた、ウイルス

増幅及びパッケージングに必要とされるウイルス成分をコードし得る。

【０６３９】

例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）としては、約10^{12}、約10^{13}、約10^{14}、約10^{15}及び約10^{16}のベクターゲノム（ｖｇ）／ｍＬ、又は約10^{12}～約10^{16}、約10^{12}～約10^{15}、約10^{12}～約10^{14}、約10^{12}～約10^{13}、約10^{13}～約10^{16}、約10^{14}～約10^{16}、約10^{15}～約10^{16}、若しくは約10^{13}～約10^{15}ｖｇ／ｍＬが挙げられる。他の例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）としては、約10^{12}、約10^{13}、約10^{14}、約10^{15}及び約10^{16}のベクターゲノム（ｖｇ）／ｋｇの体重、又は約10^{12}～約10^{16}、約10^{12}～約10^{15}、約10^{12}～約10^{14}、約10^{12}～約10^{13}、約10^{13}～約10^{16}、約10^{14}～約10^{16}、約10^{15}～約10^{16}、若しくは約10^{13}～約10^{15}ｖｇ／ｋｇの体重が挙げられる。一例では、ウイルス力価は、約10^{13}～約10^{14}ｖｇ／ｍＬ又はｖｇ／ｋｇである。別の例では、ウイルス力価は、約10^{12}～約10^{13}ｖｇ／ｍＬ又はｖｇ／ｋｇ（例えば、約10^{12}～約10^{13}ｖｇ／ｋｇ）である。別の例では、ウイルス力価は、約10^{12}～約10^{14}ｖｇ／ｍＬ又はｖｇ／ｋｇ（例えば、約10^{12}～約10^{14}ｖｇ／ｋｇ）である。例えば、ウイルス力価は、約１．５Ｅ１２～約１．５Ｅ１３ｖｇ／ｋｇであり得るか、約１．５Ｅ１２ｖｇ／ｋｇであり得るか、又は約１．５Ｅ１３ｖｇ／ｋｇであり得る。本方法における使用のためのＡＡＶは、本明細書の他の場所でより詳細に論じられている。

【０６４０】

核酸及びタンパク質の導入は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）媒介送達によっても達成され得る。例えば、ＬＮＰ媒介送達は、Ｃａｓ　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡの組み合わせ、又はＣａｓタンパク質及びガイドＲＮＡの組み合わせを送達するために使用され得る。ＬＮＰ媒介送達は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを送達するために使用され得る。具体的な例では、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質はそれぞれ、同じＬＮＰでのＬＮＰ媒介送達を介してＲＮＡの形態で導入される。本明細書の他の場所でより詳細に論じられるように、ＲＮＡのうちの１つ以上が修飾され得る。例えば、ガイドＲＮＡは、５’末端及び／又は３’末端に１つ以上の安定化末端修飾を含むように修飾され得る。そのような修飾には、例えば、５’末端及び／若しくは３’末端の１つ以上のホスホロチオエート連結、又は５’末端及び／若しくは３’末端の１つ以上の２’－Ｏ－メチル修飾が含まれ得る。別の例として、Ｃａｓ　ｍＲＮＡ修飾は、シュードウリジンでの置換（例えば、シュードウリジンで完全に置換される）、５’キャップ、及びポリアデニル化を含み得る。別の例として、ＣａｓｍＲＮＡ修飾は、Ｎ１－メチル－シュードウリジンでの置換（例えば、Ｎ１－メチル－シュードウリジンで完全に置換される）、５’キャップ、及びポリアデニル化を含み得る。他の修飾もまた、本明細書の他の場所に開示されるように企図される。そのような方法による送達は、一過性のＣａｓ発現及び／又は一過性のガイドＲＮＡの存在をもたらし得、生分解性脂質はクリアランスを改善し、忍容性を改善し、免疫原性を減少させる。脂質製剤は、生体分子を分解から保護すると同時に、細胞への取り込みを改善することができる。脂質ナノ粒子は、分子間力によって互いに物理的に結合した複数の脂質分子を含む粒子である。これらには、ミクロスフェア（単層及び多層ベシクル、例えば、リポソームを含む）、エマルジョン中の分散相、ミセル、又は懸濁液中の内相が含まれる。そのような脂質ナノ粒子は、送達のために１つ以上の核酸又はタンパク質をカプセル化するために使用することができる。カチオン性脂質を含む製剤は、核酸などのポリアニオンを送達するのに有用である。含めることができる他の脂質は、中性脂質（すなわち、非荷電又は両性イオン脂質）、アニオン性脂質、トランスフェクションを増強するヘルパー脂質、及びナノ粒子がインビボで存在することができる時間の長さを増加させるステルス脂質である。好適なカチオン性脂質、中性脂質、アニオン性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質の例は、全ての目的のためにそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１６／０１０８４０（Ａ１）号及び国際公開第２０１７／１７３０５４（Ａ１）号に見出すことができる。例示的な脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質及び１つ以上の他の成

分を含むことができる。一例において、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質を含むことができる。別の例において、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質及びＤＳＰＣなどの中性脂質を含むことができる。別の例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質、ＤＳＰＣなどの任意選択的な中性脂質、及びＳ０１０、Ｓ０２４、Ｓ０２７、Ｓ０３１、又はＳ０３３などのステルス脂質を含むことができる。

【０６４１】

ＬＮＰは、以下のうちの１つ以上又は全てを含有してもよい：（ｉ）カプセル化及びエンドソーム脱出のための脂質、（ｉｉ）安定化のための中性脂質、（ｉｉｉ）安定化のためのヘルパー脂質、及び（ｉｖ）ステルス脂質。例えば、Ｆｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ．２２（９）：２２２７－２２３５及び国際公開第２０１７／１７３０５４（Ａ１）号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ある特定のＬＮＰにおいて、カーゴは、ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする核酸を含み得る。特定のＬＮＰにおいて、カーゴは、Ｃａｓ９などのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、及びガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする核酸を含み得る。ある特定のＬＮＰにおいて、カーゴは、Ｆ９核酸構築物を含み得る。ある特定のＬＮＰにおいて、カーゴは、Ｃａｓ９などのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする核酸、及びＦ９核酸構築物を含み得る。本方法における使用のためのＬＮＰは、本明細書の他の場所でより詳細に記載されている。

【０６４２】

ＬＮＰの例示的な投薬は、総ＲＮＡ（Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ）カーゴ含有量に関して約０．１、約０．２５、約０．３、約０．５、約１、約２、約３、約４、約５、約６、約８、若しくは約１０ｍｇ／ｋｇの体重（ｍｐｋ）、又は約０．１～約１０、約０．２５～約１０、約０．３～約１０、約０．５～約１０、約１～約１０、約２～約１０、約３～約１０、約４～約１０、約５～約１０、約６～約１０、約８～約１０、約０．１～約８、約０．１～約６、約０．１～約５、約０．１～約４、約０．１～約３、約０．１～約２、約０．１～約１、約０．１～約０．５、約０．１～約０．３、約０．１～約０．２５、約０．２５～約８、約０．３～約６、約０．５～約５、約１～約５、若しくは約２～約３ｍｇ／ｋｇの体重を含む。そのようなＬＮＰは、例えば、静脈内に投与することができる。一例では、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ、約０．１～約１０ｍｇ／ｋｇ、又は約０．０１～約０．３ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量を使用することができる。例えば、約０．０１、約０．０３、約０．１、約０．３、約０．５、約１、約２、約３、又は約１０ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量を使用することができる。別の例では、約０．５～約１０、約０．５～約５、約０．５～約３、約１～約１０、約１～約５、約１～約３、又は約１～約２ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量を使用することができる。別の例では、約０．５～約３、約０．５～約２．５、約０．５～約２、約０．５～約１．５、約０．５～約１、約１～約３、約１～約２．５、約１～約２、又は約１～約１．５ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量を使用することができる。別の例では、約１ｍｇ／ｋｇのＬ

ＮＰ用量を使用することができる。

【０６４３】

免疫原性を低下させるために、送達様式を選択することができる。例えば、Ｃａｓタンパク質及びｇＲＮＡは、異なる様式（例えば、バイモーダル（bi-modal）送達）によって送達され得る。これらの異なる様式は、対象の送達された分子（例えば、Ｃａｓ又は核酸をコードする、ｇＲＮＡ又は核酸をコードする、又はＦ９核酸構築物）に異なる薬力学又は薬物動態特性を与える可能性がある。例えば、異なる様式は、異なる組織分布、異なる半減期、又は異なる時間的分布をもたらす可能性がある。いくつかの送達様式（例えば、自律複製又はゲノム組み込みによって細胞内で持続する核酸ベクターの送達）は、分子のより持続的な発現及び存在をもたらすが、他の送達様式は、一過性で持続性が低い（例えば、ＲＮＡ又はタンパク質の送達）。例えばｍＲＮＡ又はタンパク質としてのより一時的な方法でのＣａｓタンパク質の送達は、Ｃａｓ／ｇＲＮＡ複合体が短期間のみ存在し、活性であることを保証し、ＭＨＣ分子によって細胞の表面に表示される細菌由来のＣａｓ酵素からのペプチドによって引き起こされる免疫原性を低下させることができる。そのような一過性な送達は、オフターゲット修飾の可能性を低減させることもできる。

【０６４４】

インビボでの投与は、例えば、非経口、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、局所、鼻腔内、又は筋肉内を含む任意の好適な経路によることができる。全身投与様式には、例えば、経口及び非経口経路が含まれる。非経口経路の例には、静脈内、動脈内、骨内、筋肉内、皮内、皮下、鼻腔内、及び腹腔内経路が含まれる。具体的な例は、静脈内注入である。鼻腔内注入及び硝子体内注射は、他の具体的な例である。局所投与様式には、例えば、髄腔内、脳室内、実質内（例えば、線条体（例えば、尾状核又は被殻へ）、大脳皮質、前中心回旋、海馬（例えば、歯状回又はＣＡ３領域）、側頭皮質、扁桃体、前頭皮質、視床、小脳、髄質、視床、視蓋、被蓋、又は黒質への局所的な実質内送達）、眼内、眼窩内、結膜下、硝子体内、網膜下、及び強膜を介した経路が含まれる。（全身的アプローチと比較して）顕著に少量の成分は、全身的に投与された場合（例えば、静脈内）と比較して、局所的に投与された場合（例えば、実質内又は硝子体内）に効果を発揮し得る。局所投与様式はまた、治療有効量の成分が全身投与されるときに起こり得る潜在的に毒性の副作用の発生率を低減又は排除し得る。具体的な例では、インビボでの投与は、静脈内である。

【０６４５】

インビボでの投与は、例えば、非経口、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、局所、鼻腔内、又は筋肉内を含む任意の好適な経路によることができる。具体的な例は、静脈内注入である。ガイドＲＮＡ及び／又はＣａｓタンパク質（又はガイドＲＮＡ及び／又はＣａｓタンパク質をコードする核酸）を含む組成物は、１つ以上の生理学的及び薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤又は助剤を使用して処方することができる。製剤は、選択した投与経路に依存し得る。薬学的に許容されるとは、担体、希釈剤、賦形剤、又は補助剤が製剤の他の成分と適合性であり、そのレシピエントに実質的に有害ではないことを意味する。具体的な例では、投与経路及び／又は製剤、あるいは肝臓（例えば肝細胞）への送達のために選択される。

【０６４６】

投与頻度及び投薬回数は、いくつかの因子に依存し得る。細胞又は対象への核酸又はタンパク質の導入は、ある期間にわたって１回又は複数回実施することができる。例えば、導入は、ある期間にわたって一度だけ、ある期間にわたって少なくとも２回、ある期間にわたって少なくとも３回、ある期間にわたって少なくとも４回、ある期間にわたって少なくとも５回、ある期間にわたって少なくとも６回、ある期間にわたって少なくとも７回、ある期間にわたって少なくとも８回、ある期間にわたって少なくとも９回、ある期間にわたって少なくとも１０回、ある期間にわたって少なくとも１１回、ある期間にわたって少なくとも１２回、ある期間にわたって少なくとも１３回、ある期間にわたって少なくとも１４回、ある期間にわたって少なくとも１５回、ある期間にわたって少なくとも１６回、

ある期間にわたって少なくとも１７回、ある期間にわたって少なくとも１８回、ある期間にわたって少なくとも１９回、又はある期間にわたって少なくとも２０回、実施することができる。いくつかの方法では、Ｆ９核酸構築物の単回投与（又はＦ９核酸構築物及びヌクレアーゼ剤（例えば、Ｃａｓタンパク質及びガイドＲＮＡ）の単回投与）は、ＦＩＸの発現を望ましいレベルまで増加させるのに十分である。他の方法では、治療的効果を最大化するために２回以上の投与が有益であり得る。

【０６４７】

本明細書に開示される方法は、細胞又は対象におけるＦＩＸタンパク質レベル及び／又はＦＩＸ活性レベル（例えば、対象における循環、血清、又は血漿レベル）を増加させることができ、細胞又は対象におけるＦＩＸタンパク質レベル及び／又は活性レベル（例えば、対象における循環、血清、又は血漿レベル）を測定することを含むことができる。一例では、対象における治療の有効性は、血清又は血漿ＦＩＸ活性を測定することによって評価することができ、対象のＦＩＸの血漿レベル及び／又は活性の増加は、治療の有効性を示す。別の例では、治療の有効性は、ａＰＴＴアッセイにおける凝血機能及び／又はＴＧＡ－ＥＡアッセイにおけるトロンビン生成を評価することによって決定することができる。別の例では、治療の有効性は、凝固及び／又は免疫学的アッセイ（例えば、サンドイッチイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ、又はＭＳＤ）を介して第ＩＸ因子（例えば、循環ＦＩＸ）のレベル又は活性を評価することによって決定することができる。

【０６４８】

正常又は健康な個体では、ＦＩＸ活性及び抗原レベルは、成人血漿からのその精製に基づいて約３～５μｇ／ｍＬである正常なプール血漿の約５０％～１６０％で変動する。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ａｍｉｒａｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９８４）Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．３０（９）：１５１２－１５１６を参照されたい。具体的な例では、正常なＦＩＸ活性は、ＦＩＸ活性の正常なプール血漿レベルの約１００％であるとみなされるか、又はＦＩＸ活性の正常なプール血漿レベルの１００％であるとみなされる。具体的な例では、正常な血漿ＦＩＸレベルは、約５μｇ／ｍＬであるとみなされるか、又は５μｇ／ｍＬであるとみなされる。ＦＩＸ活性及び／又は抗原レベルの正常な血漿レベルの５０％未満を有する個体は、血友病を有すると分類される。特に、約１％未満の活性ＦＩＸを有する個体は、重度の血友病を有するとして分類され、一方、約１～５％の活性ＦＩＸを有する個体は、中程度の血友病を有する。軽度の血友病を有する個体は、正常レベルの約６～４９％の活性凝血因子を有する。いくつかの実施形態では、循環ＦＩＸのレベルは、周知の方法を使用する凝固及び／又は免疫学的アッセイによって測定することができる。

【０６４９】

いくつかの方法では、血友病を有する対象におけるＦＩＸの血漿レベル又はＦＩＸ活性レベルは、正常レベルの約若しくは少なくとも約２％、約若しくは少なくとも約３％、約若しくは少なくとも約４％、約若しくは少なくとも約５％、約若しくは少なくとも約６％、約若しくは少なくとも約７％、約若しくは少なくとも約８％、約若しくは少なくとも約９％、約若しくは少なくとも約１０％、約若しくは少なくとも約１１％、約若しくは少なくとも約１２％、約若しくは少なくとも約１３％、約若しくは少なくとも約１４％、約若しくは少なくとも約１５％、約若しくは少なくとも約１６％、約若しくは少なくとも約１７％、約若しくは少なくとも約１８％、約若しくは少なくとも約１９％、約若しくは少なくとも約２０％、約若しくは少なくとも約２１％、約若しくは少なくとも約２２％、約若しくは少なくとも約２３％、約若しくは少なくとも約２４％、約若しくは少なくとも約２５％、約若しくは少なくとも約２６％、約若しくは少なくとも約２７％、約若しくは少なくとも約２８％、約若しくは少なくとも約２９％、約若しくは少なくとも約３０％、約若しくは少なくとも約３１％、約若しくは少なくとも約３２％、約若しくは少なくとも約３３％、約若しくは少なくとも約３４％、約若しくは少なくとも約３５％、約若しくは少なくとも約３６％、約若しくは少なくとも約３７％、約若しくは少なくとも約３８％、約若しくは少なくとも約３９％、約若しくは少なくとも約４０％、約若しくは少なくとも約４

１％、約若しくは少なくとも約４２％、約若しくは少なくとも約４３％、約若しくは少なくとも約４４％、約若しくは少なくとも約４５％、約若しくは少なくとも約４６％、約若しくは少なくとも約４７％、約若しくは少なくとも約４８％、約若しくは少なくとも約４９％、約若しくは少なくとも約５０％、又はそれ以上まで増加する。

【０６５０】

いくつかの方法では、循環ＦＩＸタンパク質レベルは、約若しくは少なくとも約０．０５、約若しくは少なくとも約０．１、約若しくは少なくとも約０．２、約若しくは少なくとも約０．５、約若しくは少なくとも約１、約若しくは少なくとも約２、約若しくは少なくとも約３、又は約若しくは少なくとも約４μｇ／ｍＬまで増加する。ＦＩＸタンパク質レベルは、約１５０μｇ／ｍＬ、又はそれ以上に達し得る。いくつかの方法では、ＦＩＸタンパク質レベルは、少なくとも約４μｇ／ｍＬ、又は約４μｇ／ｍＬまで増加する。いくつかの方法では、ＦＩＸタンパク質レベルは、約４μｇ／ｍＬ～約５μｇ／ｍＬ、約４μｇ／ｍＬ～６μｇ／ｍＬ、約４μｇ／ｍＬ～８μｇ／ｍＬ、約４μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、又はそれ以上まで増加する。いくつかの方法では、ＦＩＸタンパク質レベルは、約０．１μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約１μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約０．１μｇ／ｍＬ～約６μｇ／ｍＬ、約１μｇ／ｍＬ～約６μｇ／ｍＬ、約２μｇ／ｍＬ～約５μｇ／ｍＬ、又は約３μｇ／ｍＬ～約５μｇ／ｍＬまで増加する。例えば、本明細書に開示される組成物及び方法は、血友病を有する対象における第ＩＸ因子の血漿レベルを、約６、約７、約８、約９、約１０、約１２、約１４、約１６、約１８、約２０、約２２、約２４、約２６、約２８、約３０、約３２、約３４、約３６、約３８、約４０、約４２、約４４、約４６、約４８、約５０、約５２、約５４、約５６、約５８、約６０、約６２、約６４、約６６、約６８、約７０、約７５、約８０、約８５、約９０、約９５、約１００、約１０５、約１１０、約１１５、約１２０、約１２５、約１３０、約１３５、約１４０、約１４５、約１５０μｇ／ｍＬ、又はそれ以上まで増加させるのに有用である。

【０６５１】

いくつかの方法では、対象（例えば、血友病を有する）における血漿ＦＩＸ活性及び／又はレベルは、投与前の対象のＦＩＸの血漿レベル及び／又は活性と比較して、約若しくは少なくとも約１％、約若しくは少なくとも約２％、約若しくは少なくとも約３％、約若しくは少なくとも約４％、約若しくは少なくとも約５％、約若しくは少なくとも約６％、約若しくは少なくとも約７％、約若しくは少なくとも約８％、約若しくは少なくとも約９％、約若しくは少なくとも約１０％、約若しくは少なくとも約１１％、約若しくは少なくとも約１２％、約若しくは少なくとも約１３％、約若しくは少なくとも約１４％、約若しくは少なくとも約１５％、約若しくは少なくとも約１６％、約若しくは少なくとも約１７％、約若しくは少なくとも約１８％、約若しくは少なくとも約１９％、約若しくは少なくとも約２０％、約若しくは少なくとも約２１％、約若しくは少なくとも約２２％、約若しくは少なくとも約２３％、約若しくは少なくとも約２４％、約若しくは少なくとも約２５％、約若しくは少なくとも約２６％、約若しくは少なくとも約２７％、約若しくは少なくとも約２８％、約若しくは少なくとも約２９％、約若しくは少なくとも約３０％、約若しくは少なくとも約３１％、約若しくは少なくとも約３２％、約若しくは少なくとも約３３％、約若しくは少なくとも約３４％、約若しくは少なくとも約３５％、約若しくは少なくとも約３６％、約若しくは少なくとも約３７％、約若しくは少なくとも約３８％、約若しくは少なくとも約３９％、約若しくは少なくとも約４０％、約若しくは少なくとも約４１％、約若しくは少なくとも約４２％、約若しくは少なくとも約４３％、約若しくは少なくとも約４４％、約若しくは少なくとも約４５％、約若しくは少なくとも約４６％、約若しくは少なくとも約４７％、約若しくは少なくとも約４８％、約若しくは少なくとも約４９％、約若しくは少なくとも約５０％、約若しくは少なくとも約５５％、約若しくは少なくとも約６０％、約若しくは少なくとも約６５％、約若しくは少なくとも約７０％、約若しくは少なくとも約７５％、約若しくは少なくとも約８０％、約若しくは少なくとも約８５％、約若しくは少なくとも約９０％、約若しくは少なくとも約９５％、約若しくは少なくとも約１００％、約若しくは少なくとも約１１０％、約若しくは少なくとも約１２０％、

約若しくは少なくとも約１３０％、約若しくは少なくとも約１４０％、約若しくは少なくとも約１５０％、約若しくは少なくとも約１６０％、約若しくは少なくとも約１７０％、約若しくは少なくとも約１８０％、約若しくは少なくとも約１９０％、約若しくは少なくとも約２００％、又はそれ以上増加する。

