(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0099358
(43) 공개일자 2024년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/64 (2006.01) *A61K 38/48* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 7/04* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/86* (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/644 (2013.01)
A61K 38/4846 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7017650
(22) 출원일자(국제) 2022년10월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년05월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/078798
(87) 국제공개번호 WO 2023/077012
국제공개일자 2023년05월04일
(30) 우선권주장
63/272,324 2021년10월27일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
사빈, 레아
미국 뉴욕 10591 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
키랏수스, 크리스토스
미국 뉴욕 10591 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 광장리앤고

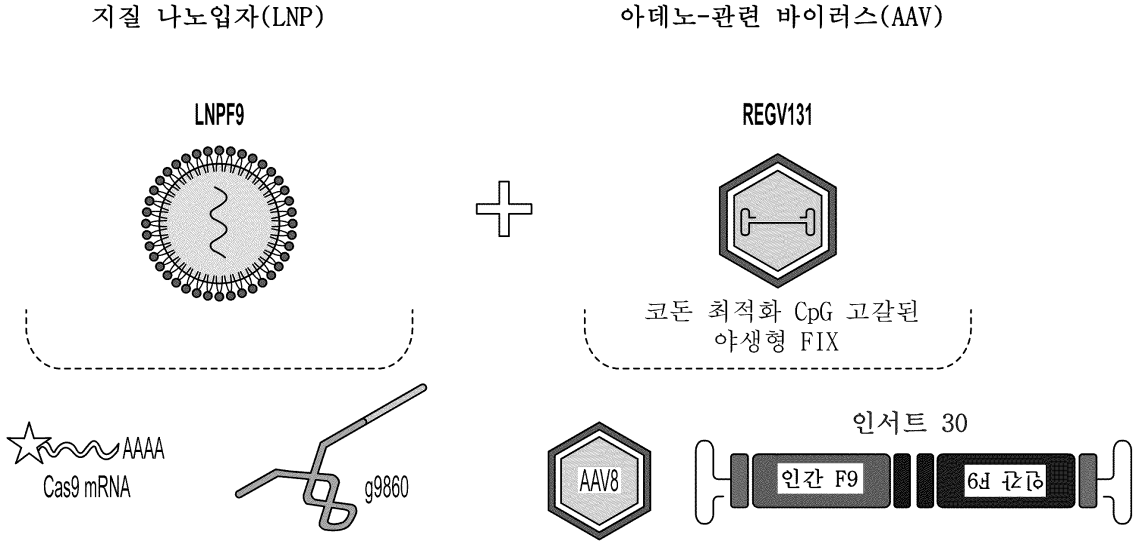
전체 청구항 수 : 총 454 항

(54) 발명의 명칭 **B형 혈우병 치료를 위한 인자 IX를 발현하기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

표적 게놈 유전자좌, 예컨대 내인성 *ALB* 유전자좌 내로의 FIX 코딩 서열의 삽입 및/또는 FIX 코딩 서열의 발현을 가능하게 하는 핵산 구조체 및 조성물이 제공된다. 핵산 구조체 및 조성물은 *F9* 핵산을 세포 내로 도입하는 방법, *F9* 핵산을 표적 게놈 유전자좌에 통합하는 방법, 세포 내 FIX의 발현 방법 및 대상체에서 B형 혈우병 또는 FIX 결핍을 치료하는 방법에 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
A61P 7/04 (2018.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 15/907 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12Y 304/21022 (2013.01)
C12N 2320/52 (2013.01)
C12N 2800/22 (2013.01)

(72) 발명자
페파니스, 에반젤로스
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
몰러-탱크, 스벤
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
카타코우스키, 조셉
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
백, 앤드류
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
시그나, 캐서린
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
사마이, 폴라미
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
칼라파티, 필립
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

(30) 우선권주장
63/306,037 2022년02월02일 미국(US)
63/369,864 2022년07월29일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 또는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 핵산 구조체를 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은

(I) 서열번호 166, 165, 164, 및 167 내지 171 중 임의의 하나와 적어도 95% 동일하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 CpG-고갈되고, 코돈-최적화되고, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(II) 서열번호 159, 160 및 161 중 임의의 하나와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은

(I) 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나;

(II) 서열번호 165와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(III) 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은

(I) 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(II) 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈되는, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩하는, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166, 165, 또는 159를 포함하는, 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166, 165, 또는 159로 이루어지는, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166 또는 159를 포함하는, 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166 또는 159로 이루어지는, 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어지는, 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어지는, 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 상류에 스플라이스 수용체를 포함하는, 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함하는, 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 상류에 스플라이스 수용체를 포함하고, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함하는, 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하는, 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않는, 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 양방향 구조체인, 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하거나, 여기서 상기 핵산 구조체는 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는, 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 인자 IX 단백질 서열을 인코딩하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 조성물.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서,

(I) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고;

(II) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 95% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 조성물.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

(I) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고;

(II) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 조성물.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈되고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈된, 조성물.

청구항 30

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%

동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 조성물.

청구항 31

제25항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩하는, 조성물.

청구항 32

제25항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

(I) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고;

(II) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 조성물.

청구항 33

제25항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

(I) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어지고;

(II) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어지는, 조성물.

청구항 34

제24항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하거나, 또는 여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하는, 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 인자 IX 단백질 서열을 인코딩하며, 여기서 상기 제1 폴리아데닐화 신호 및 상기 제2 폴리아데닐화 신호는 상이한, 조성물.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 조성물.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 180 또는 이의 역

보체를 포함하는, 조성물.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA 또는 이중 가닥 DNA인, 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA인, 조성물.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 핵산 벡터 또는 지질 나노입자 내에 있는, 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 핵산 벡터에 있고, 임의로 여기서 상기 핵산 벡터는 바이러스 벡터인, 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 핵산 벡터는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터이며,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 단일 가닥 AAV(ssAAV) 벡터인, 조성물.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 AAV8 벡터, AAV3B 벡터, AAV5 벡터, AAV6 벡터, AAV7 벡터, AAV9 벡터, AAVrh.74 벡터, 또는 AAVhu.37 벡터로부터 유래되는, 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 재조합 AAV8(rAAV8) 벡터인, 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 단일 가닥 rAAV8 벡터인, 조성물.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 조성물.

청구항 48

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 일방향 구조체인, 조성물.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고,

여기서 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고;

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 조성물.

청구항 51

제49항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 조성물.

청구항 52

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA 또는 이중 가닥 DNA인, 조성물.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA인, 조성물.

청구항 54

제48항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 핵산 벡터 또는 지질 나노입자 내에 있는, 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 핵산 벡터 내에 있는, 조성물.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 핵산 벡터는 바이러스 벡터인, 조성물.

청구항 57

제55항 또는 제56항에 있어서, 상기 핵산 벡터는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터이며,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적

어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 조성물.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 단일 가닥 AAV(ssAAV) 벡터인, 조성물.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 AAV8 벡터, AAV3B 벡터, AAV5 벡터, AAV6 벡터, AAV7 벡터, AAV9 벡터, AAVrh.74 벡터, 또는 AAVhu.37 벡터로부터 유래되는, 조성물.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 재조합 AAV8(rAAV8) 벡터인, 조성물.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 단일 가닥 rAAV8 벡터인, 조성물.

청구항 62

제48항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고,

여기서 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고,

상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 조성물.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 조성물.

청구항 64

제62항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 조성물.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 유전자 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하는 뉴클레아제 작용제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 표적 유전자는 *알부민* 유전자이며, 임의로 여기서 상기 *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유

전자인, 조성물.

청구항 67

제65항 또는 제66항에 있어서, 상기 뉴클레아제 작용제는

(a) 아연 집게 뉴클레아제(ZFN);

(b) 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN); 또는

(c) (i) Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산; 및

(ii) 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함하며, 여기서 상기 가이드 RNA는 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 DNA-표적화 세그먼트를 포함하고, 여기서 상기 가이드 RNA는 상기 Cas 단백질에 결합하고 상기 Cas 단백질을 상기 가이드 RNA 표적 서열로 표적화하는, 조성물.

청구항 68

제65항에 있어서, 상기 뉴클레아제 작용제는

(a) Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산; 및

(b) 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함하며, 여기서 상기 가이드 RNA는 *알부민* 유전자의 인트론 1 내 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 DNA-표적화 세그먼트를 포함하고, 여기서 상기 가이드 RNA는 상기 Cas 단백질에 결합하고 상기 Cas 단백질을 상기 가이드 RNA 표적 서열로 표적화하는, 조성물.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자인, 조성물.

청구항 70

제68항 또는 제69항에 있어서,

(I) 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 어느 하나에 기재된 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하며, 임의로 여기서 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 어느 하나에 기재된 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고/하거나;

(II) 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 어느 하나에 기재된 서열과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일하며, 임의로 여기서 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 어느 하나에 기재된 서열과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한, 조성물.

청구항 71

제68항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나를 포함하고, 임의로 여기서 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나를 포함하는, 조성물.

청구항 72

제68항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나로 이루어지며, 임의로 여기서 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나로 이루어지는, 조성물.

청구항 73

제68항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 62 내지 서열번호 125 중 어느 하나를 포함하며, 임의로 여기서 상기 가이드 RNA는 서열번호 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, 및 105 중 임의의 하나를 포함하는, 조성물.

청구항 74

제68항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서,

(I) 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고/하거나;

(II) 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한, 조성물.

청구항 75

제68항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36을 포함하는, 조성물.

청구항 76

제68항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36으로 이루어지는, 조성물.

청구항 77

제68항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하는, 조성물.

청구항 78

제68항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 RNA 형태의 상기 가이드 RNA를 포함하는, 조성물.

청구항 79

제68항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 적어도 하나의 변형을 포함하는, 조성물.

청구항 80

제79항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 조성물.

청구항 81

제79항 또는 제80항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함하는, 조성물.

청구항 82

제79항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 5개의 뉴클레오티드 중 하나 이상에 변형을 포함하는, 조성물.

청구항 83

제79항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 5개의 뉴클레오티드 중 하나 이상에 변형을 포함하는, 조성물.

청구항 84

제79항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함하는, 조성물.

청구항 85

제79항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함하는, 조성물.

청구항 86

제79항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처

음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 조성물.

청구항 87

제79항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 조성물.

청구항 88

제79항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 (i) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 조성물.

청구항 89

제68항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)인, 조성물.

청구항 90

제68항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 RNA 형태의 상기 가이드 RNA를 포함하고, 상기 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 상기 가이드 RNA는 (i) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 조성물.

청구항 91

제68항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질인, 조성물.

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 *스트렙토콕커스 피오게네스* Cas9 단백질로부터 유래되는, 조성물.

청구항 93

제68항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 서열번호 11로 기재된 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 94

제68항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산은 포유류 세포 또는 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되는, 조성물.

청구항 95

제68항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산을 포함하고, 여기서 상기 핵산은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는, 조성물.

청구항 96

제95항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 적어도 하나의 변형을 포함하는, 조성물.

청구항 97

제95항 또는 제96항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 변형된 우리딘을 하나 이상의 또는 모든 우리딘 위치에 포함하도록 변형되는, 조성물.

청구항 98

제97항에 있어서, 상기 변형된 우리딘은 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘인, 조성물.

청구항 99

제97항 또는 제98항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되는, 조성물.

청구항 100

제95항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 5' 캡을 포함하는, 조성물.

청구항 101

제95항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 폴리(A) 테일을 포함하는, 조성물.

청구항 102

제95항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12로 기재된 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 103

제68항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산을 포함하며, 여기서 상기 핵산은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하는, 조성물.

청구항 104

제68항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 RNA 형태의 상기 가이드 RNA를 포함하고, 상기 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며,

여기서 상기 조성물은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산을 포함하고, 여기서 상기 핵산은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 서열번호 226, 225 또는 12에 기재된 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 105

제68항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 RNA 형태의 상기 가이드 RNA를 포함하고, 상기 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 상기 가이드 RNA는 (i) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며,

여기서 상기 조성물은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산을 포함하고, 상기 핵산은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하는, 조성물.

청구항 106

제104항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의

역보체를 포함하는 양방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 조성물.

청구항 107

제104항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고,

여기서 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 조성물.

청구항 108

제107항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 조성물.

청구항 109

제107항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 조성물.

청구항 110

제105항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 조성물.

청구항 111

제105항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고,

여기서 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 조성물.

청구항 112

제111항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 조성물.

청구항 113

제111항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 조성물.

청구항 114

제68항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질과 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 상기 핵산 또는 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA는 지질 나노입자와 관련이 있는, 조성물.

청구항 115

제114항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 양이온성 지질, 중성 지질, 헬퍼 지질, 및 스텔스 지질을 포함하는, 조성물.

청구항 116

제115항에 있어서, 상기 양이온성 지질은 지질 A인, 조성물.

청구항 117

제115항 또는 제116항에 있어서, 상기 중성 지질은 DSPC인, 조성물.

청구항 118

제115항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 헬퍼 지질은 콜레스테롤인, 조성물.

청구항 119

제115항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 스텔스 지질은 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000(PEG2k-DMG)인, 조성물.

청구항 120

제115항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양이온성 지질은 지질 A이고, 상기 중성 지질은 DSPC이고, 상기 헬퍼 지질은 콜레스테롤이고, 상기 스텔스 지질은 PEG2k-DMG인, 조성물.

청구항 121

제115항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 하기 몰비: 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG로 4개의 지질을 포함하는, 조성물.

청구항 122

제68항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며,

여기서 상기 조성물은 RNA 형태의 상기 가이드 RNA를 포함하고, 상기 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하고,

여기서 상기 조성물은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산을 포함하고, 여기서 상기 핵산은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 서열번호 226, 225 또는 12에 기재된 서열을 포함하고,

여기서 상기 가이드 RNA 및 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있는, 조성물.

청구항 123

제68항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며,

여기서 상기 조성물은 RNA 형태의 상기 가이드 RNA를 포함하고, 상기 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 상기 가이드 RNA는 (i) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하고,

여기서 상기 조성물은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산을 포함하고, 상기 핵산은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하고,

여기서 상기 가이드 RNA 및 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있는, 조성물.

청구항 124

제122항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 조성물.

청구항 125

제122항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고,

여기서 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고,

상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적

어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 조성물.

청구항 126

제125항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 조성물.

청구항 127

제125항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 조성물.

청구항 128

제123항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 조성물.

청구항 129

제123항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고,

여기서 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고,

상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 조성물.

청구항 130

제129항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 조성물.

청구항 131

제129항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 조성물.

청구항 132

제1항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, *인자 9* 핵산을 세포 내에 도입하는 방법, *인자 9* 핵산 구조체를 세포 내 표적 유전자에 통합하는 방법, 또는 세포에서 인자 IX를 발현하는 방법에 사용하기 위한 조성물.

청구항 133

제132항에 있어서, 상기 세포는 신생아 세포인, 조성물.

청구항 134

제133항에 있어서, 상기 신생아 세포는 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래되는, 조성물.

청구항 135

제133항에 있어서, 상기 신생아 세포는 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래되는, 조성물.

청구항 136

제133항에 있어서, 상기 신생아 세포는 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래되는, 조성물.

청구항 137

제133항에 있어서, 상기 신생아 세포는 출생 후 4주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래되는, 조성물.

청구항 138

제132항에 있어서, 상기 세포는 신생아 세포가 아닌, 조성물.

청구항 139

제1항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 인자 IX 결핍을 치료하는 방법에 사용하기 위한 조성물.

청구항 140

제1항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 B형 혈우병을 치료하는 방법에 사용하기 위한 조성물.

청구항 141

제139항 또는 제140항에 있어서, 상기 대상체는 신생아 대상체인, 조성물.

청구항 142

제141항에 있어서, 상기 신생아 대상체는 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체인, 조성물.

청구항 143

제141항에 있어서, 상기 신생아 대상체는 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체인, 조성물.

청구항 144

제141항에 있어서, 상기 신생아 대상체는 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체인, 조성물.

청구항 145

제141항에 있어서, 상기 신생아 대상체는 출생 후 4주 이내인 인간 신생아 대상체인, 조성물.

청구항 146

제139항 또는 제140항에 있어서, 상기 대상체는 신생아 대상체가 아닌, 조성물.

청구항 147

제1항 내지 제146항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 세포.