【０６５２】

いくつかの方法では、細胞又は細胞の集団（例えば、肝臓細胞又は肝細胞）におけるＦＩＸ活性及び／又はタンパク質レベルは、投与前のＦＩＸ活性及び／又はタンパク質レベル（例えば、正常レベル）と比較して、約若しくは少なくとも約１％、約若しくは少なくとも約２％、約若しくは少なくとも約３％、約若しくは少なくとも約４％、約若しくは少なくとも約５％、約若しくは少なくとも約６％、約若しくは少なくとも約７％、約若しくは少なくとも約８％、約若しくは少なくとも約９％、約若しくは少なくとも約１０％、約若しくは少なくとも約１１％、約若しくは少なくとも約１２％、約若しくは少なくとも約１３％、約若しくは少なくとも約１４％、約若しくは少なくとも約１５％、約若しくは少なくとも約１６％、約若しくは少なくとも約１７％、約若しくは少なくとも約１８％、約若しくは少なくとも約１９％、約若しくは少なくとも約２０％、約若しくは少なくとも約２１％、約若しくは少なくとも約２２％、約若しくは少なくとも約２３％、約若しくは少なくとも約２４％、約若しくは少なくとも約２５％、約若しくは少なくとも約２６％、約若しくは少なくとも約２７％、約若しくは少なくとも約２８％、約若しくは少なくとも約２９％、約若しくは少なくとも約３０％、約若しくは少なくとも約３１％、約若しくは少なくとも約３２％、約若しくは少なくとも約３３％、約若しくは少なくとも約３４％、約若しくは少なくとも約３５％、約若しくは少なくとも約３６％、約若しくは少なくとも約３７％、約若しくは少なくとも約３８％、約若しくは少なくとも約３９％、約若しくは少なくとも約４０％、約若しくは少なくとも約４１％、約若しくは少なくとも約４２％、約若しくは少なくとも約４３％、約若しくは少なくとも約４４％、約若しくは少なくとも約４５％、約若しくは少なくとも約４６％、約若しくは少なくとも約４７％、約若しくは少なくとも約４８％、約若しくは少なくとも約４９％、約若しくは少なくとも約５０％、約若しくは少なくとも約５５％、約若しくは少なくとも約６０％、約若しくは少なくとも約６５％、約若しくは少なくとも約７０％、約若しくは少なくとも約７５％、約若しくは少なくとも約８０％、約若しくは少なくとも約８５％、約若しくは少なくとも約９０％、約若しくは少なくとも約９５％、約若しくは少なくとも約１００％、約若しくは少なくとも約１１０％、約若しくは少なくとも約１２０％、約若しくは少なくとも約１３０％、約若しくは少なくとも約１４０％、約若しくは少なくとも約１５０％、約若しくは少なくとも約１６０％、約若しくは少なくとも約１７０％、約若しくは少なくとも約１８０％、約若しくは少なくとも約１９０％、約若しくは少なくとも約２００％、又はそれ以上増加する。

【０６５３】

いくつかの方法は、治療有効量のＦＩＸタンパク質を発現させること（例えば、個体において治療有効レベルの循環ＦＩＸ凝固活性を達成すること）を含む。いくつかの方法は、正常の少なくとも約５％～約５０％又は正常の少なくとも約５０％～約１５０％のＦＩＸ活性又は発現レベルを達成することを含む。いくつかの方法は、正常なＦＩＸ活性の少なくとも約１％～約５０％、又は正常なＦＩＸ活性の少なくとも約５％～約５０％、又は正常なＦＩＸ活性の少なくとも約５０％～約１５０％の、患者のベースラインＦＩＸ活性又は発現に対するＦＩＸ活性又は発現の増加を達成することを含む。いくつかの方法は、正常の約４０％～約１５０％（すなわち、正常の４０％～１５０％）のＦＩＸ活性又は発現レベルを達成することを含む。いくつかの方法は、正常の約４０％～約１００％（例えば、正常の４０％～１００％）のＦＩＸ活性又は発現レベルを達成することを含む。いくつかの方法は、正常の約４０％～約１５０％（すなわち、正常の４０％～１５０％）のＦＩＸ活性レベルを達成することを含む。いくつかの方法は、正常の約４０％～約１００％（例えば、正常の４０％～１００％）のＦＩＸ活性レベルを達成することを含む。いくつかの方法は、正常の約４０％～約１５０％（すなわち、正常の４０％～１５０％）のＦＩ

Ｘ発現レベルを達成することを含む。いくつかの方法は、正常の約４０％～約１００％（例えば、正常の４０％～１００％）のＦＩＸ発現レベルを達成することを含む。

【０６５４】

具体的な例では、対象におけるＦＩＸ活性レベルは、正常なＦＩＸ活性レベルの約１％～約３００％、約１％～約２５０％、約１％～約２００％、約１％～約１９０％、約１％～約１８０％、約１％～約１７０％、約１％～約１６０％、約１％～約１５０％、約１％～約１４０％、約１％～約１３０％、約１％～約１２０％、約１％～約１１０％、約１％～約１００％、約１％～約９０％、約１％～約８０％、約１％～約７０％、約１％～約６０％、約１％～約５０％、約５％～約３００％、約５％～約２５０％、約５％～約２００％、約５％～約１９０％、約５％～約１８０％、約５％～約１７０％、約５％～約１６０％、約５％～約１５０％、約５％～約１４０％、約５％～約１３０％、約５％～約１２０％、約５％～約１１０％、約５％～約１００％、約５％～約９０％、約５％～約８０％、約５％～約７０％、約５％～約６０％、約５％～約５０％、約１５％～約３００％、約１５％～約２５０％、約１５％～約２００％、約１５％～約１９０％、約１５％～約１８０％、約１５％～約１７０％、約１５％～約１６０％、約１５％～約１５０％、約１５％～約１４０％、約１５％～約１３０％、約１５％～約１２０％、約１５％～約１１０％、約１５％～約１００％、約１５％～約９０％、約１５％～約８０％、約１５％～約７０％、約１５％～約６０％、約１５％～約５０％、約１０％～約３００％、約１５％～約３００％、約２０％～約３００％、約２５％～約３００％、約３０％～約３００％、約３５％～約３００％、約４０％～約３００％、約４５％～約３００％、約５０％～約３００％、約５５％～約３００％、約６０％～約３００％、約６５％～約３００％、約７０％～約３００％、約７５％～約３００％、約８０％～約３００％、約８５％～約３００％、約９０％～約３００％、約９５％～約３００％、約１００％～約３００％、約１０％～約２００％、約１５％～約２００％、約２０％～約２００％、約２５％～約２００％、約３０％～約２００％、約３５％～約２００％、約４０％～約２００％、約４５％～約２００％、約５０％～約２００％、約５５％～約２００％、約６０％～約２００％、約６５％～約２００％、約７０％～約２００％、約７５％～約２００％、約８０％～約２００％、約８５％～約２００％、約９０％～約２００％、約９５％～約２００％、約１００％～約２００％、約１０％～約１５０％、約１５％～約１５０％、約２０％～約１５０％、約２５％～約１５０％、約３０％～約１５０％、約３５％～約１５０％、約４０％～約１５０％、約４５％～約１５０％、約５０％～約１５０％、約５５％～約１５０％、約６０％～約１５０％、約６５％～約１５０％、約７０％～約１５０％、約７５％～約１５０％、約８０％～約１５０％、約８５％～約１５０％、約９０％～約１５０％、約９５％～約１５０％、約１００％～約１５０％、約５０％～約３００％、約５０％～約２５０％、約５０％～約２００％、約５０％～約１９０％、約５０％～約１８０％、約５０％～約１７０％、約５０％～約１６０％、約５０％～約１５０％、約５０％～約１４０％、約５０％～約１３０％、約５０％～約１２０％、約５０％～約１１０％、約５０％～約１００％（例えば、正常なＦＩＸ活性レベルの約５０％～約１５０％）まで増加する。

【０６５５】

具体的な例では、対象におけるＦＩＸ活性レベルは、正常なＦＩＸ活性レベルの約５％～約２００％、約１０％～約１９０％、約２０％～約１８０％、約３０％～約１７０％、約４０％～約１６０％、約５０％～約１５０％、約６０％～約１４０％、約７０％～約１３０％、約８０％～約１２０％、又は約９０％～約１１０％まで（例えば、正常なＦＩＸ活性レベルの１００％まで又は約１００％まで）増加する。

【０６５６】

具体的な例では、対象における血漿ＦＩＸレベルは、正常な血漿ＦＩＸレベルの約１％～約３００％、約１％～約２５０％、約１％～約２００％、約１％～約１９０％、約１％～約１８０％、約１％～約１７０％、約１％～約１６０％、約１％～約１５０％、約１％～約１４０％、約１％～約１３０％、約１％～約１２０％、約１％～約１１０％、約１％～約１００％、約１％～約９０％、約１％～約８０％、約１％～約７０％、約１％～約６

０％、約１％～約５０％、約５％～約３００％、約５％～約２５０％、約５％～約２００％、約５％～約１９０％、約５％～約１８０％、約５％～約１７０％、約５％～約１６０％、約５％～約１５０％、約５％～約１４０％、約５％～約１３０％、約５％～約１２０％、約５％～約１１０％、約５％～約１００％、約５％～約９０％、約５％～約８０％、約５％～約７０％、約５％～約６０％、約５％～約５０％、約１５％～約３００％、約１５％～約２５０％、約１５％～約２００％、約１５％～約１９０％、約１５％～約１８０％、約１５％～約１７０％、約１５％～約１６０％、約１５％～約１５０％、約１５％～約１４０％、約１５％～約１３０％、約１５％～約１２０％、約１５％～約１１０％、約１５％～約１００％、約１５％～約９０％、約１５％～約８０％、約１５％～約７０％、約１５％～約６０％、約１５％～約５０％、約１０％～約３００％、約１５％～約３００％、約２０％～約３００％、約２５％～約３００％、約３０％～約３００％、約３５％～約３００％、約４０％～約３００％、約４５％～約３００％、約５０％～約３００％、約５５％～約３００％、約６０％～約３００％、約６５％～約３００％、約７０％～約３００％、約７５％～約３００％、約８０％～約３００％、約８５％～約３００％、約９０％～約３００％、約９５％～約３００％、約１００％～約３００％、約１０％～約２００％、約１５％～約２００％、約２０％～約２００％、約２５％～約２００％、約３０％～約２００％、約３５％～約２００％、約４０％～約２００％、約４５％～約２００％、約５０％～約２００％、約５５％～約２００％、約６０％～約２００％、約６５％～約２００％、約７０％～約２００％、約７５％～約２００％、約８０％～約２００％、約８５％～約２００％、約９０％～約２００％、約９５％～約２００％、約１００％～約２００％、約１０％～約１５０％、約１５％～約１５０％、約２０％～約１５０％、約２５％～約１５０％、約３０％～約１５０％、約３５％～約１５０％、約４０％～約１５０％、約４５％～約１５０％、約５０％～約１５０％、約５５％～約１５０％、約６０％～約１５０％、約６５％～約１５０％、約７０％～約１５０％、約７５％～約１５０％、約８０％～約１５０％、約８５％～約１５０％、約９０％～約１５０％、約９５％～約１５０％、約１００％～約１５０％、約５０％～約３００％、約５０％～約２５０％、約５０％～約２００％、約５０％～約１９０％、約５０％～約１８０％、約５０％～約１７０％、約５０％～約１６０％、約５０％～約１５０％、約５０％～約１４０％、約５０％～約１３０％、約５０％～約１２０％、約５０％～約１１０％、約５０％～約１００％（例えば、正常な血漿ＦＩＸレベルの約５０％～約１５０％）まで増加する。

【０６５７】

具体的な例では、対象における血漿ＦＩＸレベルは、正常な血漿ＦＩＸレベルの約５％～約２００％、約１０％～約１９０％、約２０％～約１８０％、約３０％～約１７０％、約４０％～約１６０％、約５０％～約１５０％、約６０％～約１４０％、約７０％～約１３０％、約８０％～約１２０％、又は約９０％～約１１０％まで（例えば、正常な血漿ＦＩＸレベルの１００％まで又は約１００％まで）増加する。

【０６５８】

具体的な例では、対象における血漿ＦＩＸレベルは、約０．２５μｇ／ｍＬ～約１５μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約１４μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約１３μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約１２μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約１１μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約９μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約８μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約７μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約６μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約５μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約４μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約３μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約２μｇ／ｍＬ、約０．２５μｇ／ｍＬ～約１μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約１５μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約１４μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約１３μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約１２μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約１１μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約９μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約８μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約７μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約６μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／

ｍＬ～約５μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約４μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約３μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約２μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約１μｇ／ｍＬ、約０．５μｇ／ｍＬ～約１５μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約１５μｇ／ｍＬ、約１μｇ／ｍＬ～約１５μｇ／ｍＬ、約２μｇ／ｍＬ～約１５μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約１５μｇ／ｍＬ、約４μｇ／ｍＬ～約１５μｇ／ｍＬ、約５μｇ／ｍＬ～約１５μｇ／ｍＬ、約０．５μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約１μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約２μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約４μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約５μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約０．５μｇ／ｍＬ～約７．５μｇ／ｍＬ、約０．７５μｇ／ｍＬ～約７．５μｇ／ｍＬ、約１μｇ／ｍＬ～約７．５μｇ／ｍＬ、約２μｇ／ｍＬ～約７．５μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ～約７．５μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約７．５μｇ／ｍＬ、約４μｇ／ｍＬ～約７．５μｇ／ｍＬ、約５μｇ／ｍＬ～約７．５μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ～約１５μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ～約１４μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ～約１３μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ～約１２μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ～約１１μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ～約９μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ～約８μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ～約７μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ～約６μｇ／ｍＬ、約２．５μｇ／ｍＬ～約５μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約１５μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約１４μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約１３μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約１２μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約１１μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約９μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約８μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約７μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約６μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約５μｇ／ｍＬ（例えば、約２．５μｇ／ｍＬ～約７．５μｇ／ｍＬ又は約３μｇ／ｍＬ～約５μｇ／ｍＬ）まで増加する。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも１ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも２ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも３ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも４ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも５ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも６ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも９ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも１２ヶ月後である。

【０６５９】

具体的な例では、対象における血漿ＦＩＸレベルは、約０．５μｇ／ｍＬ～約１０μｇ／ｍＬ、約１μｇ／ｍＬ～約９μｇ／ｍＬ、約２μｇ／ｍＬ～約８μｇ／ｍＬ、約３μｇ／ｍＬ～約７μｇ／ｍＬ、又は約４μｇ／ｍＬ～約６μｇ／ｍＬまで（例えば、約５μｇ／ｍＬまで）増加する。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも１ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも２ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも３ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも４ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも５ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも６ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも９ヶ月後である。いくつかの実施形態では、列挙された発現レベルは、投与の少なくとも１２ヶ月後である。

【０６６０】

具体的な例では、対象におけるＦＩＸ活性レベルは、正常なＦＩＸ活性レベルの少なくとも約１５％まで増加する。具体的な例では、対象における血漿ＦＩＸレベルは、正常な血漿ＦＩＸレベルの少なくとも約１５％まで増加する。具体的な例では、対象における血漿ＦＩＸレベルは、少なくとも約０．７５μｇ／ｍＬまで増加する。例えば、方法は、血

友病Ｂを有する対象における自然出血を予防又は阻害する方法であり得、対象におけるＦＩＸ活性レベルは、正常なＦＩＸ活性レベルの少なくとも約１５％まで増加するか、又は対象における血漿ＦＩＸレベルは、正常な血漿ＦＩＸレベルの少なくとも約１５％まで増加するか、又は対象における血漿ＦＩＸレベルは、少なくとも約０．７５μｇ／ｍＬまで増加する。

【０６６１】

具体的な例では、対象におけるＦＩＸ活性レベルは、正常なＦＩＸ活性レベルの約３００％以下、約２５０％以下、約２００％以下、又は約１５０％以下まで増加する。具体的な例では、対象における血漿ＦＩＸレベルは、正常な血漿ＦＩＸレベルの約３００％以下、約２５０％以下、約２００％以下、又は約１５０％以下まで増加する。

【０６６２】

具体的な例では、対象は、重度の血友病を有し、対象におけるＦＩＸ活性レベルは、正常なＦＩＸ活性レベルの少なくとも約１％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％まで増加する。

【０６６３】

具体的な例では、対象は、重度の血友病を有し、対象における血漿ＦＩＸレベルは、正常な血漿ＦＩＸレベルの少なくとも約１％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％まで増加する。

【０６６４】

具体的な例では、対象は、重度の血友病を有し、対象におけるＦＩＸ活性レベルは、正常なＦＩＸ活性レベルの約１％超、約５％超、約１０％超、約１５％超、約２０％超、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、約５０％超、約５５％超、約６０％超、約６５％超、約７０％超、約７５％超、約８０％超、約８５％超、約９０％超、又は約１００％超まで増加する。

【０６６５】

具体的な例では、対象は、重度の血友病を有し、対象における血漿ＦＩＸレベルは、正常な血漿ＦＩＸレベルの約１％超、約５％超、約１０％超、約１５％超、約２０％超、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、約５０％超、約５５％超、約６０％超、約６５％超、約７０％超、約７５％超、約８０％超、約８５％超、約９０％超、又は約１００％超まで増加する。

【０６６６】

具体的な例では、対象は、中程度の血友病を有し、対象におけるＦＩＸ活性レベルは、正常なＦＩＸ活性レベルの少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％まで増加する。

【０６６７】

具体的な例では、対象は、中程度の血友病を有し、対象における血漿ＦＩＸレベルは、正常な血漿ＦＩＸレベルの少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％

、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％まで増加する。

【０６６８】

具体的な例では、対象は、中程度の血友病を有し、対象におけるＦＩＸ活性レベルは、正常なＦＩＸ活性レベルの約５％超、約１０％超、約１５％超、約２０％超、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、約５０％超、約５５％超、約６０％超、約６５％超、約７０％超、約７５％超、約８０％超、約８５％超、約９０％超、又は約１００％超まで増加する。

【０６６９】

具体的な例では、対象は、中程度の血友病を有し、対象における血漿ＦＩＸレベルは、正常な血漿ＦＩＸレベルの約５％超、約１０％超、約１５％超、約２０％超、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、約５０％超、約５５％超、約６０％超、約６５％超、約７０％超、約７５％超、約８０％超、約８５％超、約９０％超、又は約１００％超まで増加する。

【０６７０】

具体的な例では、対象は、軽度の血友病を有し、対象におけるＦＩＸ活性レベルは、正常なＦＩＸ活性レベルの少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％まで増加する。

【０６７１】

具体的な例では、対象は、軽度の血友病を有し、対象における血漿ＦＩＸレベルは、正常な血漿ＦＩＸレベルの少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、又は少なくとも約１００％まで増加する。

【０６７２】

具体的な例では、対象は、軽度の血友病を有し、対象におけるＦＩＸ活性レベルは、正常なＦＩＸ活性レベルの約５％超、約１０％超、約１５％超、約２０％超、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、約５０％超、約５５％超、約６０％超、約６５％超、約７０％超、約７５％超、約８０％超、約８５％超、約９０％超、又は約１００％超まで増加する。

【０６７３】

具体的な例では、対象は、軽度の血友病を有し、対象における血漿ＦＩＸレベルは、正常な血漿ＦＩＸレベルの約５％超、約１０％超、約１５％超、約２０％超、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、約５０％超、約５５％超、約６０％超、約６５％超、約７０％超、約７５％超、約８０％超、約８５％超、約９０％超、又は約１００％超まで増加する。

【０６７４】

いくつかの方法は、少なくとも１ヶ月、少なくとも２ヶ月、少なくとも６ヶ月、少なくとも１年、又は少なくとも２年の効果などの耐久性効果を達成することを含む。いくつかの方法は、少なくとも１ヶ月、少なくとも２ヶ月、少なくとも６ヶ月、少なくとも１年、又は少なくとも２年の効果などの耐久性かつ持続性な様式で治療的効果を達成することを含む。いくつかの方法では、増加した循環ＦＩＸ活性及び／又は発現レベルは、少なくとも１ヶ月間、少なくとも２ヶ月間、少なくとも６ヶ月間、少なくとも１年間、又はそれ以上安定である。いくつかの方法では、ＦＩＸタンパク質の定常状態の活性及び／又はレベ

ルは、少なくとも７日間、少なくとも１４日間、又は少なくとも２８日間で達成される。追加の方法では、方法は、少なくとも１ヶ月間、少なくとも２ヶ月間、少なくとも４ヶ月間、若しくは少なくとも６ヶ月間、又は少なくとも１年間、少なくとも２年間、少なくとも３年間、少なくとも４年間、若しくは少なくとも５年間、単回用量後のＦＩＸ活性及び／又はレベルを維持することを含む。いくつかの方法は、ヒトにおいて、少なくとも少なくとも８週間、少なくとも２４週間、例えば、少なくとも１年（５２週間）、又は任意選択的に、少なくとも２年の効果、及びいくつかの実施形態では、少なくとも３年、少なくとも４年、又は少なくとも５年の効果などの耐久性かつ持続性な効果を達成することを含む。いくつかの方法は、ヒトにおいて、少なくとも８週間、少なくとも２４週間、例えば、少なくとも１年、又は任意選択的に、少なくとも２年の効果、及びいくつかの実施形態では、少なくとも３年、少なくとも４年、又は少なくとも５年の効果などの耐久性かつ持続性な様式で治療的効果を達成することを含む。いくつかの方法では、ヒトにおける増加したＦＩＸ活性及び／又は発現レベルは、少なくとも少なくとも８週間、少なくとも２４週間、例えば、少なくとも１年、任意選択的に少なくとも２年、及びいくつかの実施形態では、少なくとも３年、少なくとも４年、又は少なくとも５年間安定である。いくつかの方法では、ヒトにおけるＦＩＸの定常状態の活性及び／又はレベルは、少なくとも７日間、少なくとも１４日間、又は少なくとも２８日間、任意選択的に少なくとも５６日間、少なくとも８０日間、又は少なくとも９６日間で達成される。追加の方法では、方法は、少なくとも８週間、少なくとも１６週間、若しくは少なくとも２４週間、又はいくつかの実施形態では、少なくとも１年間、若しくは少なくとも２年間、任意選択的に少なくとも３年間、少なくとも４年間、若しくは少なくとも５年間、ヒトにおける単回用量後のＦＩＸ活性及び／又はレベルを維持することを含む。例えば、ＦＩＸの発現は、ヒト対象において、治療後少なくとも約８週間、少なくとも約１２週間、少なくとも約２４週間、ある特定の実施形態では、少なくとも約１年間、又は少なくとも約２年間、及びいくつかの実施形態では、治療後少なくとも３年間、少なくとも４年間、又は少なくとも５年間持続され得る。同様に、ＦＩＸの活性は、ヒト対象において、治療後少なくとも約８週間、少なくとも約１２週間、少なくとも約２４週間、ある特定の実施形態では、治療後少なくとも約１年間、又は少なくとも約２年間、及びいくつかの実施形態では、治療後少なくとも３年間、少なくとも４年間、又は少なくとも５年間持続され得る。いくつかの方法では、ＦＩＸの発現又は活性は、治療前のＦＩＸの発現又は活性（すなわち、対象のベースライン）よりも高いレベルで維持される。いくつかの方法では、ＦＩＸの発現又は活性は、治療有効レベルの発現又は活性で維持される場合、持続しているとみなされる。他の生物における相対的持続期間は、例えば、寿命及び発育段階に基づいて理解され、上記の開示内に包含される。いくつかの方法では、ＦＩＸの発現又は活性は、投与の６ヶ月後、投与の１年後、又は投与の２年後のヒトにおける発現又は活性、発現又は活性がその対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％である場合、「持続している」とみなされる。ある特定の実施形態では、投与の６ヶ月後、例えば、２４週間～２８週間で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、又は８０％である。ある特定の実施形態では、投与の１年後、すなわち、約１２ヶ月、例えば、１１～１３ヶ月で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、又は８０％である。ある特定の実施形態では、投与の２年後、すなわち、約２４ヶ月、例えば、２３～２５ヶ月で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、又は８０％である。ある特定の実施形態では、投与の６ヶ月後で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％、好ましくは少なくとも６０％である。ある特定の実施形態では、投与の１年後で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％、好ましくは少なくとも６０％である。ある特定の実施形