청구항 148

제147항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 내인성 표적 유전자 좌위에 통합되며, 여기서 인자 IX 단백질은 상기 내인성 표적 유전자 좌위로부터 발현되거나, 여기서 상기 핵산 구조체는 내인성 *알부민* 유전자좌의 인트론 1에 통합되고, 여기서 인자 IX 단백질은 상기 내인성 *알부민* 유전자좌로부터 발현되는, 세포.

청구항 149

제147항 또는 제148항에 있어서, 상기 세포는 인간 세포인, 세포.

청구항 150

제147항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 간 세포인, 세포.

청구항 151

제150항에 있어서, 상기 간 세포는 간세포인, 세포.

청구항 152

제147항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 신생아 세포인, 세포.

청구항 153

제152항에 있어서, 상기 신생아 세포는 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래되는, 세포.

청구항 154

제152항에 있어서, 상기 신생아 세포는 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래되는, 세포.

청구항 155

제152항에 있어서, 상기 신생아 세포는 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래되는, 세포.

청구항 156

제152항에 있어서, 상기 신생아 세포는 출생 후 4주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래되는, 세포.

청구항 157

제147항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 신생아 세포가 아닌, 세포.

청구항 158

제147항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 생체외 또는 시험관내에 존재하는, 세포.

청구항 159

제147항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 생체내에 존재하는, 세포.

청구항 160

인자 9 핵산을 상기 세포 내에 도입하는 방법으로서, 제1항 내지 제131항 중 어느 한 항의 조성물을 세포에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 161

인자 9 핵산 구조체를 세포 내 표적 유전자에 통합하는 방법으로서, 제65항 내지 제131항 중 어느 한 항의 조성물을 세포에 투여하는 단계를 포함하며,

여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 표적 유전자 내의 상기 뉴클레아제 표적 부위를 절단하여 절단 부위를 생성하고, 상기 핵산 구조체는 상기 절단 부위에 삽입되어 변형된 표적 유전자를 생성하고, 인자 IX 단백질이 변형된 표적 유전자로부터 발현되는, 방법.

청구항 162

세포에서 인자 IX를 발현하는 방법으로서, 제65항 내지 제131항 중 어느 한 항의 조성물을 세포에 투여하는 단계를 포함하며,

여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 표적 유전자 내의 상기 뉴클레아제 표적 부위를 절단하여 절단 부위를 생성하고, 상기 핵산 구조체는 상기 절단 부위에 삽입되어 변형된 표적 유전자를 생성하고, 인자 IX 단백질이 변형된 표적 유전자로부터 발현되는, 방법.

청구항 163

제161항 또는 제162항에 있어서, 상기 뉴클레아제 작용제는

(a) Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산; 및

(B) 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함하며, 여기서 상기 가이드 RNA는 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 DNA-표적화 세그먼트를 포함하고, 여기서 상기 가이드 RNA는 상기 Cas 단백질에 결합하고 상기 Cas 단백질을 상기 가이드 RNA 표적 서열로 표적화하는, 방법.

청구항 164

제163항에 있어서, 상기 핵산 구조체, 상기 Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산, 및 상기 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA가 동시에 투여되는, 방법.

청구항 165

제163항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산 및 상기 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA와 동시에 투여되지 않는, 방법.

청구항 166

제161항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 유전자는 *알부민* 유전자이고, 상기 뉴클레아제 표적 부위는 상기 *알부민* 유전자의 인트론 1에 존재하는, 방법.

청구항 167

제160항 내지 제166항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 간 세포인, 방법.

청구항 168

제160항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 간세포인, 방법.

청구항 169

제160항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 인간 세포인, 방법.

청구항 170

제160항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 신생아 세포인, 방법.

청구항 171

제170항에 있어서, 상기 신생아 세포는 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래되는, 방법.

청구항 172

제170항에 있어서, 상기 신생아 세포는 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래되는, 방법.

청구항 173

제170항에 있어서, 상기 신생아 세포는 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래되는, 방법.

청구항 174

제170항에 있어서, 상기 신생아 세포는 출생 후 4주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래되는, 방법.

청구항 175

제160항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 신생아 세포가 아닌, 방법.

청구항 176

제160항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 생체내에 존재하는, 방법.

청구항 177

제160항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 시험관내 또는 생체외에 존재하는, 방법.

청구항 178

대상체에서 인자 IX 결핍을 치료하는 방법으로서, 제65항 내지 제131항 중 어느 한 항의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 179

대상체에서 B형 혈우병을 치료하는 방법으로서, 제65항 내지 제131항 중 어느 한 항의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 180

B형 혈우병을 갖는 대상체에서 자연적 출혈을 예방 또는 억제하는 방법으로서, 제65항 내지 제131항 중 어느 한 항의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 181

제179항 또는 제180항에 있어서, B형 혈우병은 경증 B형 혈우병인, 방법.

청구항 182

제179항 또는 제180항에 있어서, B형 혈우병은 중등도 B형 혈우병인, 방법.

청구항 183

제179항 또는 제180항에 있어서, B형 혈우병은 중증 B형 혈우병인, 방법.

청구항 184

제178항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴클레아제 작용제는

(a) Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산; 및

(B) 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함하며, 여기서 상기 가이드 RNA는 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 DNA-표적화 세그먼트를 포함하고, 여기서 상기 가이드 RNA는 상기 Cas 단백질에 결합하고 상기 Cas 단백질을 상기 가이드 RNA 표적 서열로 표적화하는, 방법.

청구항 185

제184항에 있어서, 상기 가이드 RNA 표적 서열은 *알부민* 유전자의 인트론 1에 존재하는, 방법.

청구항 186

제184항 또는 제185항에 있어서, 상기 핵산 구조체, 상기 Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산, 및 상기 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA가 동시에 투여되는, 방법.

청구항 187

제184항 또는 제185항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산 및 상기 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA와 동시에 투여되지 않는, 방법.

청구항 188

제178항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 신생아 대상체인, 방법.

청구항 189

제188항에 있어서, 상기 신생아 대상체는 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체인, 방법.

청구항 190

제188항에 있어서, 상기 신생아 대상체는 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체인, 방법.

청구항 191

제188항에 있어서, 상기 신생아 대상체는 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체인, 방법.

청구항 192

제188항에 있어서, 상기 신생아 대상체는 출생 후 4주 이내인 인간 신생아 대상체인, 방법.

청구항 193

제178항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 신생아 대상체가 아닌, 방법.

청구항 194

제178항 내지 제193항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 인간 대상체인, 방법.

청구항 195

제178항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에서 순환 인자 IX 단백질의 치료적 유효 수준을 초래하는, 방법.

청구항 196

제178항 내지 제195항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에서 순환 인자 IX 응고 활성의 치료적 유효 수준을 초래하는, 방법.

청구항 197

제178항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 인자 IX 단백질을 인코딩하는 에피솜 발현 벡터를 대조군 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법과 비교하여 상기 대상체에서 상기 인자 IX 단백질의 발현을 증가시키는, 방법.

청구항 198

제178항 내지 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 인자 IX 단백질을 인코딩하는 에피솜 발현 벡터를 대조군 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법과 비교하여 상기 대상체에서 상기 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 증가시키는, 방법.

청구항 199

제178항 내지 제198항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에서 적어도 약 1 μg/mL, 적어도 약 2 μg/mL, 적어도 약 3 μg/mL, 적어도 약 4 μg/mL, 또는 적어도 약 5 μg/mL의 상기 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 초래하는, 방법.

청구항 200

제178항 내지 제199항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에서 적어도 약 5 μg/mL의 상기 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 초래하는, 방법.

청구항 201

제178항 내지 제200항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에서 약 1 μg/mL 내지 약 10 μg/mL의 상기 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 초래하는, 방법.

청구항 202

제178항 내지 제201항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 정상의 적어도 약 1%, 정상의 적어도 약 5%, 정상의 적어도 약 10%, 정상의 적어도 약 15%, 정상의 적어도 약 20%, 정상의 적어도 약 25%, 정상의 적어도 약 30%, 정상의 적어도 약 35%, 정상의 적어도 약 40%, 정상의 적어도 약 45%, 또는 정상의 적어도 약 50%의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하며, 임의로 여기서 상기 방법은 정상의 약 40% 내지 약 150% 또는 약 40% 내지 약 100%의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하는, 방법.

청구항 203

제202항에 있어서,

(I) 상기 대상체는 중증 혈우병을 갖고, 상기 방법은 정상의 적어도 약 1% 또는 약 1% 초과의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하거나;

(II) 상기 대상체는 중등도 혈우병을 갖고, 상기 방법은 정상의 적어도 약 5% 또는 약 5% 초과의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하거나; 또는

(III) 상기 대상체는 경증 혈우병을 갖고, 상기 방법은 정상의 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 또는 약 50% 초과의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하는, 방법.

청구항 204

제202항 또는 제203항에 있어서, 상기 방법은 정상의 적어도 약 15%의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하는, 방법.

청구항 205

제178항 내지 제204항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 정상의 약 300% 미만, 약 250% 미만, 약 200% 미만, 또는 약 150% 미만의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하는, 방법.

청구항 206

제178항 내지 제205항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 대상체의 기준 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준보다 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 적어도 약 1%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 증가시키는, 방법.

청구항 207

제178항 내지 제206항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준은 상기 조성물

을 투여한 후 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 1년, 또는 적어도 약 2년 동안 지속되는, 방법.

청구항 208

제178항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월차에 상기 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 50%인, 방법.

청구항 209

제178항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 1년차에 상기 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 50%인, 방법.

청구항 210

제178항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월차에 상기 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 60%인, 방법.

청구항 211

제178항 내지 제210항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 2년차에 상기 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 50%인, 방법.

청구항 212

제178항 내지 제211항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 2년차에 상기 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 60%인, 방법.

청구항 213

제178항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월차에 상기 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 60%인, 방법.

청구항 214

제178항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 조성물을 상기 대상체에 투여하기 전에 상기 대상체에서 기존의 AAV 면역력을 평가하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 215

제214항에 있어서, 상기 기존의 AAV 면역력은 기존의 AAV8 면역력인, 방법.

청구항 216

제214항 또는 제215항에 있어서, 기존의 AAV 면역력을 평가하는 것은 총 항체 면역 검정 또는 중화 항체 검정을 사용하여 면역원성을 평가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 217

핵산 인코딩 인자 IX 단백질을 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단 내 표적 게놈 유전자좌 내로 삽입하는 방법으로서, 상기 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에

(a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및

(b) 뉴클레아제 작용제 또는 상기 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 것을 포함

하며, 여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고,

여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 상기 핵산 구조체는 상기 표적 게놈 유전자좌에 삽입되는, 방법.

청구항 218

신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서 표적 게놈 유전자좌로부터 인자 IX 단백질을 발현하는 방법으로서, 상기 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에

(a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및

(b) 뉴클레아제 작용제 또는 상기 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고,

여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 상기 핵산 구조체는 상기 표적 게놈 유전자좌에 삽입되어 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성하고, 상기 인자 IX 단백질이 상기 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현되는, 방법.

청구항 219

제217항 또는 제218항에 있어서, 상기 신생아 세포는 간 세포이거나, 상기 신생아 세포의 집단은 간 세포의 집단인, 방법.

청구항 220

제217항 내지 제219항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생아 세포는 간세포이거나, 상기 신생아 세포의 집단은 간세포의 집단인, 방법.

청구항 221

제217항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생아 세포는 인간 세포이거나, 상기 신생아 세포의 집단은 인간 세포의 집단인, 방법.

청구항 222

제221항에 있어서, 상기 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 24주 이내인 신생아 대상체로부터 유래되는, 방법.

청구항 223

제221항에 있어서, 상기 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 12주 이내인 신생아 대상체로부터 유래되는, 방법.

청구항 224

제221항에 있어서, 상기 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 8주 이내인 신생아 대상체로부터 유래되는, 방법.

청구항 225

제221항에 있어서, 상기 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 4주 이내인 신생아 대상체로부터 유래되는, 방법.

청구항 226

제217항 내지 제225항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생아 세포는 시험관내 또는 생체외에 존재하거나, 상기 신생아 세포의 집단은 시험관내 또는 생체외에 존재하는, 방법.

청구항 227

제217항 내지 제225항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생아 세포는 신생아 대상체의 생체내에 존재하거나, 상

기 신생아 세포의 집단은 신생아 대상체의 생체내에 존재하는, 방법.

청구항 228

핵산 인코딩 인자 IX 단백질을 신생아 대상체에서 신생아 세포 내 표적 게놈 유전자좌 내로 삽입하는 방법으로서, 상기 신생아 대상체에

(a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및

(b) 뉴클레아제 작용제 또는 상기 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고,

여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 상기 핵산 구조체는 상기 표적 게놈 유전자좌에 삽입되는, 방법.

청구항 229

신생아 대상체에서 신생아 세포 내 표적 게놈 유전자좌로부터 인자 IX 단백질을 발현하는 방법으로서, 상기 신생아 대상체에

(a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및

(b) 뉴클레아제 작용제 또는 상기 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고,

여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 상기 핵산 구조체는 상기 표적 게놈 유전자좌에 삽입되어 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성하고, 상기 인자 IX 단백질이 상기 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현되는, 방법.

청구항 230

제228항 또는 제229항에 있어서, 상기 신생아 세포는 간 세포인, 방법.

청구항 231

제228항 내지 제230항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생아 세포는 간세포인, 방법.

청구항 232

제228항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생아 세포는 인간 세포인, 방법.

청구항 233

치료하는 방법을 필요로 하는 신생아 대상체에서 인자 IX 결핍을 치료하는 방법으로서, 상기 신생아 대상체에

(a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및

(b) 뉴클레아제 작용제 또는 상기 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고,

여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 상기 핵산 구조체는 상기 표적 게놈 유전자좌에 삽입되어 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성하고, 상기 인자 IX 단백질이 상기 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현되는, 방법.

청구항 234

B형 혈우병을 갖는 신생아 대상체에서 자연적 출혈을 예방 또는 억제하는 방법으로서, 상기 신생아 대상체에

(a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및

(b) 뉴클레아제 작용제 또는 상기 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고,

여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 상기 핵산 구조체는 상기 표적 게놈

유전자좌에 삽입되어 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성하고, 상기 인자 IX 단백질이 상기 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현되고, 상기 신생아 대상체에서 자연적 출혈을 예방 또는 억제하는, 방법.

청구항 235

제227항 내지 제233항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 B형 혈우병을 갖는, 방법.

청구항 236

치료하는 방법을 필요로 하는 신생아 대상체에서 B형 혈우병을 치료하는 방법으로서, 상기 신생아 대상체에

(a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및

(b) 뉴클레아제 작용제 또는 상기 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고,

여기서 상기 뉴클레아제 작용제는 상기 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 상기 핵산 구조체는 상기 표적 게놈 유전자좌에 삽입되어 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성하고, 상기 인자 IX 단백질이 상기 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현되어 상기 B형 혈우병을 치료하는, 방법.

청구항 237

제235항 또는 제236항에 있어서, 상기 대상체는 경증 B형 혈우병을 갖는, 방법.

청구항 238

제235항 또는 제236항에 있어서, 상기 대상체는 중등도 B형 혈우병을 갖는, 방법.

청구항 239

제235항 또는 제236항에 있어서, 상기 대상체는 중증 B형 혈우병을 갖는, 방법.

청구항 240

제227항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 인간 대상체인, 방법.

청구항 241

제240항에 있어서, 상기 신생아 대상체는 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체인, 방법.

청구항 242

제240항에 있어서, 상기 신생아 대상체는 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체인, 방법.

청구항 243

제240항에 있어서, 상기 신생아 대상체는 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체인, 방법.

청구항 244

제240항에 있어서, 상기 신생아 대상체는 출생 후 4주 이내인 인간 신생아 대상체인, 방법.

청구항 245

제227항 내지 제244항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 인자 IX 단백질을 인코딩하는 에피솜 발현 벡터를 대조군 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법과 비교하여 상기 대상체에서 상기 인자 IX 단백질의 발현을 증가시키는, 방법.

청구항 246

제227항 내지 제245항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 인자 IX 단백질을 인코딩하는 에피솜 발현 벡터를 대조군 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법과 비교하여 상기 대상체에서 상기 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 증가시키는, 방법.