態では、投与の２年後で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％、好ましくは少なくとも６０％である。好ましい実施形態では、対象は、例えば、毎週、毎月、特に、投与後早期に、例えば、最初の６ヶ月以内に、ＦＩＸの発現又は活性レベルの日常的なモニタリングを有する。定期的な測定は、発現又は活性に対する効果が、例えば、投与の６ヶ月後、投与の１年後、又は投与の２年後に持続されることを確立し得る。新生児対象におけるいくつかの方法では、ＦＩＸの発現は、新生児対象が成人になるときに持続される。いくつかの方法では、ＦＩＸの発現は、対象又は新生児対象の生涯にわたって持続する。

【０６７５】

いくつかの方法では、ＦＩＸの発現又は活性は、投与することの２４週間後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでのＦＩＸの発現又は活性の少なくとも５０％である。いくつかの方法では、ＦＩＸの発現又は活性は、投与することの１年後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでのＦＩＸの発現又は活性の少なくとも５０％である。いくつかの方法では、ＦＩＸの発現又は活性は、投与することの２４週間後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでのＦＩＸの発現又は活性の少なくとも６０％である。いくつかの方法では、ＦＩＸの発現又は活性は、投与することの２年後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでのＦＩＸの発現又は活性の少なくとも５０％である。いくつかの方法では、ＦＩＸの発現又は活性は、投与することの２年後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでのＦＩＸの発現又は活性の少なくとも６０％である。いくつかの方法では、ＦＩＸの発現又は活性は、投与することの２４週間後でヒト対象について測定された発現のピークレベルでのＦＩＸの発現又は活性の少なくとも６０％である。

【０６７６】

ＡＬＢ遺伝子座への挿入を伴ういくつかの方法では、対象の循環アルブミンレベル又は細胞のアルブミンレベルは正常である。そのような方法は、対象の循環アルブミンレベル又は細胞のアルブミンレベルを、正常な循環アルブミンレベル又は正常なアルブミンレベルの±５％、±１０％、±１５％、±２０％、又は±５０％以内に維持することを含み得る。いくつかの方法では、対象のアルブミンレベル又は細胞のアルブミンレベルは、少なくとも４週目、少なくとも８週目、少なくとも１２週目、又は少なくとも２０週目まで、未治療の個体のアルブミンレベルと比較して変化しない。いくつかの方法では、対象のアルブミンレベル又は細胞のアルブミンレベルは、一過性に低下し、次いで正常レベルに戻る。特に、方法は、血漿アルブミンのレベルの顕著な変化を検出しないことを含み得る。

【０６７７】

いくつかの方法では、本明細書に開示されるＦＩＸを発現させるための組成物のうちのいずれかを、血友病Ｂ又はＦＩＸ欠乏症を治療するのに好適な追加の療法と一緒に含む組み合わせ療法が使用される。一例として、本明細書に記載される方法は、他の止血剤、血液因子、及び薬物の使用と組み合わせることができる。例えば、対象は、第ＸＩ因子、第ＸＩＩ因子、プレカリクレイン、高分子量キニノーゲン（high molecular weight kininogen、ＨＭＷＫ）、第Ｖ因子、第ＶＩＩ因子、第ＶＩＩＩ因子、第Ｘ因子、第ＸＩＩＩ因子、第ＩＩ因子、第ＶＩＩａ因子、及びフォンヴィレブランド因子からなる群から選択される１つ以上の因子の治療有効量を投与され得る。追加的又は代替的に、治療は、凝固促進、例えば、第Ｘａ因子、第ＩＸａ因子、第ＸＩａ因子、第ＸＩＩａ因子、及び第ＶＩＩＩａ因子、プレカリクレイン、並びに高分子量キニノーゲンを含む内因的凝固経路の活性化因子；又は組織因子、第ＶＩＩａ因子、第Ｖａ因子、及び第Ｘａ因子を含む外因的凝固経路の活性化因子を投与することを更に含み得る。

【０６７８】

いくつかの方法では、方法は、本明細書に記載のＦ９核酸構築物のうちのいずれかを投与する前に、対象における既存の抗ＡＡＶ（例えば、抗ＡＡＶ８）免疫力を評価することを更に含む。例えば、そのような方法は、全抗体（ＴＡｂ）免疫アッセイ又は中和抗体（ＮＡｂ）アッセイを使用して免疫原性を評価することを含み得る。例えば、Ｍａｎｎｏ

ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１２（３）：３４２－３４７、Ｋｒｕｚｉｋ ｅｔ ａｌ．（２０１９）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．１４：１２６－１３３、及びＷｅｂｅｒ（２０２１）Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２：６５８３９９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＡｂアッセイは、ＡＡＶベクターに結合する抗体を探すのに対して、ＮＡｂアッセイは、存在する抗体が、ＡＡＶベクターが標的細胞に形質導入するのを止めるかどうかを評価する。ＴＡｂアッセイでは、薬物製品又は空のキャプシドを使用して抗体を捕捉することができ、ＮＡｂアッセイは、レポーターベクター（例えば、ルシフェラーゼをコードするＡＡＶベクターのバージョン）を必要とし得る。

【０６７９】

上記又は下記で引用されている全ての特許出願、ウェブサイト、他の刊行物、アクセッション番号などは、各個々の項目が、参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されたのと同じ程度に、全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。配列の異なるバージョンが違う時間にアクセッション番号に関連付けられている場合、本出願の有効な出願日においてアクセッション番号に関連付けられるバージョンを意味する。有効な出願日とは、該当する場合、アクセッション番号に関する実際の出願日以前又は優先出願の出願日を意味する。同様に、刊行物、ウェブサイトなどの異なるバージョンが違う時間に公開されている場合、別段の指定のない限り、本出願の有効な出願日の直近に公開されたバージョンを意味する。別段に他の指示がない限り、本発明の任意の特徴、ステップ、要素、実施形態、又は態様を、任意の他のものと組み合わせて使用することができる。本発明は、明瞭さ及び理解の目的に対し図表及び例を介していくつかの詳細が記載されているが、添付の特許請求の範囲の範囲内で、ある特定の変化及び修正を実施することができることが明らかになろう。

【０６８０】

配列の簡単な説明

添付の配列表にリストされているヌクレオチド及びアミノ酸配列は、ヌクレオチド塩基のための標準的な文字略語、及びアミノ酸のための三文字表記を使用して示されている。ヌクレオチド配列は、配列の５’末端から始まって先へ（すなわち、各行で左から右へ）進み３’末端に至る標準規則に従っている。各ヌクレオチド配列の１本の鎖のみが示されているが、相補的鎖は、示されている鎖を任意に参照することによって含まれると理解される。アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が提供される場合、同じアミノ酸配列をコードするそのコドン縮重バリアントもまた提供されることが理解される。アミノ酸配列は、配列のアミノ末端から始まって先へ（すなわち、各行で左から右へ）進みカルボキシ末端に至る標準規則に従っている。

【０６８１】

【表９－１】

表９．配列の説明。

配列番号	タイプ	説明
1	タンパク質	ヒト第IX因子タンパク質 NCBIアクセッション番号NP__000124．1
2	DNA	ヒトF9 mRNA（cDNA） NCBIアクセッション番号NM__000133．4
3	DNA	ヒトF9 CDS CCDS ID CCDS14666．1
4	DNA	ヒトALBイントロン1
5	DNA	ガイドRNA標的配列及びPAM v1
6	DNA	ガイドRNA標的配列及びPAM v2
7	DNA	ガイドRNA標的配列及びPAM v3
8	タンパク質	SpCas9タンパク質V1
9	DNA	SpCas9 DNA V1
10	DNA	SpCas9 mRNA（cDNA）
11	タンパク質	SpCas9タンパク質V2
12	RNA	SpCas9 mRNA V2
13	タンパク質	SV40 NLS v1
14	タンパク質	SV40 NLS v2
15	タンパク質	ヌクレオプラスミンNLS
16	RNA	crRNAテールv1
17	RNA	crRNAテールv2
18	RNA	TracrRNA v1
19	RNA	TracrRNA v2
20	RNA	TracrRNA v3
21	RNA	gRNA足場v1
22	RNA	gRNA足場v2
23	RNA	gRNA足場v3
24	RNA	gRNA足場v4
25	RNA	gRNA足場v5
26	RNA	gRNA足場v6
27	RNA	gRNA足場v7
28	RNA	gRNA足場v8
29	RNA	修飾gRNA足場
30～61	RNA	ヒトALBイントロン1ガイド配列
62～125	RNA	ヒトALBイントロン1ガイド配列
126～157	DNA	ヒトALBイントロン1ガイドRNA標的配列
158	DNA	天然F9インサート
159	DNA	天然CpG除去スプライスなしF9インサート
160	DNA	天然CpG除去F9インサート
161	DNA	天然スプライス除去F9インサート
162	DNA	コドン最適化されたF9インサート
163	DNA	COMP F9インサート
164	DNA	DC F9インサート
165	DNA	GA F9インサート
166	DNA	CpG0 F9インサート
167	DNA	CpG3 F9インサート
168	DNA	CpG10 CpGなしF9インサート
169	DNA	CpG10 F9インサート
170	DNA	CpG20 CpGなしF9インサート
171	DNA	CpG20 F9インサート
172	DNA	インサート72
173	DNA	インサート18
174	DNA	インサート19
175	DNA	インサート20
176	DNA	インサート21
177	DNA	インサート27
178	DNA	インサート28
179	DNA	インサート29
180	DNA	インサート30
181	DNA	インサート36
182	DNA	インサート37

【表９－２】

（表９の続き）

配列番号	タイプ	説明
183	DNA	インサート38
184	DNA	インサート39
185	DNA	インサート22
186	DNA	インサート23
187	DNA	インサート24
188	DNA	インサート25
189	DNA	インサート26
190	DNA	インサート31
191	DNA	インサート32
192	DNA	インサート33
193	DNA	インサート34
194	DNA	インサート35
195	タンパク質	F9インサートによってコードされるFIX
196	DNA	ITR 145
197	DNA	ITR 141
198	DNA	ITR 130
199	DNA	SV40ポリA
200	DNA	CpGが枯渇しているbGHポリA
201	DNA	マウスAlbエキソン2スプライスアクセプター
202	DNA	インサート72 ITRなし
203	DNA	インサート18 ITRなし
204	DNA	インサート19 ITRなし
205	DNA	インサート20 ITRなし
206	DNA	インサート21 ITRなし
207	DNA	インサート27 ITRなし
208	DNA	インサート28 ITRなし
209	DNA	インサート29 ITRなし
210	DNA	インサート30 ITRなし
211	DNA	インサート36 ITRなし
212	DNA	インサート37 ITRなし
213	DNA	インサート38 ITRなし
214	DNA	インサート39 ITRなし
215	DNA	インサート22 ITRなし
216	DNA	インサート23 ITRなし
217	DNA	インサート24 ITRなし
218	DNA	インサート25 ITRなし
219	DNA	インサート26 ITRなし
220	DNA	インサート31 ITRなし
221	DNA	インサート32 ITRなし
222	DNA	インサート33 ITRなし
223	DNA	インサート34 ITRなし
224	DNA	インサート35 ITRなし
225	RNA	Cas9 mRNA
226	RNA	Cas9 mRNA CDS
227	DNA	Cas9 CDS
228	RNA	マウスAlbイントロン1ガイド配列g666
229	DNA	マウスAlbイントロン1ガイドRNA標的配列g666
230～231	RNA	マウスAlbイントロン1 sgRNA配列g666

【実施例】

【０６８２】

実施例１．単一のガイドＲＮＡ及びＤＮＡ鋳型選択

血友病Ｂは、第９因子Ｆ９遺伝子及び第ＩＸ因子（ＦＩＸ）タンパク質の欠損又は欠陥によって引き起こされる遺伝性障害であり、出血障害をもたらす。血友病Ｂ患者は、凝血する能力の低減を示す。血漿中のＦＩＸタンパク質を回復させるために、アルブミン（ＡＬＢ）遺伝子座における標的化導入遺伝子挿入を使用する血友病Ｂを治療するためのアプローチが本明細書に記載される。このアプローチは、組換えアデノ随伴ウイルス血清型８（ｒＡＡＶ８）に含有される双方向性Ｆ９　ＤＮＡ遺伝子挿入鋳型と会合した、脂質ナノ

粒子（ＬＮＰ）送達系に含有されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９遺伝子編集技術に基づく。代替アプローチは、組換えアデノ随伴ウイルス血清型８（ｒＡＡＶ８）に含有される一方向性Ｆ９　ＤＮＡ遺伝子挿入鋳型と会合した、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）送達系に含有されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９遺伝子編集技術に基づく。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９成分は、肝細胞におけるＡＬＢ遺伝子遺伝子座において二本鎖ＤＮＡを標的とし、切断するように設計されており、ＡＡＶベクターによって送達されるＦ９　ＤＮＡ鋳型がセーフハーバー遺伝子座においてゲノムに挿入されることを可能にした。図２を参照されたい。導入遺伝子の挿入は、血友病Ｂ患者における欠損又は欠陥ゲノムＦ９をコードする機能的Ｆ９遺伝子を提供する。本明細書に記載の遺伝子挿入プラットフォームは、単一の１回用量の後、患者の生涯にわたって、血漿中のＦＩＸの正常レベルを回復することができる。本明細書に記載の遺伝子挿入プラットフォームは、ＡＡＶエピソーム遺伝子療法の既存の制限のいくつかを克服し得る。

【０６８３】

ＡＡＶベクターは、インビボでの治療用導入遺伝子の細胞への強力な送達ビヒクルである。特に、ＡＡＶ血清型８（ＡＡＶ８）を含むいくつかのＡＡＶ血清型は、マウス、非ヒト霊長類、及びヒト患者に全身的に注射された場合、肝臓肝細胞を標的とすることができる。したがって、肝臓で発現される遺伝子の欠乏によって引き起こされる障害は、ＡＡＶベースの遺伝子療法のための潜在的な候補である。１つのそのような疾患は血友病Ｂであり、これは、Ｆ９遺伝子によってコードされるＦＩＸタンパク質における欠乏症又は変異によって引き起こされる。

【０６８４】

Ｆ９遺伝子は、肝細胞において排他的に発現され、肝臓によるＦＩＸタンパク質の合成をもたらす。したがって、プロモーターを含まないＦ９コードＤＮＡが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９誘導性二本鎖切断（double strand break、ＤＳＢ）の形成後に特定のセーフハーバー部位で宿主細胞ＤＮＡに永続的に組み込まれる、標的化遺伝子挿入プラットフォームを作製した。

【０６８５】

Ｆ９　ＤＮＡ鋳型は、ｒＡＡＶ８ベクターによって細胞内にもたらされ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ＲＮＡ成分（Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡ）は、ＬＮＰ媒介送達によって肝細胞に送達される（図３）。ｒＡＡＶ送達Ｆ９　ＤＮＡカセットはプロモーターを含まず、代わりに挿入遺伝子座の転写を利用して、ＦＩＸタンパク質をコードする治療用導入遺伝子の発現を駆動する。

【０６８６】

ＡＡＶ８血清型は、複数のモデル系において肝臓を標的とするその能力、その好ましい製造プロファイル、及び血友病分野における複数の試験を含むヒト臨床試験における肝臓指向性ベクターとしてのその使用に起因して、挿入プラットフォームのための血清型として選択された。

【０６８７】

ＡＬＢ遺伝子座は、肝細胞においてロバストな発現を有する肝臓セーフハーバー部位である。加えて、エキソン１にシグナルペプチドが存在し、これは下流に挿入された導入遺伝子の分泌を媒介するために選ばれ得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９成分を指示する単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を設計して、ＡＬＢ遺伝子のイントロン１内に切断を作製した。挿入されたＦ９遺伝子は、発現のためにＡＬＢプロモーター及び開始コドンに依存し、分泌のためにＡＬＢシグナルペプチドに依存する。

【０６８８】

ｒＡＡＶ８送達ＤＮＡ挿入鋳型は、ＡＬＢ　ｓｇＲＮＡ標的部位に隣接するヌクレオチドに対していかなるホモロジーも有せず、ホモロジー非依存性機構を介して挿入される。したがって、挿入カセットを双方向性であるように設計し、いずれかの挿入の向きがＦＩＸタンパク発現を支持することができるように、センスの向き及びアンチセンスの向きの両方で野生型ＦＩＸタンパクのコピーをコードする。しかしながら、一方向性挿入カセッ

トを使用することもできる。スプライスアクセプター部位は各Ｆ９導入遺伝子の上流にコードされ、ポリアデニル化配列はＦ９の各コピーの下流にコードされる（図２）。したがって、ＡＬＢエキソン１スプライスドナーは、Ｆ９　ＤＮＡ鋳型にコードされるスプライスアクセプターと連結される。

【０６８９】

要約すると、ＬＮＰによって送達される高度に正確かつ標的化されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９技術と、選択されたｒＡＡＶ８ベクターによって送達されるＦ９　ＤＮＡ鋳型との組み合わせは、肝細胞からの野生型ＦＩＸタンパク質の長期発現を可能にし、血友病Ｂ患者に生涯にわたる有効な治療を潜在的に提供する。加えて、ＦＩＸ発現は、ｇＲＮＡの効率、ＡＡＶ鋳型の用量、及びＬＮＰの用量によって調整することができる。

【０６９０】

単一のガイドＲＮＡの設計及び選択

ＡＬＢ遺伝子座をＦ９　ＤＮＡ鋳型のための挿入部位として選択したのは、それが肝細胞において最も高度に発現される遺伝子座であり、アルブミンの分泌を媒介するシグナルペプチドがエキソン１に見出され、挿入された導入遺伝子の分泌を促進するために利用することができるからである。ヒトＡＬＢ遺伝子座を、特定のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）部位の存在について評価して、Ｃａｓ９誘導性ＤＮＡ切断が起こり得る遺伝子座の第１のイントロン中の標的部位のリストを生成した。部位を一塩基多型（single nucleotide polymorphism、ＳＮＰ）分析に対して相互参照して、選択された部位が、ｇＲＮＡ効率に影響を与え得る共通のＳＮＰを有しないことを確実にした。次いで、ｓｇＲＮＡのリストを生成した。表１０を参照されたい。候補ｓｇＲＮＡを合成し、インビトロ及びインビボでの評価のためにＣａｓ９　ｍＲＮＡとともにＬＮＰに製剤化した。

【０６９１】

【表１０】

表１０．ヒトＡＬＢイントロン１ガイドＲＮＡ。

ガイドRNA	配列番号（DNA標的化セグメント）	配列番号（修飾されていないsgRNA）	配列番号（修飾sgRNA）	配列番号（ガイドRNA標的配列）
G009844	30	62	94	126
G009851	31	63	95	127
G009852	32	64	96	128
G009857	33	65	97	129
G009858	34	66	98	130
G009859	35	67	99	131
G009860	36	68	100	132
G009861	37	69	101	133
G009866	38	70	102	134
G009867	39	71	103	135
G009868	40	72	104	136
G009874	41	73	105	137
G012747	42	74	106	138
G012748	43	75	107	139
G012749	44	76	108	140
G012750	45	77	109	141
G012751	46	78	110	142
G012752	47	79	111	143
G012753	48	80	112	144
G012754	49	81	113	145
G012755	50	82	114	146
G012756	51	83	115	147
G012757	52	84	116	148
G012758	53	85	117	149
G012759	54	86	118	150
G012760	55	87	119	151
G012761	56	88	120	152
G012762	57	89	121	153
G012763	58	90	122	154
G012764	59	91	123	155
G012765	60	92	124	156
G012766	61	93	125	157

【０６９２】

レポーターとして双方向性ｎａｎｏｌｕｃコードＡＡＶ挿入鋳型を使用して、初代ヒト肝細胞（primary human hepatocyte、ＰＨＨ）においてＬＮＰを最初にスクリーニングした。ＰＨＨ培養物の上清中に分泌されたｎａｎｏｌｕｃタンパク質を測定することによって、ｎａｎｏｌｕｃの標的化挿入を支持したＬＮＰを同定した。

【０６９３】

次いで、最初のＰＨＨスクリーニングに合格した候補を、ヒト化ＡＬＢ遺伝子座及びＦ９遺伝子欠乏症の両方を有する遺伝子操作マウスにおいて、インビボで遺伝子挿入を支持するそれらの能力について試験した。インビボでの研究からの上位候補を、オフターゲット切断について機能的に評価した。

【０６９４】

ＡＬＢ標的化ｓｇＲＮＡ　９８６０を用いて製剤化されるＬＮＰＦ９を、複数のプラットフォーム（初代ヒト及び非ヒト霊長類肝細胞、ＡＬＢヒト化マウス、及び非ヒト霊長類）にわたるロバストなｈＦＩＸ発現レベルの支持、確認されたオフターゲット部位の欠如、種間の翻訳、標的部位における共通ヒトＳＮＰの欠如、群内のｈＦＩＸ発現の低い変動性、及び用量範囲にわたる性能に基づいて開発候補として選択した（図３）。ｓｇＲＮＡ