청구항 247

제227항 내지 제246항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에서 적어도 약 1 μg/mL, 적어도 약 2 μg/mL, 적어도 약 3 μg/mL, 적어도 약 4 μg/mL, 또는 적어도 약 5 μg/mL의 상기 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 초래하는, 방법.

청구항 248

제227항 내지 제247항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에서 적어도 약 5 μg/mL의 상기 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 초래하는, 방법.

청구항 249

제227항 내지 제248항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에서 약 1 μg/mL 내지 약 10 μg/mL의 상기 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 초래하는, 방법.

청구항 250

제227항 내지 제249항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 인자 IX 단백질의 상기 대상체의 기준 발현보다 인자 IX 단백질의 발현을 적어도 약 1%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 증가시키는, 방법.

청구항 251

제227항 내지 제250항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 인자 IX 단백질의 대상체의 기준 혈청 수준보다 혈청 내 인자 IX 단백질의 수준을 적어도 약 1%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 증가시키는, 방법.

청구항 252

제227항 내지 제251항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월차에 상기 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 50%인, 방법.

청구항 253

제227항 내지 제252항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 1년차에 상기 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 50%인, 방법.

청구항 254

제227항 내지 제253항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월차에 상기 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 60%인, 방법.

청구항 255

제227항 내지 제254항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 2년차에 상기 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 50%인, 방법.

청구항 256

제227항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 2년차에 상기 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 60%인, 방법.

청구항 257

제227항 내지 제256항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월차에 상기 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 상기 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 60%인, 방법.

청구항 258

제227항 내지 제257항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에서 순환 인자 IX 단백질의 치료적 유효 수준을 초래하는, 방법.

청구항 259

제227항 내지 제258항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에서 순환 인자 IX 응고 활성의 치료적 유효 수준을 초래하는, 방법.

청구항 260

제227항 내지 제259항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 정상의 적어도 약 1%, 정상의 적어도 약 5%, 정상의 적어도 약 10%, 정상의 적어도 약 15%, 정상의 적어도 약 20%, 정상의 적어도 약 25%, 정상의 적어도 약 30%, 정상의 적어도 약 35%, 정상의 적어도 약 40%, 정상의 적어도 약 45%, 또는 정상의 적어도 약 50%의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하며, 임의로 여기서 상기 방법은 정상의 약 40% 내지 약 150% 또는 약 40% 내지 약 100%의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하는, 방법.

청구항 261

제260항에 있어서,

(I) 상기 대상체는 중증 혈우병을 갖고, 상기 방법은 정상의 적어도 약 1% 또는 약 1% 초과의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하거나;

(II) 상기 대상체는 중등도 혈우병을 갖고, 상기 방법은 정상의 적어도 약 5% 또는 약 5% 초과의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하거나; 또는

(III) 상기 대상체는 경증 혈우병을 갖고, 상기 방법은 정상의 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 또는 약 50% 초과의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하는, 방법.

청구항 262

제260항 또는 제261항에 있어서, 상기 방법은 정상의 적어도 약 15%의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하는, 방법.

청구항 263

제227항 내지 제262항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 정상의 약 300% 미만, 약 250% 미만, 약 200% 미만, 또는 약 150% 미만의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하는, 방법.

청구항 264

제227항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 대상체의 기준 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준보다 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 적어도 약 1%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 증가시키는, 방법.

청구항 265

제217항 내지 제264항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 뉴클레아제 작용제 또는 상기 뉴클레

아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산과 동시에 투여되는, 방법.

청구항 266

제217항 내지 제264항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 뉴클레아제 작용제 또는 상기 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산과 동시에 투여되지 않는, 방법.

청구항 267

제266항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 뉴클레아제 작용제 또는 상기 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 핵산 전에 투여되는, 방법.

청구항 268

제266항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 뉴클레아제 작용제 또는 상기 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 후에 투여되는, 방법.

청구항 269

제217항 내지 제268항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 방법.

청구항 270

제217항 내지 제269항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩하는, 방법.

청구항 271

제217항 내지 제270항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은

(I) 서열번호 166, 165, 164, 및 167 내지 171 중 임의의 하나와 적어도 95% 동일하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 CpG-고갈되고, 코돈-최적화되고, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(II) 서열번호 159, 160 및 161 중 임의의 하나와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 방법.

청구항 272

제217항 내지 제271항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은

(I) 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나;

(II) 서열번호 165와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(III) 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 방법.

청구항 273

제217항 내지 제272항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은

(I) 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(II) 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연

변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 방법.

청구항 274

제217항 내지 제273항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 방법.

청구항 275

제217항 내지 제273항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 방법.

청구항 276

제217항 내지 제275항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈되는, 방법.

청구항 277

제217항 내지 제270항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166, 165, 또는 159를 포함하는, 방법.

청구항 278

제277항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166, 165, 또는 159로 이루어지는, 방법.

청구항 279

제217항 내지 제270항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166 또는 서열번호 159를 포함하는, 방법.

청구항 280

제279항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166 또는 서열번호 159로 이루어지는, 방법.

청구항 281

제217항 내지 제270항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 방법.

청구항 282

제281항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어지는, 방법.

청구항 283

제217항 내지 제270항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 방법.

청구항 284

제283항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어지는, 방법.

청구항 285

제217항 내지 제284항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열의 상류에 스플라이스 수용체를 포함하는, 방법.

청구항 286

제217항 내지 제285항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열의 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함하는, 방법.

청구항 287

제217항 내지 제284항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열의 상류에 스플라이스 수용체를 포함하고, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열의 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함하는, 방법.

청구항 288

제217항 내지 제287항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 방법.

청구항 289

제288항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 비-상동성 말단 접합을 통해 상기 표적 게놈 유전자좌 내로 삽입되는, 방법.

청구항 290

제217항 내지 제287항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하는, 방법.

청구항 291

제290항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상동성-지향 수선을 통해 상기 표적 게놈 유전자좌 내로 삽입되는, 방법.

청구항 292

제217항 내지 제291항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않는, 방법.

청구항 293

제217항 내지 제292항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 양방향 구조체이고, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열인, 방법.

청구항 294

제293항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는, 방법.

청구항 295

제294항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 인자 IX 단백질 서열을 인코딩하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 방법.

청구항 296

제294항 또는 제295항에 있어서,

(I) (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 95% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(II) (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 95% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 상기 제2 인자 IX 단

백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 방법.

청구항 297

제294항 내지 제296항 중 어느 한 항에 있어서,

(I) (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(II) (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되고, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 방법.

청구항 298

제294항 내지 제297항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈되고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈된, 방법.

청구항 299

제294항 내지 제298항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 방법.

청구항 300

제294항 내지 제299항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩하는, 방법.

청구항 301

제294항 내지 제300항 중 어느 한 항에 있어서,

(I) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; 또는

(II) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 방법.

청구항 302

제294항 내지 제301항 중 어느 한 항에 있어서,

(I) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어지고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어지거나; 또는

(II) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어지고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어지는, 방법.

청구항 303

제294항 내지 제302항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하는, 방법.

청구항 304

제303항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 인자 IX 단백질 서열을 인코딩하며, 여기서 상기 제1 폴리아데닐화 신호 및 상기 제2 폴리아데닐화 신호는 상이한, 방법.

청구항 305

제217항 내지 제304항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 상기 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 방법.

청구항 306

제217항 내지 제305항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 180 또는 이의 역보체를 포함하는, 방법.

청구항 307

제217항 내지 제306항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA 또는 이중 가닥 DNA인, 방법.

청구항 308

제307항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA인, 방법.

청구항 309

제217항 내지 제308항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 핵산 벡터 또는 지질 나노입자 내에 있는, 방법.

청구항 310

제309항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 핵산 벡터 내에 있는, 방법.

청구항 311

제310항에 있어서, 상기 핵산 벡터는 바이러스 벡터인, 방법.

청구항 312

제310항 또는 제311항에 있어서, 상기 핵산 벡터는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터이며,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고,

임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 방법.

청구항 313

제312항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 단일 가닥 AAV(ssAAV) 벡터인, 방법.

청구항 314

제312항 또는 제313항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 AAV8 벡터, AAV3B 벡터, AAV5 벡터, AAV6 벡터, AAV7 벡터, AAV9 벡터, AAVrh.74 벡터, 또는 AAVhu.37 벡터로부터 유래되는, 방법.

청구항 315

제314항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 재조합 AAV8(rAAV8) 벡터인, 방법.

청구항 316

제315항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 단일 가닥 rAAV8 벡터인, 방법.

청구항 317

제217항 내지 제316항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 상기 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 방법.

청구항 318

제217항 내지 제292항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 일방향 구조체인, 방법.

청구항 319

제318항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고,

여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고;

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 방법.

청구항 320

제319항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 방법.

청구항 321

제319항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 방법.

청구항 322

제318항 내지 제321항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA 또는 이중 가닥 DNA인, 방법.

청구항 323

제322항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA인, 방법.

청구항 324

제318항 내지 제323항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 핵산 벡터 또는 지질 나노입자 내에 있는, 방법.

청구항 325

제324항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 핵산 벡터 내에 있는, 방법.

청구항 326

제325항에 있어서, 상기 핵산 벡터는 바이러스 벡터인, 방법.

청구항 327

제325항 또는 제326항에 있어서, 상기 핵산 벡터는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터이며,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 방법.

청구항 328

제327항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 단일 가닥 AAV(ssAAV) 벡터인, 방법.

청구항 329

제327항 또는 제328항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 AAV8 벡터, AAV3B 벡터, AAV5 벡터, AAV6 벡터, AAV7 벡터, AAV9 벡터, AAVrh.74 벡터, 또는 AAVhu.37 벡터로부터 유래되는, 방법.

청구항 330

제329항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 재조합 AAV8(rAAV8) 벡터인, 방법.

청구항 331

제330항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 단일 가닥 rAAV8 벡터인, 방법.

청구항 332

제318항 내지 제331항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고,

여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고,

상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 방법.

청구항 333

제332항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 방법.

청구항 334

제332항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 방법.

청구항 335

제217 내지 제334항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 게놈 유전자좌는 *알부민* 유전자이며, 임의로 여기서 상기 *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자인, 방법.

청구항 336

제335항에 있어서, 상기 뉴클레아제 표적 부위는 상기 *알부민* 유전자의 인트론 1에 존재하는, 방법.

청구항 337

제217항 내지 제336항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴클레아제 작용제는

(a) 아연 집게 뉴클레아제(ZFN);

(b) 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN); 또는

(c) (i) Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산; 및

(ii) 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함하며, 여기서 상기 가이드 RNA는 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 DNA-표적화 세그먼트를 포함하고, 여기서 상기 가이드 RNA는 상기 Cas 단백질에 결합하고 상기 Cas 단백질을 상기 가이드 RNA 표적 서열로 표적화하는, 방법.

청구항 338

제217항 내지 제336항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴클레아제 작용제는

(a) Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산; 및

(B) 가이드 RNA 또는 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함하며, 여기서 상기 가이드 RNA는 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 DNA-표적화 세그먼트를 포함하고, 여기서 상기 가이드 RNA는 상기 Cas 단백질에 결합하고 상기 Cas 단백질을 상기 가이드 RNA 표적 서열로 표적화하는, 방법.

청구항 339

제338항에 있어서, 상기 가이드 RNA 표적 서열은 *알부민* 유전자의 인트론 1에 존재하는, 방법.

청구항 340

제339항에 있어서, 상기 *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자인, 방법.

청구항 341

제338항 내지 제340항 중 어느 한 항에 있어서,

(I) 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 어느 하나에 기재된 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하며, 임의로 여기서 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 어느 하나에 기재된 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고/하거나;

(II) 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 어느 하나에 기재된 서열과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일하며, 임의로 여기서 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 어느 하나에 기재된 서열과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한, 방법.

청구항 342

제338항 내지 제341항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나를 포함하고, 임의로 여기서 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나를 포함하는, 방법.

청구항 343

제338항 내지 제342항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나로 이루어지며, 임의로 여기서 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나로 이루어지는, 방법.

청구항 344

제338항 내지 제343항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 62 내지 서열번호 125 중 어느 하나를 포함하며, 임의로 여기서 상기 가이드 RNA는 서열번호 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, 및 105 중 임의의 하나를 포함하는, 방법.

청구항 345

제338항 내지 제344항 중 어느 한 항에 있어서,

(I) 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고/하거나;

(II) 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한, 방법.

청구항 346

제338항 내지 제345항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36을 포함하는, 방법.

청구항 347

제338항 내지 제346항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36으로 이루어지는, 방법.

청구항 348

제338항 내지 제347항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하는, 방법.

청구항 349

제338항 내지 제348항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 RNA 형태의 상기 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 350

제338항 내지 제349항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 적어도 하나의 변형을 포함하는, 방법.

청구항 351

제350항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 352

제350항 또는 제351항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함하는, 방법.

청구항 353

제350항 내지 제352항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 5개의 뉴클레오티드 중 하나 이상에 변형을 포함하는, 방법.

청구항 354

제350항 내지 제353항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 5개의 뉴클레오티드 중 하나 이상에 변형을 포함하는, 방법.

청구항 355

제350항 내지 제354항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함하는, 방법.

청구항 356

제350항 내지 제355항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함하는, 방법.

청구항 357

제350항 내지 제356항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 358

제350항 내지 제357항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 359

제350항 내지 제358항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 변형은 (i) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 360

제338항 내지 제359항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)인, 방법.

청구항 361

제338항 내지 제360항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 RNA 형태의 상기 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하고, 상기 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 상기 가이드 RNA는 (i) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 362

제338항 내지 제361항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질인, 방법.

청구항 363

제362항에 있어서, 상기 Cas9 단백질은 *스트렙토콕커스 피오게네스* Cas9 단백질, *스타필로콕커스 아우레우스* Cas9 단백질, *캄필로박터 제주니* Cas9 단백질, *스트렙토콕커스 써모필루스* Cas9 단백질, 또는 *네이쎄리아 메닌지티디스* Cas9 단백질로부터 유래하는, 방법.

청구항 364

제362항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 *스트렙토콕커스 피오게네스* Cas9 단백질로부터 유래되는, 방법.

청구항 365

제338항 내지 제364항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 서열번호 11로 기재된 서열을 포함하는, 방법.

청구항 366

제338항 내지 제365항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산은 포유류 세포 또는 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되는, 방법.

청구항 367

제338항 내지 제366항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 핵산은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하는, 방법.

청구항 368

제367항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 적어도 하나의 변형을 포함하는, 방법.

청구항 369

제367항 또는 제368항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 변형된 우리딘을 하나 이상의 또는 모든 우리딘 위치에 포함하도록 변형되는, 방법.

청구항 370

제369항에 있어서, 상기 변형된 우리딘은 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘인, 방법.

청구항 371

제369항 또는 제370항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되는, 방법.

청구항 372

제367항 내지 제371항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 5' 캡을 포함하는, 방법.

청구항 373

제367항 내지 제372항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 폴리(A) 테일을 포함하는, 방법.

청구항 374

제367항 내지 제373항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12로 기재된 서열을 포함하는, 방법.

청구항 375

제338항 내지 제374항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 핵산은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하는, 방법.

청구항 376

제338항 내지 제375항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 RNA 형태의 상기 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하고, 상기 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며,

여기서 상기 방법은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 핵산은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 서열번호 226, 225 또는 12에 기재된 서열을 포함하는, 방법.

청구항 377

제338항 내지 제375항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 RNA 형태의 상기 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하고, 상기 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 상기 가이드 RNA는 (i) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며,

여기서 상기 방법은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 핵산은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하는, 방법.

청구항 378

제376항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 여기서 상기 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 방법.

청구항 379

제376항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고,

여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 방법.

청구항 380

제379항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 방법.

청구항 381

제379항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 방법.

청구항 382

제377항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 여기서 상기 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 방법.

청구항 383

제377항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고,

여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는, 방법.

청구항 384

제383항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 방법.

청구항 385

제383항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 방법.

청구항 386

제338항 내지 제385항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질 또는 상기 Cas 단백질과 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 상기 핵산 또는 상기 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA는 지질 나노입자와 관련이 있는,

방법.