９８６０の標的部位は、カニクイザルサルにおいて保存されている。ＬＮＰＦ９は、ヒトゲノムにおいて検出可能なオフターゲット部位を有せず（編集の飽和レベルで初代ヒト肝細胞のうちの２つのロットにおいて実施した標的化アンプリコン配列決定（ｒｈＡＭＰ－Ｓｅｑ）は、ＡＬＢにおけるオンターゲット以外の任意の遺伝子座を検証することができなかった）、初代ヒト及び非ヒト霊長類肝細胞、ＡＬＢヒト化マウス、並びに非ヒト霊長類における挿入を介するＦＩＸ発現を支持した。

【０６９５】

ＬＮＰＦ９の説明及び製造

ＬＮＰＦ９は、約１００ヌクレオチド長のｓｇＲＮＡと、４つの異なる脂質から構成されるＬＮＰにカプセル化されたＣａｓ９コードｍＲＮＡとを含む脂質ナノ粒子である。ＬＮＰの組成物を表１１に要約する。ＬＮＰＦ９は、以下のモル比：５０ｍｏｌ％の脂質Ａ、９ｍｏｌ％のＤＳＰＣ、３８ｍｏｌ％のコレステロール、及び３ｍｏｌ％のＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧで４つの脂質を含み、５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、４５ｍＭのＮａＣｌ、５％（ｗ／ｖ）のスクロースから構成されるｐＨ７．４での水性緩衝液中で製剤化する。Ｎ：Ｐ比は約６であり、ｇＲＮＡ：Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ比は重量で約１：２である。ＬＮＰは、単回静脈内（intravenous、ＩＶ）投与を目的とする。

【０６９６】

【表１１】

表１１．脂質ナノ粒子（ＬＮＰＦ９）組成物。

成分	説明
活性薬学的成分	Cas9 mRNA sgRNA(gRNA9860)
脂質賦形剤	脂質A:(9Z, 12Z)－3－((4, 4－ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)－2－((((3－(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ－9, 12－ジエノアート コレステロール DSPC PEG2K－DMG
他の賦形剤	Tris、NaCl、スクロース WFI

【０６９７】

ＬＮＰＦ９は、脂質ナノ粒子にカプセル化された２つのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９分子からなる。第１は、３３キロダルトン（ｋＤａ）の分子量を有する１００ヌクレオチドからなり、ヒトＡＬＢ遺伝子のイントロン１における標的領域に相補的である２０ヌクレオチド配列を含有する単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）配列であるｓｇＲＮＡ　９８６０である。ｇ９８６０によって認識される標的配列は、カニクイザルサルｍｆＡｌｂ遺伝子イントロン１において保存されている。第２は、約１．５メガダルトン（ＭＤａ）の分子量を有する約４，４００ヌクレオチドからなる、ＣＲＩＳＰＲ関連Ｃａｓ９タンパク質をコードするコドン最適化されたメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）配列である。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡから発現されたＣａｓ９タンパク質は、ｓｇＲＮＡ　９８６０がＰＡＭに関連する標的化相補的ＤＮＡ配列に結合する場合にのみ、ＤＮＡを切断するように指向される。

【０６９８】

ＡＬＢ遺伝子座が肝臓肝細胞で特異的かつロバストに発現されるため、それを挿入のための標的化部位として選択した。加えて、ＡＬＢシグナルペプチドはエキソン１にコードされ、これは下流に挿入された導入遺伝子の分泌を媒介するために選ばれ得る。したがって、挿入されたＦ９遺伝子は、発現のためにＡＬＢプロモーター及び開始コドンに依存し、分泌のためにＡＬＢシグナルペプチドに依存する。ＡＬＢ遺伝子座内の遺伝子挿入は、ＡＬＢ遺伝子のうちのほんのわずかな画分が挿入を介して修飾されるため、全体的な血清アルブミンレベルに実質的に影響を及ぼすとは予想されない。

【０６９９】
単一のガイドＲＮＡ。ＬＮＰＦ９において使用される単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ９８６０）は、標準的な固体相ホスホロアミダイトオリゴヌクレオチド合成を介して作製された１００量体のオリゴヌクレオチドである。製造は、固体支持体に固定された３’末端ウラシルヌクレオチドから構築する９９サイクル化学合成からなる。化学修飾は、合成中に１００量体に組み込まれ、これは、ｓｇＲＮＡの５’末端及び３’末端におけるホスホロチオエート（ＰＳ）結合、並びにＲＮＡの糖の一部に対する２’－０－メチル修飾を含む。合成後、１００量体を固体支持体から切断し、続いて保護基を除去する。粗１００量体産物の精製は、イオン交換クロマトグラフィによって完了する。クロマトグラフィ画分をプールし、緩衝液を交換し、脱塩し、水中で－６５℃未満で凍結保存する。

【０７００】
Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ。ＬＮＰＦ９において使用されるＣａｓ９メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓからのＣａｓ９タンパク配列に基づく。Ｃａｓ９コードｍＲＮＡ（配列番号２２５、ＣＤＳは配列番号２２６に示される）は、約４４００ヌクレオチド長であり、線状化ＤＮＡ鋳型及びＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを使用するインビトロ転写（in vitro transcription、ＩＶＴ）反応を介して合成される。配列は、５’キャップ、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）、Ｃａｓ９タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム（open reading frame、ＯＲＦ）、３’ＵＴＲ及びポリＡテールを含有する。５’キャップは、アンチリバースキャップアナログ（ＡＲＣＡ）として既知の合成キャップ類似体構造の使用によって共転写的に生成される。ＩＶＴ反応に使用されるヌクレオチド（ＮＴＰ）は、３つの修飾されていないＮＴＰ、ＡＴＰ、ＣＴＰ、及びＧＴＰ、並びに１つの修飾ヌクレオチド、Ｎ１－メチルシュードＵＴＰを含む。ＩＶＴ反応の完了後、粗ｍＲＮＡを、塩化リチウムによる選択的沈殿及び接線方向流れ濾過によって精製する。最終精製ｍＲＮＡを水中（－６５℃以下）で－８０℃で凍結保存する。

【０７０１】
ｍＲＮＡ配列中のウラシルは、インビトロ転写中に修飾N^1メチルシュードウリジンによって完全に置き換えられている。N^1メチルシュードウリジンは、ウラシルの天然の誘導体であり、ｍＲＮＡへのその組み込みは、タンパク質の発現を増加させることが示されている。ｍＲＮＡの５’末端は、安定性を増加させるために合成キャップ類似体構造を有する。約１００ヌクレオチドのポリＡテールは、ｍＲＮＡ分子に追加の細胞内安定性を付与する。

【０７０２】
Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、組換え酵素プロセスを使用するインビトロ転写によって生成することができる。主な成分を表１２に要約する。ｍＲＮＡ合成のための鋳型は、Ｅ．ｃｏｌｉにおいて生成されたプラスミド内に含有されるＣａｓ９コード配列であり得る。

【０７０３】

【表１２】

表１２．主なｍＲＮＡプロセス成分の要約。

成分	説明	目的
ヌクレオチド	Ｎ１－メチルシュードウリジン－５’－三リン酸	出発物質
	アデノシン三リン酸	
	シチジン三リン酸	
	グアノシン三リン酸	
mRNAキャップ	ARCA又はCleanCap（商標）	mRNAのための合成「キャップ」
タンパク質／酵素	T7ポリメラーゼ	mRNAのポリマー伸長のための組換え酵素
	RNase阻害剤	存在する微量RNaseによるmRNAの分解を防止する組換え酵素
	ピロホスファターゼ	ニリン酸切断産物を除去するための組換え酵素（T7polを阻害する）
	DNase（Turbo、TF）	mRNAの合成が完了した後にプラスミド鋳型を消化する。
Cas9遺伝子配列をコードするプラスミド	線状化プラスミド	Ｃａｓ９　ｍＲＮＡをコードする鋳型

【０７０４】

プラスミドを抽出し、標準的な方法によって精製する。この出発物質を定義された仕様に照らして試験し、放出する。プラスミドを制限消化によって線状化し、ｍＲＮＡを作製するための鋳型として使用する前に、このエンドヌクレアーゼから精製する。プラスミドをバルク溶液として凍結保存する。

【０７０５】

Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを、線状化プラスミド鋳型によって提供されるＴ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターによって駆動されるインビトロ転写（ＩＶＴ）反応によって生成する。ＩＶＴプロセスは、２～４時間、３７℃の反応を通して進行し、Ｔ７ポリメラーゼは、新生鎖の５’末端で合成アンチリバースキャップアナログ（例えば、ＡＲＣＡ）を用いて転写を開始し、次いで、ｄｓＤＮＡ鋳型の末端に到達し、約４，５１４ヌクレオチドのｍＲＮＡ分子を放出するまで、適切な対応するヌクレオチドを成長中の一本鎖ｍＲＮＡに逐次的かつ漸進的に付加する。

【０７０６】

ＩＶＴ反応後、残りのプラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）鋳型はＤＮａｓｅ消化によって分解される。その後の下流精製ステップを実施して、出発物質を除去し、ｍＲＮＡ原薬を濃縮する。バルクＣａｓ９　ｍＲＮＡを放出試験に供し、－２０℃で又は－２０℃未満で凍結保存する。

【０７０７】

脂質賦形剤。３つの非専売の脂質、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＰＥＧ２Ｋ－ＤＭＧ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、及びコレステロールは、ｃＧＭＰ基準で製造することができる。

【０７０８】

ＬＮＰＦ９最終製剤。交差流混合プロセスは、ｓｇＲＮＡ及びＣａｓ９　ｍＲＮＡをＬＮＰにカプセル化する。凍結乾燥したｓｇＲＮＡを注射用水（water for injection、ＷＦＩ）中で再構成し、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ溶液を解凍する。ｓｇＲＮＡ及びｍＲＮＡを混合する。制御された混合プロセスは、特定の重量に基づく量のｓｇＲＮＡ及びＣａｓ９　ｍＲＮＡを含有する水性緩衝溶液を、４つの脂質成分を特定のモル比で含有するエタノール溶液とブレンドした。混合後、ＷＦＩ又は緩衝液でインライン希釈する。その後の下流処理は、最終濃度及び緩衝液交換のための限外濾過及びダイアフィルトレーションを伴う。次いで、リダンダント滅菌フィルターを使用して製剤を滅菌濾過し、バイアルに充填する。最終産物は、ｓｇＲＮＡ及びＣａｓ９　ｍＲＮＡを含有する凍結ＬＮＰ懸濁液で

ある。
【０７０９】
ＤＮＡ鋳型の設計及び選択
ｒＡＡＶ８ベクターによって送達されるＦ９　ＤＮＡ鋳型は、免疫原性を最小化しながら強力なオンターゲットＦＩＸ発現を支持するために野生型ＦＩＸタンパク質をコードする双方向性カセットとして設計された。しかしながら、一方向性カセットを使用することもできる。Ｆ９　ＤＮＡ鋳型は、プロモーターを含まない鋳型であり、したがって、発現のために標的化ＡＬＢ遺伝子座プロモーターに依存する。
【０７１０】
カセットに隣接するＡＡＶ逆位末端反復（ＩＴＲ）は、ＡＡＶ２に由来した。部分的野生型Ｆ９コード配列（coding sequence、ＣＤＳ）は、ＤＮＡ鋳型内でセンスの向き及びアンチセンスの向きの両方でコードされる。これらのＦ９導入遺伝子は、天然ＦＩＸシグナルペプチドを欠き、代わりにＡＬＢエキソン１シグナルペプチドに依存するが、Ｆ９導入遺伝子は、部分的ＦＩＸプロペプチド配列を保持する。Ｆ９の各コピーは、固有のコード配列を使用し、一方はコンセンサスヒトＣＤＳの修飾バージョンであり、他方はコドン最適化された。Ｆ９の２つのコピーは、２つのコピー間の分子内ハイブリダイゼーション及びプラスミド又はＡＡＶ　ＤＮＡにおけるヘアピン構造の形成を制限するために、可能な限り互いに配列が異なるように設計される。両方のコピーからＣｐＧジヌクレオチドモチーフを枯渇させ、潜在性スプライスドナーモチーフを適宜除去した。
【０７１１】
各Ｆ９導入遺伝子の５’末端のスプライスアクセプター配列は、マウスＡｌｂエキソン２スプライスアクセプターに由来した。Ｆ９導入遺伝子の３’末端のポリアデニル化配列は、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）及びウシ成長ホルモン（ｂＧＨ）に由来した。
【０７１２】
開発候補を選択するために、Ｆ９の一方又は両方のコピーをコードするヌクレオチド配列が修飾された双方向性挿入カセットのいくつかのバージョンを生成した。表１３は、試験したＦ９インサートの異なるバージョンをリストし、表１４は、試験した異なる双方向性挿入カセットをリストする。候補挿入鋳型をインビトロ、初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）、初代カニクイザルサル肝細胞（primary cynomolgus monkey hepatocyte、ＰＣＨ）、及びマウスにおいてインビボで比較し、ＦＩＸタンパク質発現及び変動性について評価した。リードＡＡＶ鋳型は、複数のプラットフォーム（初代ヒト及び非ヒト霊長類肝細胞、ＡＬＢヒト化マウス、及び非ヒト霊長類）にわたってロバストなｈＦＩＸ発現レベルを支持すること、潜在性スプライシング事象の低減、最小ＣｐＧ含有量、及び製造可能性（パッケージング効率／収率、空／完全比）に基づいて選択した。表１３における「天然ＣｐＧ除去スプライスなし」Ｆ９インサートは、１８個のＣｐＧジヌクレオチドが除去され、３個の潜在性スプライスドナー部位が除去された天然Ｆ９配列を指す（１個の新規ＣｐＧジヌクレオチドモチーフの導入は不可避である）。表１３における「コドン最適化された」Ｆ９インサート、及びインサート７２において使用されたＦ９インサートは、７４個のＣｐＧを有し、インサート７２において使用された「天然」Ｆ９インサートは、１８個のＣｐＧを有する。表１４におけるインサート２７、インサート２８、インサート２９、及びインサート３０は全て、ＩＴＲ内に単一のＣｐＧのみを含有する。
【０７１３】

【表１３】

表１３．挿入カセットのためのＦ９インサート。

F9インサート	配列番号
天然F9インサート	158
天然CpG除去スプライスなしF9インサート	159
天然CpG除去F9インサート	160
天然スプライス除去F9インサート	161
コドン最適化されたF9インサート	162
COMP F9インサート	163
DC F9インサート	164
GA F9インサート	165
CpG0 F9インサート	166
CpG3 F9インサート	167
CpG10 CpGなしF9インサート	168
CpG10 F9インサート	169
CpG20 CpGなしF9インサート	170
CpG20 F9インサート	171

【０７１４】

【表１４】

表１４．双方向性挿入カセット。

構築物	F9番号1	F9番号2	配列番号 (ITRあり;ITRなし)
72	天然	コドン最適化された	172;202
18	天然	COMP	173;203
19	天然	DC	174;204
20	天然	GA	175;205
21	天然	CpG0	176;206
27	天然CpG除去スプライスなし	COMP	177;207
28	天然CpG除去スプライスなし	DC	178;208
29	天然CpG除去スプライスなし	GA	179;209
30	天然CpG除去スプライスなし	CpG0	180;210
36	天然CpG除去スプライスなし	コドン最適化された	181;211
37	天然CpG除去	コドン最適化された	182;212
38	天然	コドン最適化された	183;213
39	天然スプライス除去	コドン最適化された	184;214
22	天然	CpG3	185;215
23	天然	CpG10 CpGなし	186;216
24	天然	CpG10	187;217
25	天然	CpG20 CpGなし	188;218
26	天然	CpG20	189;219
31	天然CpG除去スプライスなし	CpG3	190;220
32	天然CpG除去スプライスなし	CpG10 CpGなし	191;221
33	天然CpG除去スプライスなし	CpG10	192;222
34	天然CpG除去スプライスなし	CpG20 CpGなし	193;223
35	天然CpG除去スプライスなし	CpG20	194;224

【０７１５】

選択された開発候補は、インサート３０によってコードされる双方向性挿入カセットであり、これは、ｒＡＡＶ８にパッケージされた場合、本明細書においてＲＥＧＶ１３１と示される（図３）。ＲＥＧＶ１３１は、初代ヒト及び非ヒト霊長類肝細胞、ＡＬＢヒト化マウス、並びに非ヒト霊長類における挿入を介するＦＩＸタンパク質発現を実証している。他の双方向性Ｆ９挿入カセット（例えば、インサート７２）と比較して、インサート３０は、ｈＦＩＸ発現（レベル、活性、低変動性、製造可能性）を維持する一方で、ヒト患者における鋳型性能に影響を与え得る潜在的な負の特徴も除去し、野生型マウス及び非ヒ

ト霊長類において観察される意図しない潜在性スプライシング事象を最小化し、ＡＡＶウイルスベクターにおけるＣｐＧ部位が強力なＴＬＲ９アゴニストであり得る非メチル化Ｃを含有するため、ＣｐＧを枯渇させる。これを実証するために、末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell、ＰＢＭＣ）をヒト血液から単離した。形質細胞様樹状細胞（Plasmacytoid dendritic cell、ｐＤＣ）を濃縮し、ＰＢＭＣと組み合わせた（ウェル当たり１ｅ４個のｐＤＣ＋１ｅ５個のＰＢＭＣ）。細胞をＡＡＶ又は対照ＣｐＧ－オリゴデオキシヌクレオチド（oligodeoxynucleotide、ＯＤＮ）とともに１６～１８時間インキュベートした。上清を回収し、ＩＦＮα　ＥＬＩＳＡを実施した。ＣｐＧが枯渇しているＦ９配列（例えば、インサート２９及びインサート３０）は、ＣｐＧが枯渇していないＦ９配列と比較して、初代ヒト形質細胞様ＤＣベースアッセイにおいてＩＦＮ－Ｉ応答の低減を誘発した（図９）。

【０７１６】

ＲＥＧＶ１３１（ｒＡＡＶ８ベクター）の説明及び製造

ＲＥＧＶ１３１は、複製不全のｒＡＡＶ８キャプシドにパッケージされた、野生型ＦＩＸタンパク質をコードする双方向性Ｆ９　ｒＡＡＶ　ｓｓＤＮＡゲノムカセットからなる。野生型ＦＩＸは、前臨床研究におけるロバストな発現に基づいて選択され、これは、機能亢進性バリアントＦＩＸの使用についての必要性を排除した。ＡＡＶ８は、複数のモデル系において肝臓を標的とするその能力、その好ましい製造プロファイル、及びヒト臨床試験における肝臓指向性ベクターとしてのその使用に起因して、挿入プラットフォームのための血清型として選択された。

【０７１７】

ＤＮＡ鋳型は、各末端でＡＡＶ２由来ＩＴＲを利用し、２つのＦ９コード配列（ＣＤＳ）を含み、各ＣＤＳは、スプライスアクセプター及びポリアデニル化（ポリＡ）配列に隣接する。

【０７１８】

Ｆ９　ＤＮＡ鋳型は、ＡＬＢ　ｓｇＲＮＡ標的部位に隣接するヌクレオチドに対していかなるホモロジーも有せず、ホモロジー非依存性機構を介して挿入される。したがって、挿入カセットは、いずれかの挿入の向きがＦＩＸタンパク質発現を支持することができるように、双方向性であるように設計され、２つのタンデム反転Ｆ９導入遺伝子をコードする。これらのＦ９導入遺伝子は、分泌のためにＡＬＢエキソン１シグナルペプチドに依存するが、細胞内タンパク質分解プロセシングのための部分的ＦＩＸプロペプチド配列を保持するので、天然ＦＩＸシグナルペプチドを欠く。

【０７１９】

Ｆ９の各コピーは、固有のコード配列を使用し、一方はコンセンサスヒトＣＤＳの修飾バージョンであり、他方はコドン最適化された。Ｆ９の２つのコピーは、２つのコピー間の分子内ハイブリダイゼーション及びプラスミド又はＡＡＶ　ＤＮＡにおけるヘアピン構造の形成を制限するために、可能な限り互いに配列が異なるように設計される。両方のコピーは、導入遺伝子発現制限免疫応答を最小化するためにＣｐＧジヌクレオチドモチーフが枯渇されており、潜在性スプライスドナーモチーフは、適宜除去されている。

【０７２０】

各Ｆ９導入遺伝子の５’末端のスプライスアクセプター配列は、マウスＡｌｂエキソン２スプライスアクセプターに由来する。Ｆ９導入遺伝子の３’末端のポリアデニル化配列は、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）及びウシ成長ホルモン（ｂＧＨ）に由来する。

【０７２１】

ＲＥＧＶ１３１注射は、所定の強度で水性緩衝溶液として製剤化された、選択されたＤＮＡ鋳型を含有する精製ｒＡＡＶ８ベクターの滅菌注射用製品である。原薬（drug substance、ＤＳ）は、ＨＥＫ２９３細胞の三重トランスフェクションを利用して製造され、その後、滅菌注射用薬物製品へと更に製造される。

【０７２２】

ＲＥＧＶ１３１の構造。ＲＥＧＶ１３１は、ＡＡＶ血清型８に由来するＡＡＶベースの

ベクターである。ＲＥＧＶ１３１ゲノムは、各末端に逆位末端反復（ＩＴＲ）を含む一本鎖デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）である。ＩＴＲは、図３に示すように、野生型ＦＩＸタンパク質の双方向性のプロモーターを含まない挿入鋳型の、２つの異なるコドン最適化されたＣｐＧ最小化コードＤＮＡ（ｃＤＮＡ）配列に隣接する。ＲＥＧＶ１３１は、ＤＮＡ双方向性鋳型を標的化細胞に送達する非複製性ベクターである。

【０７２３】

以下の実施例において実証されるように、双方向性鋳型は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９（ＬＮＰＦ９）標的部位におけるホモロジー非依存性ＤＮＡ修復後に、ＡＬＢイントロン１内の標的細胞ゲノムに組み込まれる。以下の実施例において実証されるように、この組み込みは、ＦＩＸプロペプチド及びアルブミンエキソン１からの残りのアミノ酸、すなわち、シグナル配列及び８個のアミノ酸からなる融合タンパク質の安定した発現をもたらす。タンパク質分解切断は分泌の間に起こり、野生型ＦＩＸ成熟タンパク質の血漿又は細胞外区画への放出をもたらす。

【０７２４】

図４に示される双方向性鋳型プラスミドは、Ｆ９遺伝子についての２つのコード配列を含有し、相補性を最小化するために、各々別々にＣｐＧが最小化され、コドン最適化されている。この設計は、鋳型が挿入方向にかかわらず機能的なＦＩＸ発現をもたらすことを確実にする。各Ｆ９遺伝子の停止コドンの後、構築物の中央に、２つのポリＡ配列のうちの１つが配置される。一方は、最初にウシ成長ホルモン遺伝子（ｂＧＨポリＡ）から取られ、他方は、サルウイルス４０ポリＡ（ＳＶ４０ポリＡ）に由来する配列から取られ、これらの両方は、いくつかの哺乳動物宿主のために設計された導入遺伝子構築物において一般的に使用され、効率的なポリＡシグナルであることが既知である。構築物中の各Ｆ９遺伝子はプロモーターを含まず、代わりに３’スプライスアクセプター部位がコードされて、アルブミンシグナル配列が天然ＡＬＢ遺伝子座からの転写後に導入遺伝子産物に融合されることを可能にする。

【０７２５】

ＡＡＶウイルスゲノム（virus genome、ｖｇ）をコードするプラスミド配列を、細菌複製起点（origin of replication、ｏｒｉ）及びカナマイシン耐性遺伝子（kanamycin resistance gene、ＫａｎＲ）をコードする細菌発現カセットを含有するプラスミド骨格に挿入した。

【０７２６】

ｒｅｐ／ｃａｐプラスミドＲｅｐ２／Ｃａｐ８は、ＡＡＶ及びその意図されるＦ９導入遺伝子の適切なアセンブリを可能にするために、双方向性鋳型プラスミドとともに細胞に同時トランスフェクトされるウイルスタンパク質をコードする２つのプラスミドのうちの１つである。複製／ｃａｐプラスミドは、タンパク質キャプシドのアセンブリ、ＡＡＶトランスジェニックゲノムをコードするＤＮＡの一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）へのプロセシング、及びｓｓＤＮＡウイルスゲノムのキャプシドへのパッケージングに必要である、野生型ＡＡＶゲノムの２つの主要な成分：ｒｅｐ遺伝子及びｃａｐ遺伝子をコードする。このプラスミドは、ＡＡＶ２からのｒｅｐ遺伝子及びＡＡＶ８からのｃａｐ遺伝子を使用するキメラ配列を含有する。ｃａｐ遺伝子のみがタンパク質キャプシド中のタンパク質をコードするため、これは、ＡＡＶ８血清型を有する組換えＡＡＶを作製するのに十分である。ｒｅｐ転写物は、野生型ＡＡＶ　Ｐ５プロモーターの切断型バージョンの制御下にあるが、ｃａｐ転写物は、転写及び翻訳を駆動するために追加のアデノウイルスタンパク質を必要とするＡＡＶ　ｐ４０プロモーターの制御下にある。Ｐ５－ｒｅｐ／ｃａｐ系を、細菌ｏｒｉ及びＫａｎＲを含有する標準的なプラスミド骨格に合成した。

【０７２７】

プラスミドｐＡｄ－ヘルパー－Ｋａｎは、ＡＡＶプロデューサー細胞がＡＡＶ　ｒｅｐ／ｃａｐプラスミドからＲｅｐ及びＣａｐタンパク質を首尾よく発現するために必要なアデノウイルスタンパク質をコードするヘルパープラスミドである。アデノウイルスタンパク質は、必要とされるＤＮＡ複製及びトランスファープラスミドからのＡＡＶ導入遺伝子

のパッケージングを駆動し、ＡＡＶ生成を駆動するために必要とされる追加の機能を実施する。ｐＡｄ－ヘルパー－Ｋａｎにコードされる一連のアデノウイルスオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）及びＲＮＡは、完全長アデノウイルスゲノム又はＡＡＶ産生のためのヘルパー剤としての感染性アデノウイルスの使用を必要とせずに、このタスクを駆動するのに十分である。

【０７２８】

ＲＥＧＶ１３１は、市販のＨＥＫ２９３細胞株ＣＴＳ　Ｖｉｒａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｃｅｌｌｓ（カタログ番号Ａ３１５２８０１、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の三重トランスフェクションによって製造することができる。

【０７２９】

ＲＥＧＶ１３１は、例えば、１０ｍＭのリン酸ナトリウム、１８０ｍＭの塩化ナトリウム、及び０．００５％のポロキサマー１８８において、ｐＨ７．３で製剤化することができる。

【０７３０】

血友病Ｂの治療のためのＲＥＧＶ１３１－ＬＮＰＦ９

ＲＥＧＶ１３１及びＬＮＰＦ９は、静脈内注入によって全身的に投与されるように計画されている。肝細胞に侵入すると、ＲＥＧＶ１３１はＦ９　ＤＮＡ鋳型を核に送達し、一方、ＬＮＰＦ９は２つのＲＮＡ分子を細胞質内に送達する。翻訳されると、Ｃａｓ９タンパク質はｓｇＲＮＡ　９８６０と複合体を形成してリボ核タンパク質（ribonucleoprotein、ＲＮＰ）複合体を形成し、これは核に移動し、ＡＬＢ遺伝子座のイントロン１内のｓｇＲＮＡ　９８６０標的部位で宿主ｄｓＤＮＡを切断することができる。それに続いて、Ｆ９　ＤＮＡ鋳型を、ＮＨＥＪによってＤＳＢ部位に挿入することができる。

【０７３１】

Ｆ９　ＤＮＡ鋳型のＡＬＢイントロン１への挿入後、内因性ＡＬＢプロモーターからのｍＲＮＡ転写は、ＡＬＢエキソン１を介して進行し、ポリＡ配列に到達するまでＦ９　ＤＮＡ鋳型へと続き、転写の終結をシグナル伝達する。ＡＬＢエキソン１スプライスドナーとＦ９挿入鋳型にコードされるスプライスアクセプターとの間のスプライシング後、得られるｍＲＮＡは、ＡＬＢエキソン１とＦ９コード配列との間の融合転写物である。翻訳中、エキソン１にコードされるＡＬＢシグナルペプチドは、分泌経路へのポリペプチドの進入を媒介し、分泌中にタンパク質分解的に除去される。ＦＩＸポリペプチドは、ＦＩＸプロペプチドを除去するために細胞内で更にプロセシングされ、したがって、成熟しかつ機能的な野生型ＦＩＸタンパク質を生じ、これは、次いで、循環中に分泌され、血漿中で検出される。

【０７３２】

要約すると、ＬＮＰＦ９によって送達される高度に正確かつ標的化されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９技術と、選択されたｒＡＡＶ８ベクター（ＲＥＧＶ１３１）によって送達されるＦ９　ＤＮＡ鋳型との組み合わせは、肝細胞からの野生型ＦＩＸタンパクの発現を可能にし、血友病Ｂ患者に生涯にわたる有効な治療を潜在的に提供すると予想される。

【０７３３】

実施例２．インビトロでの検証

初代ヒト肝細胞におけるＦＩＸタンパク質発現レベル

ｒＡＡＶ８送達ＤＮＡ鋳型の標的化挿入が、本発明者らのリードＬＮＰ候補とカップリングされた本発明者らのリードｒＡＡＶ候補を有するヒト肝細胞において起こり得ることを確認するために、ＡＬＢ遺伝子座からの野生型ＦＩＸタンパク質の発現を、初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）においてインビトロで評価した。

【０７３４】

ＰＨＨを、ＡＬＢイントロン１への鋳型の挿入を標的とするためにＬＮＰＦ９を用いて、又は用いずに、インサート３０によってコードされるＦ９　ＤＮＡ鋳型又は２つの他の候補挿入鋳型（インサート７２及びインサート２９）のいずれかをパッケージしたｒＡＡＶ８で処理した。図２を参照されたい。ＦＩＸタンパク質濃度を、ｈＦＩＸ（Ａｂｃａｍ

番号ａｂ１８８３９３）についてのＥＬＩＳＡアッセイを使用して８日後に測定した。
【０７３５】
未処理のままの細胞は、低レベルの内因性ｈＦＩＸを発現し、ｒＡＡＶ８パッケージＦ９　ＤＮＡ鋳型単独で形質導入された細胞は、同様に低い内因性レベルのｈＦＩＸを発現した。対照的に、ｒＡＡＶ８送達Ｆ９　ＤＮＡ挿入鋳型及びＬＮＰＦ９又はヒトＡＬＢイントロン１を標的とする他のｓｇＲＮＡを含有するＬＮＰ（例えば、ｇ９８５７、ｇ９８７４、及びｇ９８４４）で処理した細胞は、ＬＮＰ用量依存性様式でｈＦＩＸを分泌した（図５）。
【０７３６】
結論として、ＰＨＨのＡＬＢ遺伝子座へのＦ９　ＤＮＡ鋳型の標的化挿入は、インビトロでＦＩＸタンパク質発現をもたらした。インサート３０から生成されたＦ９　ＤＮＡ鋳型は、ＬＮＰＦ９とともにＰＨＨにおいて直接（ｈｅａｄ　ｔｏ　ｈｅａｄ）試験した場合、他の鋳型よりも高いレベルのｈＦＩＸを支持した。
【０７３７】
初代非ヒト霊長類肝細胞におけるＦＩＸタンパク質発現レベル
ｒＡＡＶ８送達ＤＮＡ鋳型の標的化挿入が、本発明者らのリードＬＮＰ候補とともに本発明者らのリードｒＡＡＶ８候補を有する非ヒト霊長類肝細胞において起こり得ることを確認するために、ＡＬＢ遺伝子座からの野生型ＦＩＸタンパク質の発現を、初代カニクイザルサル肝細胞（ＰＣＨ）においてインビトロで評価した。
【０７３８】
ＰＣＨを、ＡＬＢイントロン１への鋳型の挿入を標的とするためにＬＮＰＦ９を用いて、又は用いずに、インサート３０によってコードされるＡＡＶ鋳型又は２つの他の候補挿入鋳型（インサート７２及びインサート２９）のいずれかをパッケージしたｒＡＡＶ８で処理した。ＦＩＸタンパク質濃度を、ｈＦＩＸ（Ａｂｃａｍ番号ａｂ１８８３９３）についてのＥＬＩＳＡアッセイを使用して８日後に測定した。
【０７３９】
未処理のままのＰＣＨ及びｒＡＡＶ８パッケージされたＦ９　ＤＮＡ鋳型単独で形質導入された細胞では、低レベルのバックグラウンドｈＦＩＸシグナルが測定された。対照的に、ｒＡＡＶ８送達Ｆ９　ＤＮＡ挿入鋳型及びＬＮＰＦ９又はヒトＡＬＢイントロン１を標的とする他のｓｇＲＮＡを含有するＬＮＰ（例えば、ｇ９８５７、ｇ９８７４、及びｇ９８４４）で処理した細胞は、ＬＮＰ用量依存性様式でｈＦＩＸを分泌した（図６）。
【０７４０】
結論として、ＰＣＨのＡＬＢ遺伝子座へのＦ９　ＤＮＡ鋳型の標的化挿入は、インビトロでＦＩＸタンパク質発現をもたらした。これらの結果は、非ヒト霊長類に由来する肝細胞が、ＬＮＰＦ９及びｒＡＡＶ８パッケージされたＦ９　ＤＮＡ鋳型インサート３０（ＲＥＧＶ１３１）を使用する挿入を介してｈＦＩＸの発現を支持することができることを実証し、更に、これらの候補を用いる翻訳研究のための好適な大型動物モデルとしての非ヒト霊長類の選択を支持する。
【０７４１】
実施例３．血友病Ｂのマウス疾患モデルにおけるインビボでのヒトＦＩＸタンパク質の発現及び活性
ＦＩＸの欠乏症又は機能異常症のいずれかを有する血友病Ｂ患者と同様に、ヒト化ＡＬＢ遺伝子座を有し、Ｆ９遺伝子の欠乏症に起因するＦＩＸ活性を欠く遺伝子操作マウスにおけるヒト野生型ＦＩＸタンパク質（ｈＦＩＸ）の発現及び活性のレベルについて、用量マトリックス研究において、ＬＮＰＦ９（ｇ９８６０）及びＲＥＧＶ１３１（インサート３０）を評価した。
【０７４２】
ＡＬＢ$^{hu/hu}$／Ｆ９$^{-/-}$マウスに、ＬＮＰＦ９（０．３、１．０、又は３．０ｍｇ／ｋｇ）及び／又はＲＥＧＶ１３１（３．０Ｅ１０又は１．５Ｅ１１ｖｇ／マウス）を静脈内投与した。ＬＮＰＦ９又はＲＥＧＶ１３１単独で治療した群は、４週間のモニタリン

グにわたって血漿中にｈＦＩＸを発現しなかった。しかしながら、ＬＮＰＦ９とＲＥＧＶ１３１との組み合わせで治療した動物は、用量依存性様式で血漿ｈＦＩＸを発現した（図７）。

【０７４３】

ＬＮＰＦ９とＲＥＧＶ１３１との組み合わせで治療したＡＬＢ$^{hu/hu}$／Ｆ９$^{-/-}$マウスからの血漿は、ｈＦＩＸ活性を示したｈＦＩＸを発現した（図８Ａ）。治療の４週間後にマウスから血漿を単離し、ｈＦＩＸに特異的な捕捉抗体（ＡＨＩＸ－５０４１、Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してマウス生成ｈＦＩＸをプルダウンし、次いで、発色アッセイ（ＢｉｏＰｈｅｎ　ＦＩＸ、Ｈｙｐｅｎ　ＢｉｏＭｅｄ）を使用して相対的ｈＦＩＸ活性を測定した。ｈＦＩＸレベルは、４週目でのｈＦＩＸ活性と相関していた（図８Ｂ）。データは、活性に対するレベルの相関として個々の動物についてプロットされる。

【０７４４】

要約すると、この概念実証研究は、ＦＩＸ欠乏症を有するＡＬＢ$^{hu/hu}$／Ｆ９$^{-/-}$マウスが、ヒト化ＡＬＢ遺伝子座へのｈＦ９遺伝子のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９挿入後に機能的ｈＦＩＸを発現することができることを実証した。

【０７４５】

組み合わされたデータは、インサート３０におけるＦ９　ＤＮＡ鋳型が、ＰＨＨ（図５を参照されたい）において、ＰＣＨ（図６を参照されたい）において、及びインビボでのカニクイザルサル（図１０Ａを参照されたい）において第１世代鋳型（インサート７２）よりも高いレベルのｈＦＩＸ発現を生じたことを示した。加えて、インサート３０鋳型は、インサート７２と比較して、ベクターに応答してより少ないＩＦＮα生成をもたらした（図９）。

【０７４６】

実施例４．非ヒト霊長類におけるインビボでのヒトＦＩＸタンパク質の発現及び活性

ＬＮＰＦ９（ｇ９８６０）とＲＥＧＶ１３１（インサート３０）との組み合わせを、ＬＮＰＦ９とＲＥＧＶ０１３（インサート７２）との組み合わせと比較して、雌及び雄のカニクイザルサル（非ヒト霊長類（ＮＨＰ））におけるヒトＦＩＸ（ｈＦＩＸ）発現及び活性の効率について評価した。ｇ９８６０の標的部位は、カニクイザルサルにおいて保存されているので、インサート３０をサルＡＬＢ遺伝子座に挿入することができる。

【０７４７】

サルに、ＬＮＰＦ９（１．０又は３．０ｍｇ／ｋｇ）、及び／又はＲＥＧＶ１３１（１．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ）若しくはＲＥＧＶ０１３（１．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ）を静脈内投与した。３．０ｍｇ／ｋｇのＬＮＰのみで治療した対照群は、注射後４週間のモニタリング期間中に血漿中にｈＦＩＸを発現しなかった。しかしながら、ＬＮＰＦ９とＲＥＧＶ１３１との組み合わせで治療したサルは、ＬＮＰ用量依存性様式で血漿ｈＦＩＸを発現する（図１０Ａ）。インサート３０は、３．０ｍｇ／ｋｇのＬＮＰＦ９と一緒に１．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇで投与した場合、インサート７２よりも高いＦＩＸレベルを生成した。より低い用量のＬＮＰＦ９（１．０ｍｇ／ｋｇ）と一緒に投与した場合であっても、インサート３０は、より高い用量のＬＮＰＦ９（３．０ｍｇ／ｋｇ）と一緒に投与した場合のインサート７２と少なくとも同程度のヒトＦＩＸを依然として生成した。ＬＮＰＦ９（１．０又は３．０ｍｇ／ｋｇ）及び／又はＲＥＧＶ１３１（１．５ｘ１０^{13}ｖｇ／ｋｇ）を静脈内投与した一部のサルでは、血漿中のｈＦＩＸの発現を６ヶ月間評価した（図１０Ｃ）。治療は、非ヒト霊長類において６ヶ月間全体にわたって用量応答性ｈＦＩＸ発現をもたらした。

【０７４８】

ヒトＦＩＸに特異的な抗体（ＡＨＩＸ－５０４１、Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、内因性サルＦＩＸを有するサル血漿からサル発現ｈＦＩＸタンパク質を単離して、エクスビボでＦＩＸ活性アッセイにおいてｈＦＩＸ機能を評価した。ＬＮＰＦ９のみで治療したサルからの血漿は、ｈＦＩＸタンパク質を有せず、し

たがって、ｈＦＩＸ活性を示さなかった。しかしながら、ＬＮＰＦ９とＲＥＧＶ１３１との組み合わせで治療したサルからの血漿は、ｈＦＩＸタンパクを発現し、ｈＦＩＸ活性に対するｈＦＩＸ発現の相関分析において示されるように、ｈＦＩＸ活性に対するＬＮＰ用量依存性応答を示した（図１０Ｂ、表１５）。

【０７４９】

【表１５】

表１５．２週目でのｈＦＩＸ発現とｈＦＩＸ活性との相関。

LNP及びウイルス用量	相対的hF9活性%	hF9μg／mL
g9860－3 mpk PBS 雄	0	N／D
g9860－3 mpk インサート72－1．5E13 雄	213．2	6．65
	368．7	12．19
	224．4	6．63
g9860－3 mpk インサート30－1．5E13 雄	526．0	19．44
	610．5	44．23
	256．4	10．64
	342．2	18．58
	488．6	24．31
	230．5	8．44
g9860－3 mpk インサート30－1．5E13 雌	533．7	21．77
	431．6	19．98
	307．4	13．13
g9860－1 mpk インサート30－1．5E13 雄	60．7	1．58
	197．6	7．69
	37．3	1．50
	265．7	16．05
	22．4	1．22
	38．5	2．42
g9860－1 mpk インサート30－1．5E13 雌	218．3	9．59
	111．3	2．84
	210．4	10．60

【０７５０】

要約すると、この概念実証研究は、カニクイザルサルが、サルＡＬＢ遺伝子座へのｈＦ９遺伝子のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９挿入後に機能的ｈＦＩＸを発現することができることを実証した。これらの結果は、サル研究において使用された同じＬＮＰ及びＡＡＶ成分が、肝臓肝細胞におけるヒトＡＬＢ遺伝子座への挿入のためにｈＦ９遺伝子を標的とするので、血友病Ｂを有する患者にとって有望である。

【０７５１】

実施例５．マウスにおける新生児挿入後の耐久性ヒトＦＩＸタンパク質発現

成体マウス及び新生児マウスにおけるエピソーム媒介性発現対挿入媒介性発現を比較するため、並びに成体マウス及び新生児マウスにおける異なるＤＮＡ修復経路を比較するため、本発明者らは、ｈＦＩＸエピソーム（ｈＡＡＴプロモーターによって駆動される発現）、双方向性ｈＦＩＸ　ＮＨＥＪ挿入鋳型、５００ｂｐのホモロジーアームを有するｈＦＩＸ　ＨＤＲ挿入鋳型、及び８００ｂｐのホモロジーアームを有するｈＦＩＸ　ＨＤＲ挿入鋳型の投与後のｈＦＩＸ血清レベルを比較した。図１１を参照されたい。新生児Ｃ５７ＢＬ／６マウスに、Ｐ０又はＰ１で以下を投与した：（１）４ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ－ｇ６６６及びｈＦＩＸ－ＨＤＲ－５００鋳型を有する３ｅ９ｖｇ／マウスのｒＡＡＶ８、（２）４ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ－ｇ６６６及びｈＦＩＸ－ＨＤＲ－８００鋳型を有する３ｅ９ｖｇ／マウスのｒＡＡＶ８、（３）４ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ－ｇ６６６及びｈＦＩＸ－ＮＨＥＪ鋳型を有する３ｅ９ｖｇ／マウスのｒＡＡＶ８、又は（４）３ｅ９ｖｇ／マウスのｒＡＡＶ８エピソーム鋳型。陰性対照として、生理食塩水を注射したマウスを使用した。エピ

ソームＡＡＶ中のｈＦＩＸコード配列は、野生型ヒトＦ９をコードするコドン最適化された配列であった。２つのＨＤＲ構築物中のｈＦＩＸコード配列は、Ｐａｄｕａ変異（Ｒ３３８Ｌ）を有する天然ヒトＦ９コード配列であった。投薬後１週間、２週間、及び５週間で血液を収集し、血漿を調製した。ｈＦＩＸレベルをヒトＦＩＸ　ＥＬＩＳＡによって測定した。次いで、実験を成体Ｃ５７ＢＬ／６マウスにおいて繰り返し、成体マウスに以下を投与した：（１）０．８ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ－ｇ６６６及びｈＦＩＸ－ＨＤＲ－５００鋳型を有する２ｅ１０ｖｇ／マウスのｒＡＡＶ８、（２）０．８ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ－ｇ６６６及びｈＦＩＸ－ＨＤＲ－８００鋳型を有する２ｅ１０ｖｇ／マウスのｒＡＡＶ８、（３）０．８ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ－ｇ６６６及びｈＦＩＸ－ＮＨＥＪ鋳型を有する２ｅ１０ｖｇ／マウスのｒＡＡＶ８、又は（４）２ｅ１０ｖｇ／マウスのｒＡＡＶ８エピソーム鋳型。陰性対照として、生理食塩水を注射したマウスを使用した。投薬後１週間、２週間、及び４週間で血液を収集し、血漿を調製した。結果を、図２及び表１２～表１３に示す。エピソーム媒介性発現は、新生児において挿入媒介性発現と比較して、最初の時点でさえ低く、新生児において経時的に失われた。成体マウスでは反対のことが観察された：エピソーム媒介性発現は、成体マウスにおいて挿入媒介性発現と比較して、最初の時点及びその後の時点でより高かった。これらの結果は、以前の同様の実験において観察されたことを確認した（データは示さず）。新生児マウスにおける結果とは対照的に、ｈＦＩＸレベルは、エピソーム及び挿入構築物の両方を有する成体マウスにおいて一定のままであり、エピソーム構築物が最も高い発現を与えた。図１２Ａ～図１２Ｂ及び表１６～表１８を参照されたい。