청구항 387

제386항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 양이온성 지질, 중성 지질, 헬퍼 지질, 및 스텔스 지질을 포함하는, 방법.

청구항 388

제387항에 있어서, 상기 양이온성 지질은 지질 ((9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트)인, 방법.

청구항 389

제387항 또는 제388항에 있어서, 상기 중성 지질은 디스테아로일포스파티딜콜린 또는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC)인, 방법.

청구항 390

제387항 내지 제389항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 헬퍼 지질은 콜레스테롤인, 방법.

청구항 391

제387항 내지 제390항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 스텔스 지질은 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000인, 방법.

청구항 392

제387항 내지 제391항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 양이온성 지질은 지질 A이고, 상기 중성 지질은 DSPC이고, 상기 헬퍼 지질은 콜레스테롤이고, 상기 스텔스 지질은 PEG2k-DMG인, 방법.

청구항 393

제387항 내지 제392항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 나노입자는 하기 몰비: 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG로 4개의 지질을 포함하는, 방법.

청구항 394

제338항 내지 제393항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며,

여기서 상기 방법은 RNA 형태의 상기 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하고, 상기 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하고,

여기서 상기 방법은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 핵산은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 서열번호 226, 225 또는 12에 기재된 서열을 포함하고,

여기서 상기 가이드 RNA 및 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있는, 방법.

청구항 395

제338항 내지 제393항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며,

여기서 상기 방법은 RNA 형태의 상기 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하고, 상기 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 상기 가이드 RNA는 (i) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 상기 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 상기 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하고,

여기서 상기 방법은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 핵산을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 핵산은 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하고, 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하고,

여기서 상기 가이드 RNA 및 상기 Cas 단백질을 인코딩하는 상기 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있는, 방법.

청구항 396

제394항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 여기서 상기 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 방법.

청구항 397

제394항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고,

여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고,

상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 방법.

청구항 398

제397항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 방법.

청구항 399

제397항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 방법.

청구항 400

제395항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 여기서 상기 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 방법.

청구항 401

제395항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체이며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고,

여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고,

상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고,

여기서 상기 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고,

임의로 여기서 상기 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 상기 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는, 방법.

청구항 402

제401항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 방법.

청구항 403

제401항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 방법.

청구항 404

제228항 내지 제403항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 핵산 구조체를 상기 대상체에 투여하기 전에 상기 신생아 대상체에서 기존의 AAV 면역력을 평가하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 405

제404항에 있어서, 상기 기존의 AAV 면역력은 기존의 AAV8 면역력인, 방법.

청구항 406

제404항 또는 제405항에 있어서, 기존의 AAV 면역력을 평가하는 것은 총 항체 면역 검정 또는 중화 항체 검정을 사용하여 면역원성을 평가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 407

제217항 내지 제227항 및 제265항 내지 제406항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 408

표적 게놈 유전자좌에 삽입된 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체를 포함하는 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 409

제407항 또는 제408항에 있어서, 상기 신생아 세포는 간 세포이거나, 상기 신생아 세포의 집단은 간 세포의 집단인, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 410

제407항 내지 제409항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생아 세포는 간세포이거나, 상기 신생아 세포의 집단은 간세포의 집단인, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 411

제407항 내지 제410항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생아 세포는 인간 세포이거나, 상기 신생아 세포의 집단은 인간 세포의 집단인, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 412

제411항에 있어서, 상기 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 24주 이내인 신생아 대상체로부터 유래되는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 413

제411항에 있어서, 상기 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 12주 이내인 신생아 대상체로부터 유래되는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 414

제411항에 있어서, 상기 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 8주 이내인 신생아 대상체로부터 유래되는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 415

제411항에 있어서, 상기 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 4주 이내인 신생아 대상체로부터 유래되는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 416

제407항 내지 제415항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생아 세포는 시험관내 또는 생체외에 존재하거나, 상기 신생아 세포의 집단은 시험관내 또는 생체외에 존재하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 417

제407항 내지 제415항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신생아 세포는 대상체의 생체내에 존재하거나, 상기 신생아 세포의 집단은 대상체의 생체내에 존재하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 418

제407항 내지 제417항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질이 발현되는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 419

제407항 내지 제418항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 420

제407항 내지 제419항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 421

제407항 내지 제420항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은

(I) 서열번호 166, 165, 164, 및 167 내지 171 중 임의의 하나와 적어도 95% 동일하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 CpG-고갈되고, 코돈-최적화되고, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(II) 서열번호 159, 160 및 161 중 임의의 하나와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 422

제407항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은

(I) 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나;

(II) 서열번호 165와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(III) 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 423

제407항 내지 제422항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은

(I) 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(II) 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 424

제407항 내지 제423항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 425

제407항 내지 제423항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 426

제407항 내지 제425항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈되는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 427

제407항 내지 제426항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166, 165, 또는 159를 포함하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 428

제427항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166, 165, 또는 159로 이루어지는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 429

제407항 내지 제420항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166 또는 서열번호 159를 포함하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 430

제429항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166 또는 서열번호 159로 이루어지는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 431

제407항 내지 제420항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 432

제431항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어지는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 433

제407항 내지 제420항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 434

제433항에 있어서, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어지는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 435

제407항 내지 제434항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열의 상류에

스플라이스 수용체를 포함하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 436

제407항 내지 제435항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열의 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 437

제407항 내지 제436항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열의 상류에 스플라이스 수용체를 포함하고, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열의 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 438

제407항 내지 제437항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않으며, 여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상기 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결되는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 439

제407항 내지 제438항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 양방향 구조체이고, 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열인, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 440

제439항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 441

제440항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 인자 IX 단백질 서열을 인코딩하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 442

제440항 또는 제441항에 있어서,

(I) (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 95% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(II) (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 95% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 443

제440항 내지 제442항 중 어느 한 항에 있어서,

(I) (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고,

CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는

(II) (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되고, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 444

제440항 내지 제443항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈되고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈된, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 445

제440항 내지 제444항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 상기 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아닌, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 446

제440항 내지 제445항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 447

제440항 내지 제446항 중 어느 한 항에 있어서,

(I) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; 또는

(II) 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 448

제440항 내지 제447항 중 어느 한 항에 있어서,

(I) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어지고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어지거나; 또는

(II) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어지고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어지는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 449

제440항 내지 제448항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 450

제449항에 있어서, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 인자 IX 단백질 서열을 인코딩하며, 여기서 상기 제1 폴리아데닐화 신호 및 상기 제2 폴리아데닐화 신호는 상이한, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 451

제407항 내지 제450항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 상기 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하며,

여기서 상기 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 상기 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 상기 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고,

여기서 상기 핵산 구조체는 상기 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 상기 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상기 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결되는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 452

제407항 내지 제451항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 180 또는 이의 역보체를 포함하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 453

제407 내지 제452항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 게놈 유전자좌는 *알부민* 유전자이며, 임의로 여기서 상기 *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자인, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

청구항 454

제453항에 있어서, 상기 뉴클레아제 표적 부위는 상기 *알부민* 유전자의 인트론 1에 존재하는, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2021년 10월 27일에 출원된 미국 출원 제63/272,324호, 2022년 2월 2일에 출원된 미국 출원 제63/306,037호, 및 2022년 7월 29일에 출원된 미국 출원 제63/369,864호의 이익을 주장하며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0003] 서열 목록에 대한 참조

[0004] EFS 웹을 통해 텍스트 파일로 제출

[0005] 파일 057766-586369.xml로 작성된 서열 목록은 516 킬로바이트 크기이고, 2022년 10월 26일에 생성되었고, 본원에 참조로서 포함된다.

배 경 기 술

[0006] B형 혈우병은 응고 인자 IX(FIX)의 결핍 또는 결손으로 인해 출혈 질병체질이 발생하는 것을 특징으로 하는 희귀한 선천성 유전 장애이다. *인자 9(F9)* 유전자의 유전적 또는 자연적 X-결합 열성 돌연변이로 인해 FIX 단백질이 결손되거나 결함이 발생한다. B형 혈우병의 전반적인 발생률은 25,000명의 남성 출생 중 대략 1명이다. 미국의 경우, 2019년 최신 전 세계 혈우병 조사에서 전 세계적으로 B형 혈우병 환자 총 31,997명에 대해 4,093명의 환자가 B형 혈우병을 앓고 있다고 보고하였다. 문헌[World Federation of Hemophilia, "Report on the Annual Global Survey 2019" World Federation of Hemophilia (2020)].