【０７５２】

【表１６】

表１６．新生児マウスにおけるヒトＦＩＸ血清レベル（μｇ／ｍＬ）。

	エピソーム								
1週目	0.9	0.56	0.48	0.52	0.96	0.67	0.93	0.98	0.77
2週目	0.2	0.11	0.12	0.14	0.15	0.17	0.22	0.21	0.15
5週目	0.06	0.03	0.03	0.07	0.07	0.03	0.04	0.04	0.04
	NHEJ								
1週目	14.22	19.28	14.12	18.67	21.69				
2週目	16.08	17.25	16.07	17.66	21.39				
5週目	12.29	12.41	14.18	16.61	13.71				
	HDR500								
1週目	11.03	8.02	7.86	10.11					
2週目	8.29	6.74	8.63	8.61					
5週目	6.27	4.09	5.24	5.49					
	HDR800								
1週目	3.86	6.44	6.52	4.43		1.41	2	3.58	2.71	2.07
2週目	3.54	6.9	7.46	4.44	4.64	1.65	2.45	3.55	2.83	2.5
5週目	2.4	3.49	3.48	3.33	3.77	0.77	2.19	2.7	2.5	1.68

【０７５３】

【表１７】

表１７．成体マウスにおけるヒトＦＩＸ血清レベル（μｇ／ｍＬ）。

	エピソーム				
1週目	16.69	15.57	18.97	14.17	9.82
2週目	25.39	23.07	41.53	27.53	12.07
4週目	39.97	26.61	39.63	28.5	14.28
	NHEJ				
1週目	8.1	9.52	13.09	6.55	9.2
2週目	9.15	8.12	8.18	6.46	7.27
4週目	14.86	10.86	13.85	8.42	13
	HDR500				
1週目	2.23	2.5	1.89	3.14	1.85
2週目	1.2	2.62	1.55	2.41	1.34
4週目	3.83	5.39	4.89	4.62	2.75
	HDR800				
1週目	1.65	0.94	0.26	0.54	0.14
2週目	0.69	1.52	0.24	0.67	0.46
4週目	2.13	1.87	0.49	0.94	0.43

【０７５４】

【表１８】

表１８．新生児マウスにおけるヒトＦＩＸ血清レベル（μｇ／ｍＬ）。

マウス番号	群番号	1週間 hF9 ug／mL	2週間 hF9 ug／mL	5週間 hF9 ug／mL	3ヶ月 hF9 ug／mL	4ヶ月 hF9 ug／mL	7ヶ月 hF9 ug／mL	9ヶ月 hF9 ug／mL	10ヶ月 hF9 ug／mL	12ヶ月 hF9 ug／mL	15ヶ月 hF9 ug／mL
1	対照1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	対照2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	対照3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	対照4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	対照5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	対照6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	対照7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	対照8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	HDR500－1	11.03	8.29	6.27	3.04	3.12	3.13	3.32	3.35	2.91	1.60
10	HDR500－3	8.02	6.74	4.09	3.05	2.51	2.59	2.80	2.98	2.95	1.54
11	HDR500－4	7.86	8.63	5.24	6.61	5.11	5.44	5.62	7.64	4.76	5.97
12	HDR500－5	10.11	8.61	5.49	5.68	6.60	5.43	5.33	7.89	5.00	7.00
13	エピソーム1	0.90	0.20	0.06	0.16	0.14	0.12	0.04	0.05	0.04	0.04
14	エピソーム2	0.56	0.11	0.03	0.09	0.09	0.08	0.03	0.03	0.04	0.06
15	エピソーム3	0.48	0.12	0.03	0.11	0.09	0.09	0.02	0.04	0.02	0.03
16	エピソーム4	0.52	0.14	0.07	0.14	0.11	0.09	0.03	0.02	0.02	0.05
17	エピソーム5	0.96	0.15	0.07	NA（マウスは死亡）			NA（マウスは死亡）			
18	エピソーム6	0.67	0.17	0.03	0.13	0.11	0.11	0.03	0.04	0.00	0.04
19	エピソーム7	0.93	0.22	0.04	0.13	0.09	0.09	0.09	0.05	0.04	0.03
20	エピソーム8	0.98	0.21	0.04	0.14	0.10	0.11	0.06	0.03	0.04	0.05
21	エピソーム9	0.77	0.15	0.04	0.14	0.15	0.12	0.05	0.03	0.05	0.07
22	HDR800－1	3.86	3.54	2.40	2.08	2.26	2.91	1.66	2.09	1.98	1.77
23	HDR800－2	6.44	6.90	3.49	3.47	3.36	3.49	ND	2.92	2.24	2.31
24	HDR800－3	6.52	7.46	3.48	2.80	3.62	3.45	2.71	2.70	1.95	2.54
25	HDR800－4	4.43	4.44	3.33	3.59	4.55	4.14	3.22	3.75	2.51	3.28
26	HDR800－5	NA	4.64	3.77	3.47	3.82	4.26	4.57	4.56	3.65	3.95
27	HDR800－6	1.41	1.65	0.77	1.54	1.48	1.19	3.35	1.50	1.47	1.60
28	HDR800－7	2.00	2.45	2.19	3.32	3.11	2.26	2.37	2.75	2.63	2.29
29	HDR800－8	3.58	3.55	2.70	2.16	2.09	2.36	1.58	2.04	1.59	2.08
30	HDR800－9	0.09	0.10	0.03	NA（マウスは死亡）			NA（マウスは死亡）			
31	HDR800－10	2.71	2.83	2.50	3.87	3.36	3.12	2.52	3.58	2.45	2.80
32	HDR800－11	2.07	2.50	1.68	1.35	1.66	1.28	1.15	1.45	1.01	1.50
33	NHEJ 1	6.45	5.75	NA（マウスは死亡）				NA（マウスは死亡）			
34	NHEJ 2	14.22	16.08	12.29	10.58	8.44	9.27	9.45	11.67	7.24	8.95
35	NHEJ 3	19.28	17.25	12.41	15.67	18.44	15.77	14.70	18.38	14.58	14.80
36	NHEJ 4	15.19	NA（マウスは死亡）					NA（マウスは死亡）			
37	NHEJ 5	14.12	16.07	14.18	17.28	15.39	14.79	16.99	18.47	14.32	14.68
38	NHEJ 6	18.67	17.66	16.61	19.46	21.53	22.32	18.93	23.21	19.53	21.90
39	NHEJ 7	18.23	NA（マウスは死亡）					NA（マウスは死亡）			
40	NHEJ 8	21.69	21.39	13.71	11.15	11.88	12.72	12.36	18.53	11.19	18.07

【０７５５】

これらの実験は、挿入されたＦ９の発現が新生児の肝臓において耐久性であることを示し、アルブミン遺伝子座へのＦ９鋳型の挿入が、新生児対象において耐久性発現をもたらし得ることを示している。これらのゲノムの組み込みは、新生児マウスにおける実験を通して維持された耐久性発現を提供した。

【０７５６】

実施例６．種々のＩＴＲ長のプラスミドを使用して生成されたｒＡＡＶ８ウイルス

初代ヒト肝細胞のＡＬＢ遺伝子座へのＦ９　ＤＮＡ鋳型の標的化挿入を、種々の長さのＩＴＲ長のプラスミドを使用して生成した組換えＡＡＶ８ウイルスで試験し、インビトロ

でのＦＩＸタンパク質発現に対する効果を決定した。具体的には、組換えＡＡＶ８ウイルスを、１４５ｂｐのＩＴＲ（配列番号１９６）、１４１ｂｐのＩＴＲ（配列番号１９７）、又は１３０ｂｐのＩＴＲ（配列番号１９８）を有するプラスミドを使用して生成した。ＬＮＰＦ９を、異なるＩＴＲ長を有するｒＡＡＶ８パッケージされたＦ９　ＤＮＡ鋳型インサート３０と一緒に、初代ヒト肝細胞に様々な濃度で投与した（２．８Ｅ１０ｖｇ／μＬ　ｒＡＡＶ８－Ｆ９－１４５ｂｐ　ＩＴＲ、３．２４Ｅ１０ｖｇ／μＬ　ｒＡＡＶ８－Ｆ９－１３０ｂｐ　ＩＴＲ、及び１．３３Ｅ１０ｖｇ／μＬ　ｒＡＡＶ８－Ｆ９－１４１ｂｐ　ＩＴＲ）。次いで、ＦＩＸ発現を７日目にＥＬＩＳＡによって評価した。図１３Ａ～図１３Ｂに示すように、種々のＩＴＲ長のプラスミドを使用して生成されたｒＡＡＶ８ウイルスは、ヒト肝細胞において同様に機能し、同様のレベルのＦＩＸ発現を生成した。

【０７５７】

実施例７．ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９挿入ヒトＦ９遺伝子は止血を回復させる

ＦＩＸの欠乏症又は機能異常症のいずれかを有する血友病Ｂ患者と同様に、ヒト化ＡＬＢ遺伝子座を有し、Ｆ９遺伝子の欠乏症に起因するＦＩＸ活性を欠く遺伝子操作マウスにおける尾出血チャレンジ後に止血を回復（すなわち出血を抑制）させることができるヒトＦＩＸ（ｈＦＩＸ）の発現及び分泌について、ＬＮＰＦ９（ｇ９８６０）とＲＥＧＶ１３１（インサート３０）との組み合わせを評価した。

【０７５８】

ＡＬＢ$^{hu/hu}$／Ｆ９$^{-/-}$マウスに、表１９に示すように、ＬＮＰＦ９（０．３又は１．０ｍｇ／ｋｇ）及び／又はＲＥＧＶ１３１（１．５Ｅ１３又は１．５Ｅ１２ｖｇ／ｋｇ）を静脈内投与した。

【０７５９】

【表１９】

表１９．治療群。

群	処理	AAV（vg／kg）	LNP（mpk）	「n」サイズ
A	野生型（ALB$^{hu/hu}$／F9$^{+/+}$）	－	－	5
B	治療なし（ALB$^{hu/hu}$／F9$^{-/-}$）	－	－	5
C	LNP1265のみ	－	1	5
D	AAVのみ（REGV131）	1．5e13	－	5
E	LNP＋AAV	1．5e13	1	5
F	LNP＋AAV	1．5e12	1	5
G	LNP＋AAV	1．5e13	0．3	5
H	LNP＋AAV	1．5e12	0．3	5

【０７６０】

治療の１、２、４、及び６週間後にマウスから血漿を単離し、ｈＦＩＸに特異的な捕捉抗体（ＡＨＩＸ－５０４１、Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してマウス生成ｈＦＩＸをプルダウンし、発色アッセイ（ＢｉｏＰｈｅｎ　ＦＩＸ、Ｈｙｐｅｎ　ＢｉｏＭｅｄ）を使用して相対的ｈＦＩＸ活性を測定した。ヒトＦＩＸ発現を、ＭＥＳＯ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ（ＭＳＤ）を使用して評価した。ストック（ＭＳＤによってコンジュゲートされたＣａｐｔｕｒｅ　Ｍａｂ　ＨＦＩＸ　Ｒ０４４ビオチン、１０００μｇ／ｍＬ）からアッセイ希釈剤（０．５％のＢＳＡ－ＰＢＳ）中で１μｇ／ｍＬの捕捉抗体を作製することによって、ビオチン化捕捉抗体を調製し、ストック（ＭＳＤによってコンジュゲートされたＤｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｍａｂ　ＡＨＩＸ－５０４１　Ｓｕｌｆｏ－ｔａｇ、１０００μｇ／ｍＬ）からアッセイ希釈剤（０．５％のＢＳＡ）中で１μｇ／ｍＬの検出抗体を作製することによって、検出抗体を調製した。標準を調製し、サンプルをアッセイ希釈剤中で１～５００及び１～１０００希釈で調製した。１５０μＬ／ウェルのブロッキング溶液をＭＳＤ　ＧＯＬＤプレートに添加し、密封し、プレートを振盪しながら（約７００ｒｐｍ）室温で１時間インキュベートすることによって、ブロッキングを実施した。プレートをゴミ箱の中で軽くたたくことによってブロッキング溶液をたたき出すことによって、コーティングを実施した。ビオチン化捕捉抗体を添加

した（アッセイ希釈剤中の１μｇ／ｍＬのビオチン化捕捉抗体の２５μＬ／ウェル）。プレートを密封し、４℃で一晩インキュベートした。プレートをプレート洗浄機内で洗浄した（３５０μＬ　ＰＢＳＴ×４）。較正標準（５０μＬ）及び希釈サンプルをウェルに添加した。プレートを密封し、振盪しながら（約７００ｒｐｍ）室温で２時間、又は４℃で一晩インキュベートした。検出のために、プレートをプレート洗浄機内で洗浄し（３５０μＬ　ＰＢＳＴ×４）、ＳＵＬＦＯ－ＴＡＧ検出抗体を添加し（アッセイ希釈剤中の１μｇ／ｍＬのＳＵＬＦＯ－ＴＡＧ検出抗体の２５μＬ／ウェル）、プレートを密封し、振盪しながら（約７００ｒｐｍ）室温で１時間インキュベートした。プレートをプレート洗浄機内で洗浄し、Ｒｅａｄ溶液を添加し（１５０μＬ／ウェルの２ｘＭＳＤ　Ｒｅａｄ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ）、プレートをＭＥＳＯ　ＳＥＣＴＯＲ　Ｓ　６００ＭＭ（Ｍｅｔｈｏｄｉｃａｌ　Ｍｉｎｄソフトウェアを備える）で直ちに読み取った。

【０７６１】

ヒトＦＩＸ活性を、マウス血漿からのｈＦＩＸの免疫沈降後にＢＩＯＰＨＥＮ第ＩＸ因子キットを使用して評価した。血漿からのｈＦＩＸの免疫沈降のための調製のために、ＥＬＩＳＡプレートを、１００ｎｇの抗Ｈｕ　ＦＩＸ抗体（ＨＴＩ－ＡＨＩＸ－５０４１からのモノクローナル抗体）で、ｍＡｂをＰＢＳ中に１μｇ／ｍＬで希釈し、次いで、１００μＬの希釈ｍＡｂをＨｉｇｈ－Ｂｏｕｎｄアッセイプレート上に１００ｎｇ／１００μＬ／ウェルで添加することによってコーティングした。プレートを４℃で一晩インキュベートした。コーティングｍＡｂ溶液を廃棄した。次いで、コーティングされたプレートを、プレート上に１５０μＬ／ウェルを添加することによって３％のＢＳＡ／ＰＢＳでブロックし、室温で２時間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄した（４×４００μＬのＰＢＳ洗浄緩衝液）。研究サンプル及び標準／較正物質の調製のために、研究血漿サンプルをキットからのＲ４緩衝液中で希釈した。キットのプロトコルに従って１００％～０％の標準範囲を使用して、キットから較正物質の血漿を生成した。（例えば、Ｇｅｏｒｇｅ　Ｋｉｎｇ　Ｂｉｏ－Ｍｅｄｉｃａｌから購入したヒト正常プール血漿は、アッセイにおいて１００％ｈＦＩＸ活性としてＲ４緩衝液で１００倍に希釈される）。標準較正物質（精製ｈＦＩＸ）及びサンプルをＲ４緩衝液中で希釈し（出発Ｓｔｄ１＝１００ｎｇ／ｍＬから３倍連続希釈でＲ４緩衝液中で希釈したＥＲＬ精製血漿ｈＦＩＸタンパク質を使用することによって標準曲線を生成した）、次いで、１００μＬ／ウェルでプレートに添加し、室温で２時間（又は４℃で一晩）インキュベートした。次いで、プレートをＰＢＳＴで３回洗浄した。活性を引き起こし定量するために、全ての内容物を廃棄し、５０μＬのＲ４を試験ウェルのうちの全てに添加した。次いで、活性アッセイを、キットプロトコルに記載されるように、かつ以下のように実行した：５０μＬのＲ１緩衝液（３７℃で予熱）を添加し、３７℃で４分間インキュベートし；５０μＬのＲ２緩衝液（３７℃で予熱）を添加し、３７℃で８分間インキュベートし；５０μＬのＲ３緩衝液（３７℃で予熱）を添加し、３７℃で５分間インキュベートし；５０μＬの２０％酢酸（停止溶液）を添加し、ＳｏｆｔＭａｘ７．２によるＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅマイクロプレートリーダーにおいて４０５ｎｍで吸光度を読み取った。

【０７６２】

図１４Ａ及び図１４Ｃは、１、２、４、及び６週目の血漿中のｈＦＩＸ発現レベルを示し、図１４Ｂは、６週目の血漿中のｈＦＩＸ発現レベルを示し、図１５Ａは、１、２、４、及び６週目の血漿中のｈＦＩＸ活性を示し、図１５Ｂは、６週目の血漿中のｈＦＩＸ活性を示す。図１５Ｃは、ｈＦＩＸ活性に対する血漿中のｈＦＩＸ発現レベルの相関を示す。図１４Ａ～図１５Ｃに示すように、ＲＥＧＶ１３１－ＬＮＰＦ９治療は、試験した６週間を通して、ＡＬＢ$^{hu/hu/F9-/-}$マウスにおいて用量応答性ｈＦＩＸ発現及び活性をもたらした。挿入鋳型（インサート３０）の挿入のレベル及びｈＦＩＸのｍＲＮＡレベルは、同様の用量応答を示した（データは示さず）。

【０７６３】

尾切断後の出血時間を４週目に測定して、インビボでの止血を評価した。温度制御された３７℃のミニインキュベーターに、イソフルラン麻酔のための準備ができているノーズ

コーンを準備した。各マウスについて、塩酸リドカイン（２％）を、鎮痛のために尾の先端に適用した。マウスを、２％のイソフルラン及び１．５Ｌ／分の速度の１００％の酸素を用いて、加熱した３７℃のイソフルランチャンバーに５分間入れた。マウスが意識不明になったら（約５分）、マウスを加熱パッドの上に置いて体温を維持し、鼻当てを介して麻酔を維持した。ブプレノルフィン－ＳＲ／ＥＲ（１ｍｇ／ｍＬ）を、鎮痛のために１ｍｇ／ｋｇで皮下投与した。ポビドンガーゼを使用して尾の先端を拭き、続いてアルコールパッドで拭いた。これを、毎回新しいポビドンパッド及びアルコールパッドを使用して更に２回繰り返した。定規又はキャリパーを使用して先端から２ｍｍ及び／又は直径１ｍｍを測定し、滅菌外科用メスの刃を使用して尾を切断した。マウスを直ちに温度制御（３７℃）されたミニインキュベーターに移し、マウスの鼻をイソフルランノーズコーンに入れ、尾の先端を５ｍＬの生理食塩水に入れた（尾の先端から１ｃｍの深さ）。血流を最初の止血までの時間について厳密にモニタリングした。最初の止血時間までの時間は、尾を切断した後１分間、再出血を伴わない出血時間を指す。総出血時間は、初期の出血時間に尾切断後１０分間の任意の追加の再出血時間を加えた合計を指す。血流を再出血について１０分間まで連続してモニタリングし、全ての再出血時間を記録した。１０分後、マウスをミニインキュベーターから取り出し、尾の先端を滅菌したゲージパッドで押して出血が完全に停止したことを確認した。必要に応じて、Ｃｌｏｔｉｓｏｌ（血餅懸濁液）を尾切断部位に適用した。生理食塩水（０．５ｍＬの０．９％の生理食塩水）を皮下注射し、動物をそのケージに戻し、麻酔から完全に回復するまでモニタリングした。各群についての総出血時間を図１６に示す。図１６に示すように、ＲＥＧＶ１３１－ＬＮＰＦ９治療は、４週目に止血能力のレスキューをもたらした。

【０７６４】

活性化部分トロンボプラスチン時間（ａＰＴＴ）を、６週目に希釈していない血漿中で評価した。図１７に示すように、ＡＬＢ^{hu}／^{hu}／Ｆ９$^{－}$／$^{－}$マウスにおけるＲＥＧＶ１３１－ＬＮＰＦ９治療は、ａＰＴＴをＡＬＢ^{hu}／^{hu}／Ｆ９$^{＋}$／$^{＋}$マウスで観察された値に正常化した。

【０７６５】

次いで、ヒトＦＩＸ活性を、エラグ酸又はＳｙｎｔｈＡｓｉｌによる臨床一段階凝血／ａＰＴＴアッセイを使用して評価した。ＡＬＢ^{hu}／^{hu}／Ｆ９$^{－}$／$^{－}$マウス血漿中にスパイクされた精製ヒトＦＩＸタンパク質（ＥＲＬ　ＨＦＩＸ　１００９、ロット４９４０から）の同じ調製物からの標準／較正物質血漿を、ＫＯマウス血漿中の１．２５ＩＵ／ｍＬ～０ＩＵ／ｍＬのヒトＦＩＸからの標準曲線を調製するために使用した。Ｆ９$^{－}$／$^{－}$マウス血漿中のｈＦＩＸタンパク質の濃度を、挿入研究から選択されたマウス血漿サンプルと同じ濃度まで一致させることによって、対照血漿サンプルを生成した。研究標準／較正物質及び対照サンプルの調製後、全ての研究血漿サンプルを、ヒトＦＩＸ欠乏血漿（ＰｒｅｃｉｓｉｏｎＢｉｏＬｏｇｉｃ、カタログ番号ＦＤＰ０９－１５から購入した）で１０倍希釈した。次いで、ボールをキュベットストリップ中の各キュベットに分配した。Ｓｔａｒｔ４　Ｈｅｍｏｓｔａｓｉｓ分析器（Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃａ　Ｓｔａｇｏ、Ｍａｎｕａｌ　Ｒｅｆ　０９３１０７９Ａ）上のインキュベーション領域にキュベットストリップを置き、機械を３７℃で予熱した。希釈した血漿サンプルを、Ｓｔａｒｔ４　Ｈｅｍｏｓｔａｓｉｓ分析器のキュベットに添加し（５０μＬ／キュベットを２連で）、試験キュベットを３７℃で３分間インキュベートした。エラグ酸（ＡＰＴＴ－ＸＬ　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号９５０５９－８０４）又はＳｙｎｔｈＡｓｉｌ（ＨｅｍｏｓＩＬ、ＡＰＴＴ凍結乾燥シリカ－０００８４６８７１０）を添加し（５０μＬ／キュベット）、３７℃で５分間インキュベートした。試験カラム上で、ピペット制御キーを作動させ（ボールがキュベット内で前後に動き始める）、予熱した５０μＬの０．０２５ＭのＣａＣｌ$_2$を各キュベットに分配した。凝血が形成されると、ボールが止まり、凝血時間が記録される。データ分析は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　８ソフトウェアにより、非線形最良曲線適合を使用して標準曲線から補間データを得た。図１８に示すように、マウス生成ヒトＦＩＸは、一段階凝血／ａＰＴＴアッセイにおいて精製ヒトＦＩＸと

同様の特異的活性を示した。

【０７６６】

次いで、ヒトＦＩＸ活性を、Ａｎｉａｒａ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃａによる臨床二段階発色基質アッセイキットを使用して評価した。ＡＬＢ^{hu}／^{hu}／Ｆ９$^{-}$／$^{-}$マウス血漿中にスパイクされた精製ヒトＦＩＸタンパク質（ＥＲＬ　ＨＦＩＸ　１００９、ロット４９４０から）の同じ調製物からの標準／較正物質血漿を、ＫＯマウス血漿中の１．２５ＩＵ／ｍＬ～０ＩＵ／ｍＬのヒトＦＩＸからの標準曲線を調製するために使用した。Ｆ９$^{-}$／$^{-}$マウス血漿中のｈＦＩＸタンパク質の濃度を、挿入研究から選択されたマウス血漿サンプルと同じ濃度まで一致させることによって、対照血漿サンプルを生成した。研究標準／較正物質及び対照サンプルの調製後、全ての研究血漿サンプルをＲ４緩衝液で希釈して１００倍希釈し、２５μＬ／ウェルを９６ウェルアッセイプレートに２連で添加した。次に、２５μＬ／ウェルのＲ１試薬を上記アッセイプレートに添加し、３７℃で５分間インキュベートし、２５μＬ／ウェルのＲ２試薬（３７℃で予熱）を添加し、プレートを３７℃で８分間インキュベートし、２５μＬ／ウェルのＲ３試薬を添加し、アッセイプレートを３７℃で３～５分間インキュベートし、２５μＬ／ウェルの２０％の酢酸（停止溶液）を添加し、４０５ｎｍでの吸光度をＳｏｆｔＭａｘ７．２によるＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅマイクロプレートリーダーにおいて読み取った。データ分析は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　８ソフトウェアにより、非線形最良曲線適合を使用して標準曲線から補間データを得た。

【０７６７】

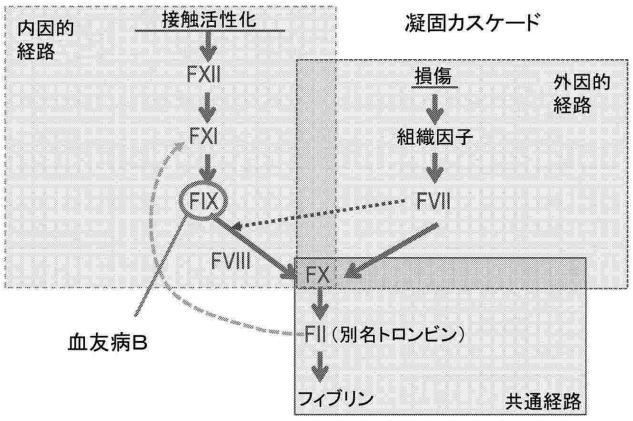
次いで、別の実験において、ヒトＦＩＸ活性を、Ｒｏｓｓｉｘによる臨床二段階発色基質アッセイキットを使用して評価した。ＡＬＢ^{hu}／^{hu}／Ｆ９$^{-}$／$^{-}$マウス血漿中にスパイクされた精製ヒトＦＩＸタンパク質（ＥＲＬ　ＨＦＩＸ　１００９、ロット４９４０から）の同じ調製物からの標準／較正物質血漿を、ＫＯマウス血漿中の１．２５ＩＵ／ｍＬ～０ＩＵ／ｍＬのヒトＦＩＸからの標準曲線を調製するために使用した。Ｆ９$^{-}$／$^{-}$マウス血漿中のｈＦＩＸタンパク質の濃度を、挿入研究から選択されたマウス血漿サンプルと同じ濃度まで一致させることによって、対照血漿サンプルを生成した。研究標準／較正物質及び対照サンプルの調製後、全ての研究血漿サンプルを希釈剤緩衝液で８０倍希釈し、１３μＬ／ウェルを９６ウェルアッセイプレートに２連で添加した。次に、１３μＬ／ウェルの試薬Ａを上記アッセイプレートに添加し、３７℃で５分間インキュベートし、７５μＬ／ウェルの試薬Ｂ（３７℃で予熱した試薬）を添加し、プレートを３７℃で８分間インキュベートし（活性化のため）、２５μＬ／ウェルのＦＸａ基質を添加し、アッセイプレートを３７℃で３分間インキュベートし、２５μＬ／ウェルの２０％の酢酸（停止溶液）を添加し、４０５ｎｍでの吸光度をＳｏｆｔＭａｘ７．２によるＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅマイクロプレートリーダーにおいて読み取った。データ分析は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　８ソフトウェアにより、非線形最良曲線適合を使用して標準曲線から補間データを得た。図１９に示すように、マウス生成ヒトＦＩＸは、Ａｎｉａｒａ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃａによる臨床二段階発色基質アッセイキット及びＲｏｓｓｉｘによる臨床二段階発色基質アッセイキットの両方を使用して、二段階発色基質アッセイにおいて精製ヒトＦＩＸと同様の特異的活性を示した。

【０７６８】

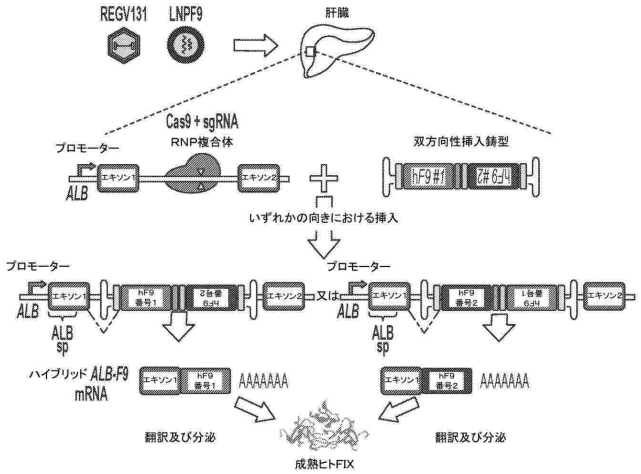
要約すると、用量依存性ｈＦＩＸ発現が、増加する濃度のＬＮＰ及びＡＡＶで観察され、発現は、６週間の観察にわたって持続していた。加えて、マウス生成ｈＦＩＸは、複数の機能的アッセイを使用して検証されるように、機能的に活性であった：それは、ａＰＴＴを正常に回復させ、精製ｈＦＩＸと同様の特異的活性を有し（ＯＳ及びＣＳ臨床アッセイを使用して確認された）、尾出血チャレンジ後に止血能力を回復させた。

【図面】

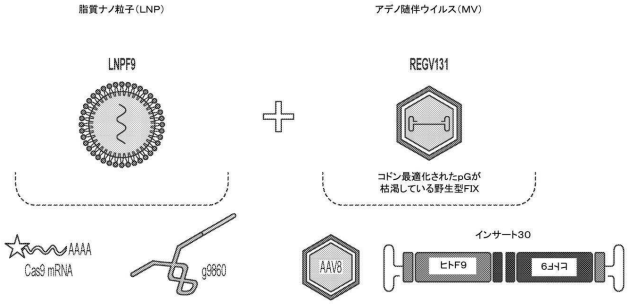
【図１】


内因的経路
接触活性化
FXII
FXI
FIX
FVIII
凝固カスケード
損傷
組織因子
FVII
外因的経路
FX
FII（別名トロンビン）
フィブリン
共通経路
血友病B

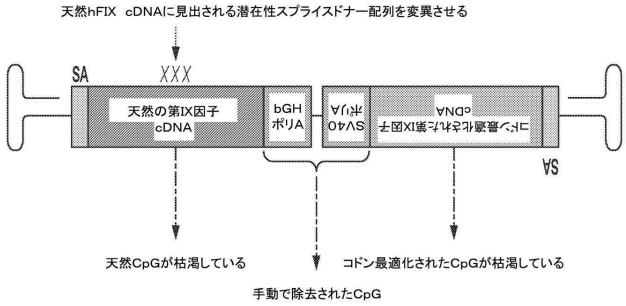
【図２】


REGV131
LNPF9
肝臓
Cas9 + sgRNA
RNP複合体
プロモーター
双方向性挿入鋳型
ALB
エキソン1
エキソン2
hF9 #1
hF9 #2
いずれかの向きにおける挿入
プロモーター
プロモーター
ALB
ALB sp
hF9 番号1
hF9 番号2
又は
ALB
ALB sp
ハイブリッド ALB-F9 mRNA
AAAAAAA
AAAAAAA
翻訳及び分泌
翻訳及び分泌
成熟ヒトFIX

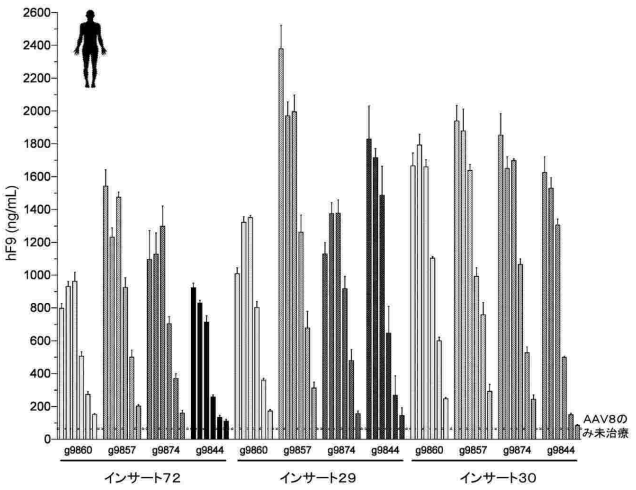
【図３】


脂質ナノ粒子（LNP）
アデノ随伴ウイルス（MV）
LNPF9
REGV131
コドン最適化されたpGが枯渇している野生型FIX
AAAA
Cas9 mRNA
g9660
AAV8
インサート30
ヒトF9
6.4kb

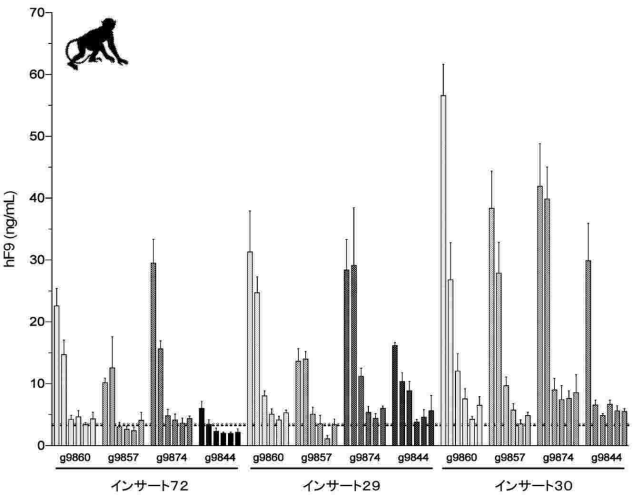
【図４】


天然hFIX cDNAに見出される潜在性スプライスドナー配列を変異させる
SA
XXX
天然の第IX因子 cDNA
bGH ポリA
SV40 ポリA
コドン最適化された第IX因子 cDNA
SA
天然CpGが枯渇している
コドン最適化されたCpGが枯渇している
手動で除去されたCpG

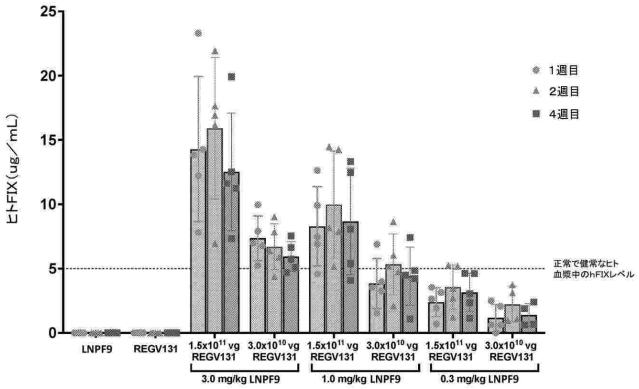
【図５】


hF9 (ng/mL)
AAV8のみ未治療
g9860 g9857 g9874 g9844
インサート72
インサート29
インサート30

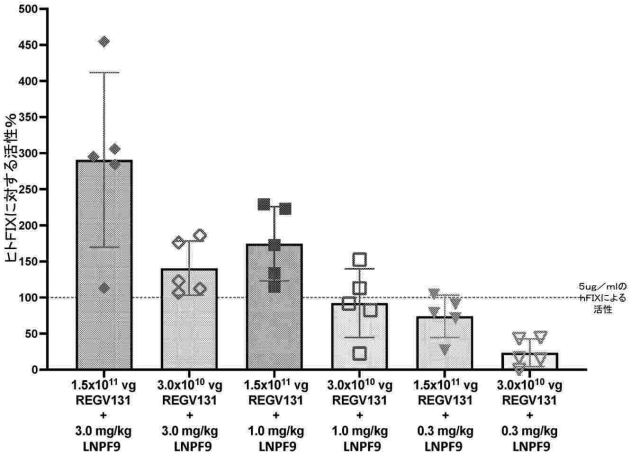
【図６】


hF9 (ng/mL)
g9860 g9857 g9874 g9844
インサート72
インサート29
インサート30

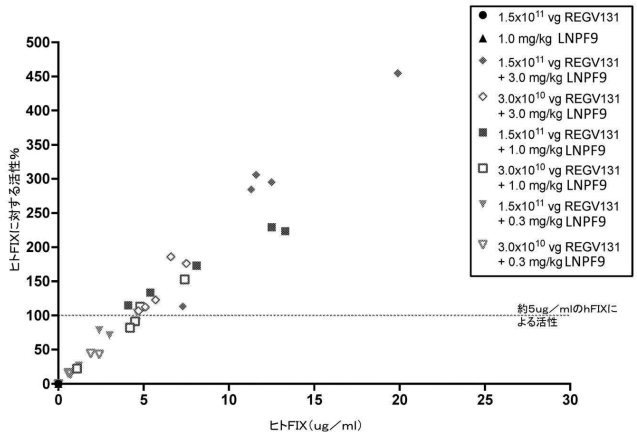
【図７】


ヒトFIX(ug／mL)
1週目
2週目
4週目
正常で健常なヒト血漿中のhFIXレベル
LNPF9
REGV131
1.5x10^11 vg REGV131
3.0x10^10 vg REGV131
3.0 mg/kg LNPF9
1.0 mg/kg LNPF9
0.3 mg/kg LNPF9

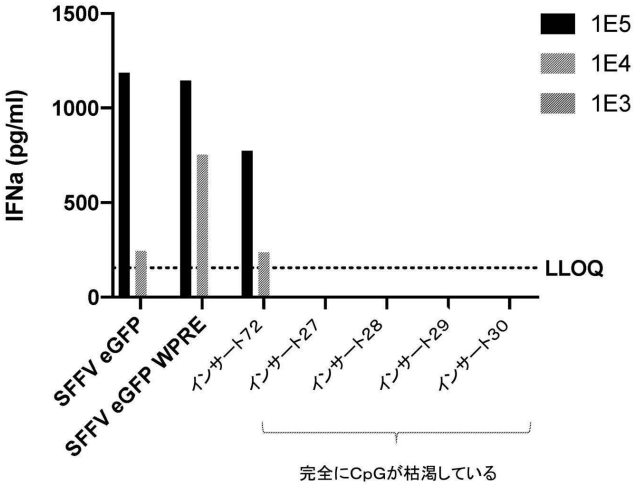
【図８Ａ】


ヒトFIXに対する活性%
5ug／mlのhFIXによる活性
1.5x10^11 vg REGV131 + 3.0 mg/kg LNPF9
3.0x10^10 vg REGV131 + 3.0 mg/kg LNPF9
1.5x10^11 vg REGV131 + 1.0 mg/kg LNPF9
3.0x10^10 vg REGV131 + 1.0 mg/kg LNPF9
1.5x10^11 vg REGV131 + 0.3 mg/kg LNPF9
3.0x10^10 vg REGV131 + 0.3 mg/kg LNPF9

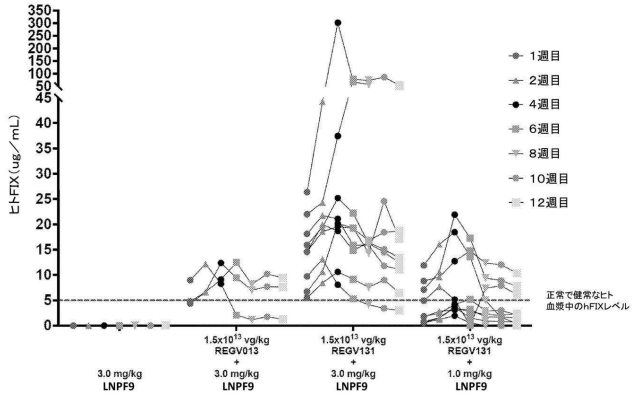
【図８Ｂ】



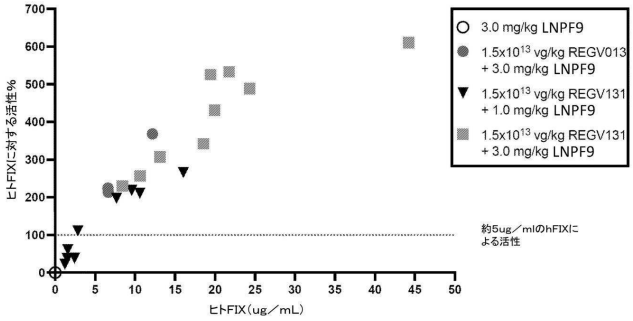
【図９】



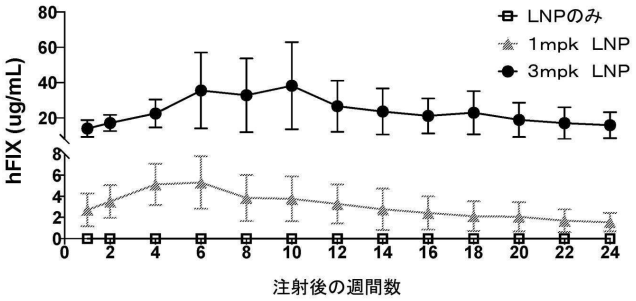
【図１０Ａ】



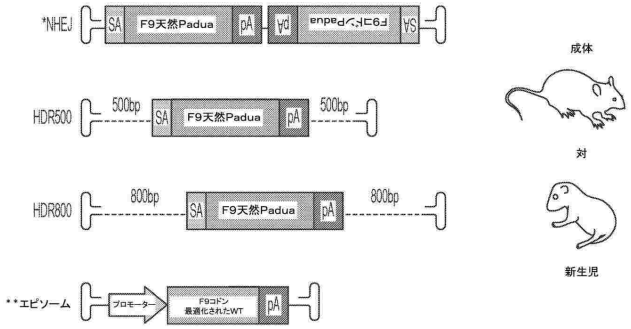
【図１０Ｂ】



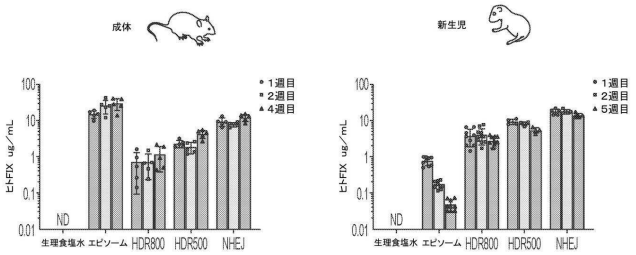
【図１０Ｃ】



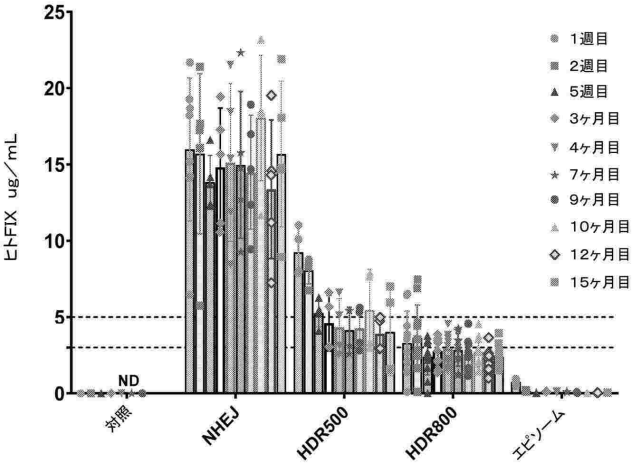
【図１１】



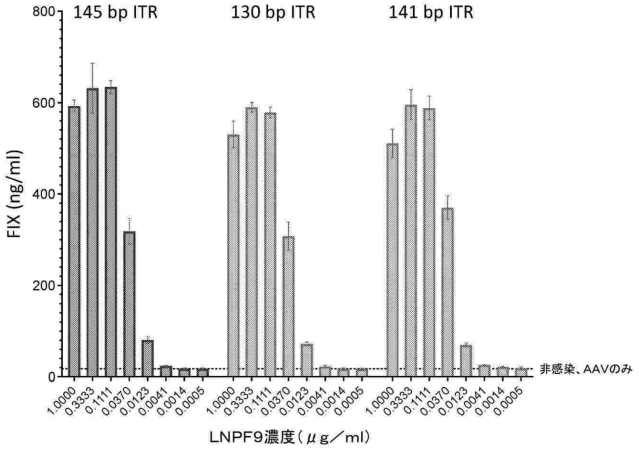
【図１２Ａ】



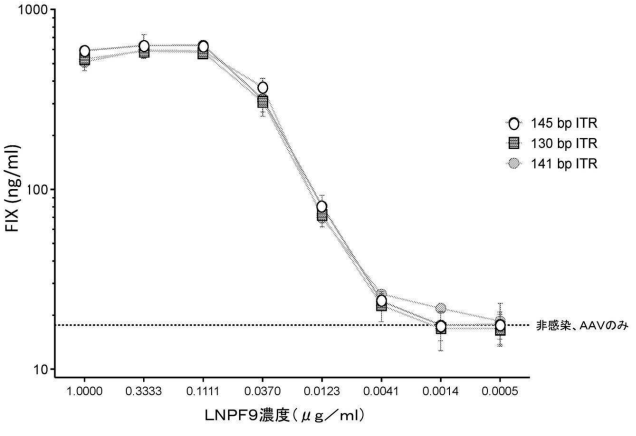
【図１２Ｂ】



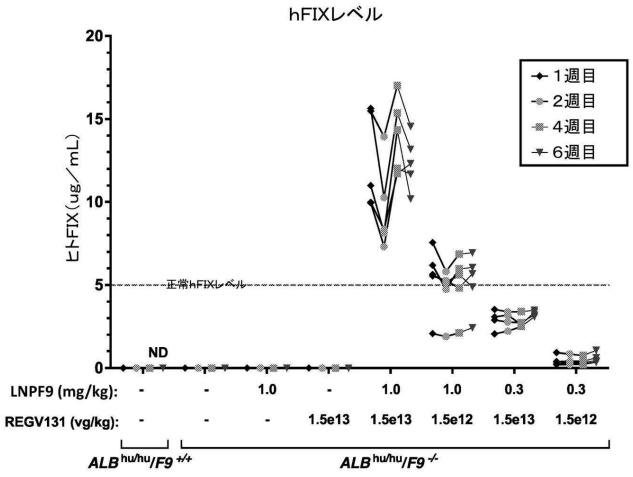
【図１３Ａ】



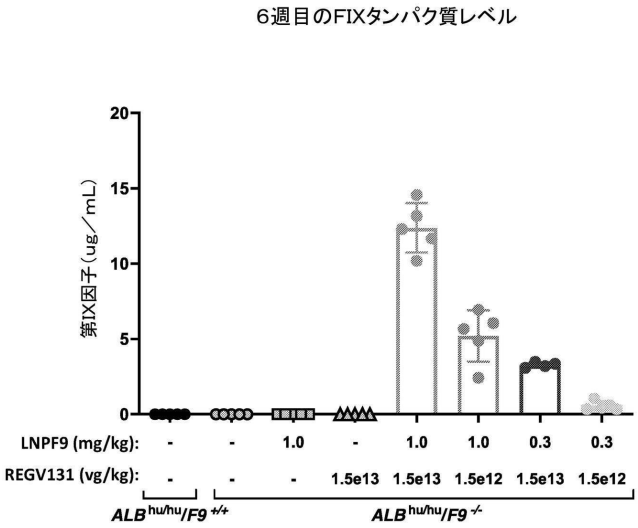
【図１３Ｂ】



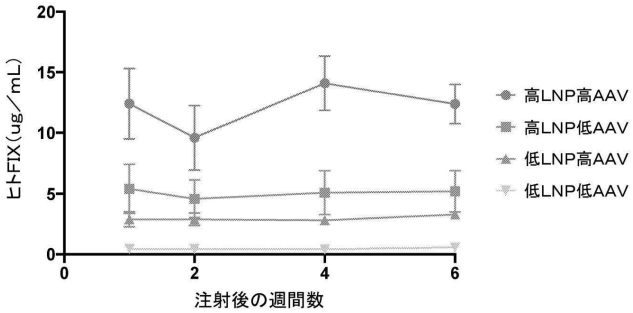
【図１４Ａ】



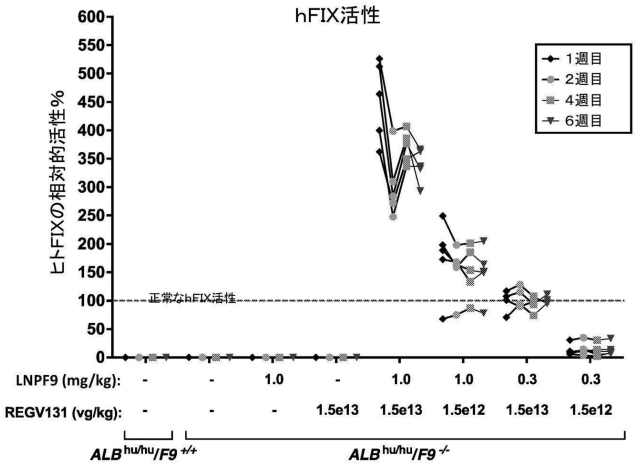
【図１４Ｂ】



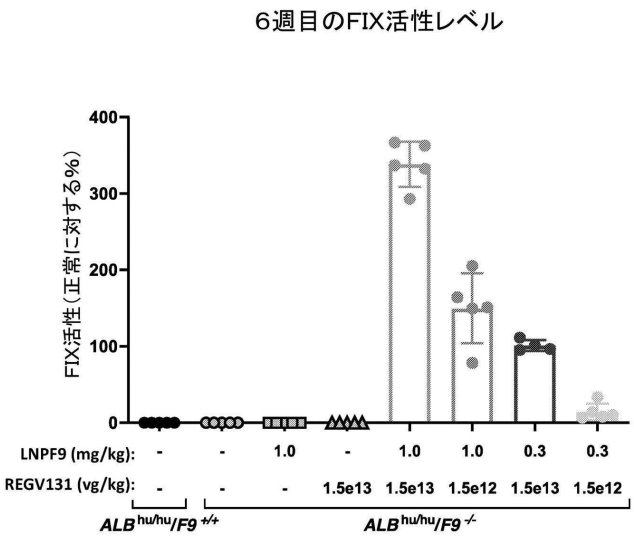
【図１４Ｃ】



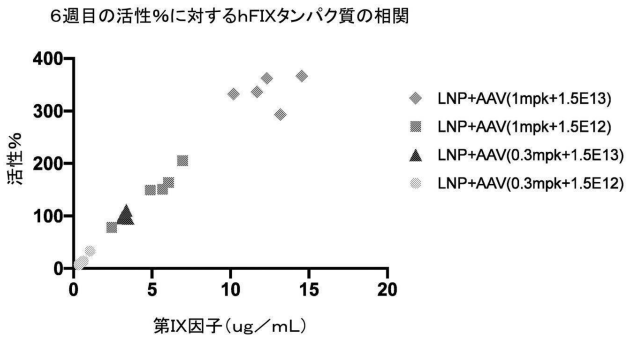
【図１５Ａ】



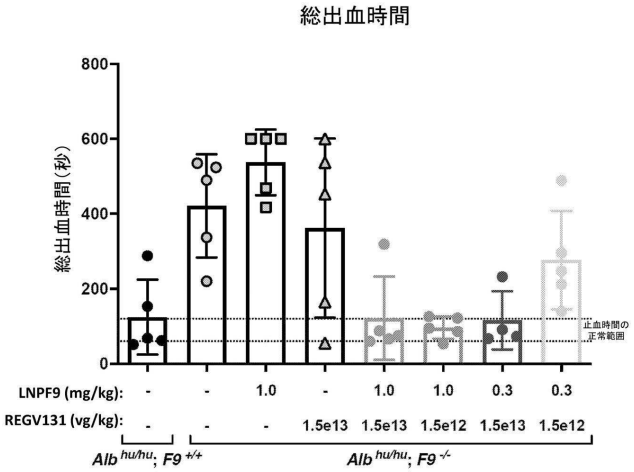
【図１５Ｂ】



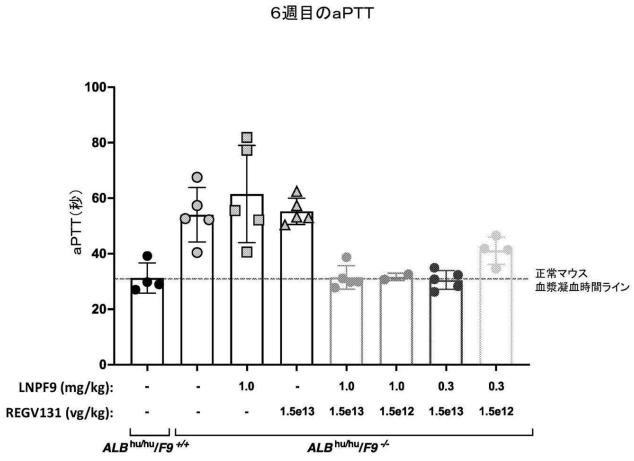
【図１５Ｃ】



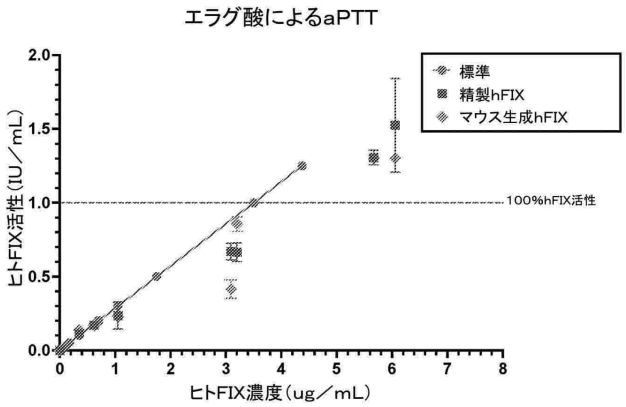
【図１６】

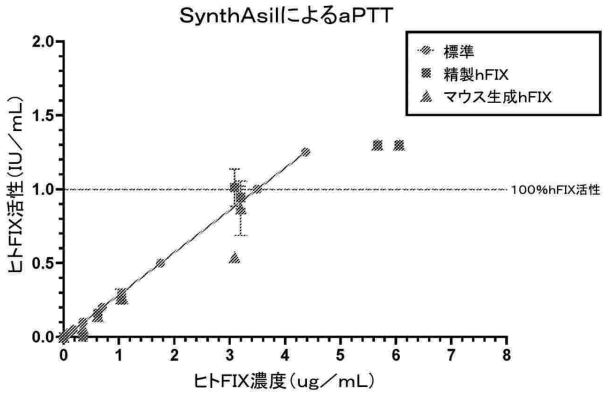


【図１７】

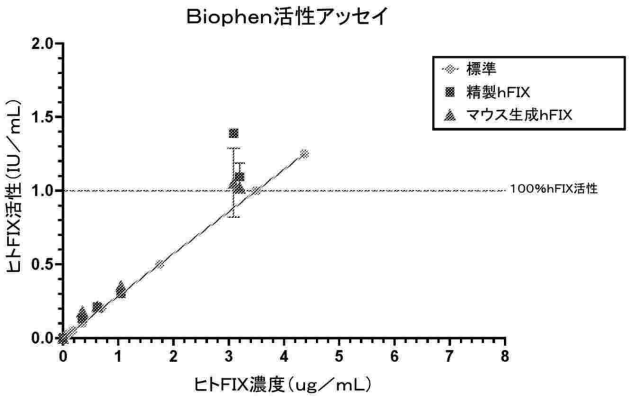


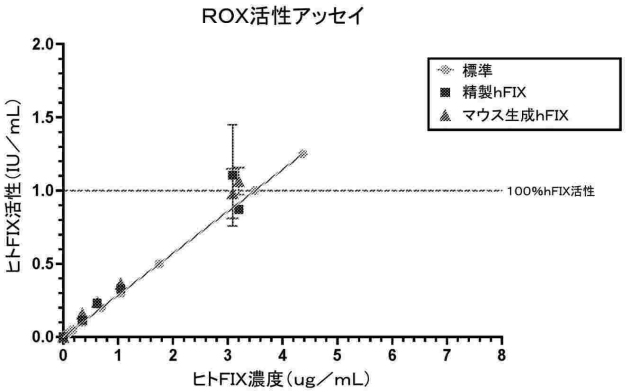
【図１８】





【図１９】





【配列表】

2024540085000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/078798

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/745 A61K38/36
ADD.

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)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2019/345208 A1 (MILLER JEFFREY C [US] ET AL) 14 November 2019 (2019-11-14) claims 1,7-11 paragraph [0049]; figure 6c	1-454
Y	WO 2016/210170 A1 (THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA [US]) 29 December 2016 (2016-12-29) paragraphs [0132] - [0136]; claims 1-4,71	1-454
Y	US 2021/128700 A1 (HORLING FRANZISKA [AT] ET AL) 6 May 2021 (2021-05-06) claims 36,39 paragraphs [0132] - [0133]	1-454

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] 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
14 April 2023	24/04/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Obel, Nicolai

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/078798

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2020/289628 A1 (FINN JOHN [US] ET AL) 17 September 2020 (2020-09-17) claims 2,11 paragraph [0172]; claim 43	1-454
Y	US 2020/246437 A1 (ROTTENSTEINER HANSPETER [AT] ET AL) 6 August 2020 (2020-08-06) claims 1-7 paragraph [0136]	1-454
Y	KR 2020 0014318 A (UNIV NORTH CAROLINA CHAPEL HILL [US]) 10 February 2020 (2020-02-10) examples 1-3	1-454
Y	WO 2020/039183 A1 (UCL BUSINESS PLC [GB]) 27 February 2020 (2020-02-27) page 67, line 17 - page 68, line 2; sequence 9 claims 17-22	1-454
A	WO 2020/187969 A1 (CSL BEHRING LENGNAU AG [CH]) 24 September 2020 (2020-09-24) page 21, lines 34-36	1-454

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/078798

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. [X] 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

International application No.
PCT/US2022/078798

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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:

1-454 (partially)

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 Application No. PCT/US2022/078798

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-454(partially)

Directed to factor IX variant of SEQ ID NO 166

---

2. claims: 1-454(partially)

Directed to factor IX variant of SEQ ID NO 164

---

3. claims: 1-454(partially)

Directed to factor IX variant of SEQ ID NO 165

---

4. claims: 1-454(partially)

Directed to factor IX variant of SEQ ID NO 167

---

5. claims: 1-454(partially)

Directed to factor IX variant of SEQ ID NO 168

---

6. claims: 1-454(partially)

Directed to factor IX variant of SEQ ID NO 169

---

7. claims: 1-454(partially)

Directed to factor IX variant of SEQ ID NO 170

---

8. claims: 1-454(partially)

Directed to factor IX variant of SEQ ID NO 171

---

9. claims: 1-454(partially)

Directed to factor IX variant of SEQ ID NO 159

---

10. claims: 1-454(partially)

Directed to factor IX variant of SEQ ID NO 160

---

11. claims: 1-454(partially)

International Application No. PCT/US2022/078798

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Directed to factor IX variant of SEQ ID NO 161

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/078798

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2019345208 A1	14-11-2019	AU 2014363991 A1	09-06-2016
		AU 2014364051 A1	09-06-2016
		AU 2020277091 A1	24-12-2020
		CA 2931637 A1	18-06-2015
		CA 2931848 A1	18-06-2015
		CN 105874071 A	17-08-2016
		CN 105940013 A	14-09-2016
		CN 111330021 A	26-06-2020
		DK 3080274 T3	31-08-2020
		EP 3080143 A1	19-10-2016
		EP 3080274 A2	19-10-2016
		EP 3757116 A1	30-12-2020
		ES 2813367 T3	23-03-2021
		HK 1225754 A1	15-09-2017
		HU E051628 T2	01-03-2021
		IL 277196 A	29-10-2020
		JP 6535684 B2	26-06-2019
		JP 6642943 B2	12-02-2020
		JP 2017500061 A	05-01-2017
		JP 2017504354 A	09-02-2017
		JP 2019037254 A	14-03-2019
		US 2015159172 A1	11-06-2015
		US 2015166618 A1	18-06-2015
		US 2017342118 A1	30-11-2017
		US 2018362601 A1	20-12-2018
		US 2019345208 A1	14-11-2019
		US 2021188926 A1	24-06-2021
		WO 2015089046 A1	18-06-2015
		WO 2015089077 A2	18-06-2015
WO 2016210170 A1	29-12-2016	AU 2016282781 A1	18-01-2018
		AU 2022268345 A1	15-12-2022
		BR 112017027956 A2	28-08-2018
		CA 2990193 A1	29-12-2016
		CN 108138159 A	08-06-2018
		CO 2018000134 A2	21-05-2018
		EP 3313991 A1	02-05-2018
		HK 1252351 A1	24-05-2019
		IL 256517 A	28-02-2018
		JP 6831779 B2	17-02-2021
		JP 2018522529 A	16-08-2018
		JP 2021087431 A	10-06-2021
		KR 20180048580 A	10-05-2018
		KR 20200128215 A	11-11-2020
		PE 20180675 A1	19-04-2018
		PH 12017502424 A1	09-07-2018
		RU 2018102242 A	25-07-2019
		SA 517390590 B1	10-02-2022
		SG 10202100131W A	25-02-2021
		US 2016375110 A1	29-12-2016
		US 2020129598 A1	30-04-2020
		US 2021008179 A1	14-01-2021
		US 2021330763 A1	28-10-2021
		WO 2016210170 A1	29-12-2016
US 2021128700 A1	06-05-2021	AR 112057 A1	18-09-2019
		AU 2018272831 A1	28-11-2019
		BR 112019024256 A2	09-06-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/078798

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CA 3064730 A1	29-11-2018
		CL 2019003395 A1	17-04-2020
		CL 2020002445 A1	28-12-2020
		CN 110945127 A	31-03-2020
		CO 2019012885 A2	17-01-2020
		EP 3630974 A1	08-04-2020
		IL 280637 A	25-03-2021
		JP 6961171 B2	05-11-2021
		JP 2020520662 A	16-07-2020
		KR 20200010443 A	30-01-2020
		KR 20220050238 A	22-04-2022
		TW 201900184 A	01-01-2019
		US 2018339026 A1	29-11-2018
		US 2021128700 A1	06-05-2021
		WO 2018217731 A1	29-11-2018
		ZA 201907716 B	29-06-2022
US 2020289628 A1	17-09-2020	AU 2019360270 A1	27-05-2021
		BR 112021007301 A2	27-07-2021
		CA 3116331 A1	23-04-2020
		CN 113260701 A	13-08-2021
		CO 2021006365 A2	19-08-2021
		EP 3867380 A2	25-08-2021
		IL 282238 A	31-05-2021
		JP 2022512731 A	07-02-2022
		KR 20210102881 A	20-08-2021
		PH 12021550846 A1	06-12-2021
		SG 11202103734P A	28-05-2021
		TW 202027799 A	01-08-2020
		US 2020289628 A1	17-09-2020
		WO 2020082046 A2	23-04-2020
US 2020246437 A1	06-08-2020	AR 117980 A1	08-09-2021
		TW 202045534 A	16-12-2020
		US 2020246437 A1	06-08-2020
		WO 2020160303 A1	06-08-2020
KR 20200014318 A	10-02-2020	AU 2018275549 A1	21-11-2019
		CA 3064450 A1	06-12-2018
		CN 108977452 A	11-12-2018
		CN 114875051 A	09-08-2022
		EP 3630978 A1	08-04-2020
		JP 7119009 B2	16-08-2022
		JP 2020522259 A	30-07-2020
		JP 2022159358 A	17-10-2022
		KR 20200014318 A	10-02-2020
		US 2020087646 A1	19-03-2020
		US 2023091502 A1	23-03-2023
		WO 2018222792 A1	06-12-2018
WO 2020039183 A1	27-02-2020	AU 2019323747 A1	04-03-2021
		BR 112021002998 A2	11-05-2021
		CA 3109579 A1	27-02-2020
		CN 112739818 A	30-04-2021
		EP 3810770 A1	28-04-2021
		IL 280973 A	29-04-2021
		JP 2021533799 A	09-12-2021
		KR 20210049129 A	04-05-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/078798

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		SG 11202101560Q A	30-03-2021
		WO 2020039183 A1	27-02-2020
WO 2020187969 A1	24-09-2020	AU 2020242945 A1	14-10-2021
		CA 3131648 A1	24-09-2020
		CN 113573726 A	29-10-2021
		EP 3941509 A1	26-01-2022
		JP 2022525660 A	18-05-2022
		KR 20210141608 A	23-11-2021
		US 2022154161 A1	19-05-2022
		WO 2020187969 A1	24-09-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	
Ｃ１２Ｎ	*15/67 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/67	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ａ６１Ｐ	*7/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/04		
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*9/51 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/51		
Ａ６１Ｋ	*47/18 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/18		
Ａ６１Ｋ	*47/24 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24		
Ａ６１Ｋ	*47/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28		
Ａ６１Ｋ	*47/10 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/10		
Ａ６１Ｋ	*35/407(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/407		
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		
Ｃ１２Ｎ	*5/071(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/071		

(32)優先日　令和4年7月29日(2022.7.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(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,CV,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,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本 健策
(72)発明者　サビン， リア
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１， タリータウン， オールド ソー ミル リバー ロード ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　カラツオス， クリストス
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１， タリータウン， オールド ソー ミル リバー ロード ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　ペファニス， エヴァンゲロス
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１， タリータウン， オールド ソー ミル リバー ロード ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　モーラー－タンク， スヴェン
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１， タリータウン， オールド ソー ミル リバー ロード ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　カタコウスキ， ジョゼフ
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１， タリータウン， オールド ソー ミル リバー ロード ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　バイク， アンドリュー
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１， タリータウン， オールド ソー ミル リバー ロード ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　シグナー， キャサリン
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１， タリータウン， オールド ソー ミル リバー ロード ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者　サマイ， ポウラミ
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１， タリータウン， オールド ソー ミル リバー ロー

ド ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 カラファティ， フィリップ
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１， タリータウン， オールド ソー ミル リバー ロード ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付

Ｆターム（参考） 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA31 CA44
4C076 AA65 AA95 BB11 CC29 DD49 DD63 DD70 EE23
4C084 AA13 MA21 MA55 NA14 ZA53
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA03 MA04 MA05 MA21 MA55 NA14 ZA53
4C087 AA01 AA02 BB65 CA12 MA21 MA55 NA14 ZA53