[0007] X-결합 열성 돌연변이로 인해 혈우병 B는 대부분 남성에게 영향을 미치지만, 여성 보균자도 영향을 받을 수 있

다. B형 혈우병의 출혈 경향은 인자의 측정된 농도와 관련이 있고, 경증, 중등도 또는 중증으로 분류된다. B형 혈우병의 중증 및 중등도 경우에서, 빈번한 자연 출혈 사건이 가장 흔한 증상이다. 이러한 출혈 사건은 근육 및 관절에서 발생하여 통증 및 이동 제한을 야기하고, 치료하지 않을 경우 활막염, 관절병 및 근육 약화로 관절의 장기간 손상을 초래할 수 있다.

[0008] 미국에서 현재 치료의 표준은 혈액 공여자의 혈장으로부터 재조합 또는 유래된, 응고 인자 농축물(CFC)에 의한 출혈 사건의 예방 및 치료이다. 그러나, CFC 주입의 3% 내지 4%에서 알레르기 반응이 일어날 수 있고, 환자의 약 5%가 반복 투여 후 FIX 중화 항체가 발생한다. 문헌[Srivastava et al. "WFH Guidelines for the Management of Hemophilia," *Haemophilia* 26.6:1-158 (2020)]. 인자 교체 또한 부담스럽고(자주 정맥 투여가 필요함) 비용이 많이 들며, 출혈 사건을 줄이지만 제거하지 못해 여전히 관절 질환과 장애의 진행을 유발한다.

발명의 내용

[0009] 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 또는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 핵산 구조체를 포함하는 조성물, 조성물을 포함하는 세포, 및 이러한 핵산 구조체를 사용하는 방법, 예컨대 *인자 9* 핵산을 세포 내에 도입하는 방법, *인자 9* 핵산 구조체를 세포 내 표적 유전자에 통합하는 방법, 세포에서 인자 IX를 발현하는 방법, 대상체에서 인자 IX 결핍을 치료하는 방법, 대상체에서 B형 혈우병을 치료하는 방법, 및 B형 혈우병을 갖는 대상체에서 자연적 출혈을 예방 또는 억제하는 방법이 제공된다.

[0010] 일 양태에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 또는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 핵산 구조체를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열: (I)은 서열번호 166, 165, 164, 및 167 내지 171 중 임의의 하나와 적어도 95% 동일하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 CpG-고갈되고, 코돈-최적화되고, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; (II)는 서열번호 159, 160 및 161 중 임의의 하나와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다.

[0011] 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열: (I)은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; (II)는 서열번호 165와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는 (III)은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다.

[0012] 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열: (I)은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는 (II)은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다.

[0013] 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈된다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩한다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166, 165, 또는 159를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166, 165, 또는 159로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166 또는 159를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166 또는 159로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이

루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어진다.

[0014] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 상류에 스플라이스 수용체를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 상류에 스플라이스 수용체를 포함하고, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 상동성 아암(arm)을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않는다.

[0015] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 양방향 구조체이다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하거나, 여기서 핵산 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 인자 IX 단백질 서열을 인코딩하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다.

[0016] 일부 이러한 조성물에서, (I) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (II) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 95% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다.

[0017] 일부 이러한 조성물에서, (I) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (II) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165와 적어도 95% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다.

[0018] 일부 이러한 조성물에서, (I) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (II) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다.

[0019] 일부 이러한 조성물에서, (I) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (II) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다.

[0020] 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈되고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈된다.

[0021] 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하고, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩한다.

[0022] 일부 이러한 조성물에서, (I) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고; (II) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, (I) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어지고; (II) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어진다.

[0023] 일부 이러한 조성물에서, (I) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고; (II) 제2 인자 IX 단

백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, (I) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어지고; (II) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165로 이루어진다.

[0024] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하거나, 또는 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 인자 IX 단백질 서열을 인코딩하며, 여기서 제1 폴리아데닐화 신호 및 제2 폴리아데닐화 신호는 상이하다.

[0025] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다.

[0026] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 180 또는 이의 역보체를 포함한다.

[0027] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다.

[0028] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 서열번호 209 또는 서열번호 179 또는 이의 역보체를 포함한다.

[0029] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA 또는 이중 가닥 DNA이다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA이다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 핵산 벡터 또는 지질 나노입자 내에 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 핵산 벡터 내에 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 벡터는 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터이며, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, AAV 벡터는 단일 가닥 AAV(ssAAV) 벡터이다. 일부 이러한 조성물에서, AAV 벡터는 AAV8 벡터, AAV3B 벡터, AAV5 벡터, AAV6 벡터, AAV7 벡터, AAV9 벡터, AAVrh.74 벡터, 또는 AAVhu.37 벡터로부터 유래된다. 일부 이러한 조성물에서, AAV 벡터는 재조합 AAV8(rAAV8) 벡터이다. 일부 이러한 조성물에서, AAV 벡터는 단일 가닥 rAAV8 벡터이다.

[0030] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의

단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

[0031] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

[0032] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 일방향 구조체이다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고; 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않으며, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0033] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 일방향 구조체이다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고; 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않으며, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0034] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA 또는 이중 가닥 DNA이다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA이다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 핵산 벡터 또는 지질 나노입자 내에 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 핵산 벡터 내에 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 벡터는 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터이며, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, AAV 벡터는 단일 가닥 AAV(ssAAV) 벡터이다. 일부 이러한 조성물에서, AAV 벡터는 AAV8 벡터, AAV3B 벡터, AAV5 벡터, AAV6 벡터, AAV7 벡터, AAV9 벡터, AAVrh.74 벡터, 또는 AAVhu.37 벡터로부터 유래된다. 일부 이러한 조성물에서, AAV 벡터는 재조합 AAV8(rAAV8) 벡터이다. 일부 이러한 조성물에서, AAV 벡터는 단일 가닥 rAAV8 벡터이다.

[0035] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을

포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0036] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0037] 일부 이러한 조성물은 표적 유전자 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하는 뉴클레아제 작용제를 추가로 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 표적 유전자는 *알부민* 유전자이며, 임의로 여기서 *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이다. 일부 이러한 조성물에서, 뉴클레아제 작용제는 (a) 아연 집게 뉴클레아제(ZFN: zinc finger nuclease); (b) 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN: transcription activator-like effector nuclease); 또는 (c) (i) Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산; 및 (ii) 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함하며, 여기서 가이드 RNA는 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 DNA-표적화 세그먼트를 포함하고, 여기서 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합하고 Cas 단백질을 가이드 RNA 표적 서열로 표적화한다. 일부 이러한 조성물에서, 뉴클레아제 작용제는 (a) Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산; 및 (b) 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함하며, 여기서 가이드 RNA는 *알부민* 유전자의 인트론 1 내 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 DNA-표적화 세그먼트를 포함하고, 여기서 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합하고 Cas 단백질을 가이드 RNA 표적 서열로 표적화한다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이다.

[0038] 일부 이러한 조성물에서, (I) DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 어느 하나에 기재된 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하며, 임의로 여기서 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33 및 41 중 어느 하나에 기재된 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고/하거나 (II) DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 어느 하나에 기재된 서열과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일하며, 임의로 여기서 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33 및 41 중 어느 하나에 기재된 서열과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일하다. 일부 이러한 조성물에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나를 포함하고, 임의로 여기서 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나로 이루어지며, 임의로 여기서 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 가이드 RNA는 서열번호 62 내지 서열번호 125 중 어느 하나를 포함하며, 임의로 여기서 가이드 RNA는 서열번호 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, 및 105 중 임의의 하나를 포함한다.

[0039] 일부 이러한 조성물에서, (I) DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고/하거나 (II) DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일하다. 일부 이러한 조성물에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36으로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함한다.

[0040] 일부 이러한 조성물에서, (I) DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고/하거나 (II) DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일하다. 일부 이러한 조성물에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30으로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함한다.

[0041] 일부 이러한 조성물에서, (I) DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 33의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고/하거나 (II) DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 33과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일하다. 일부 이러한 조성물에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 33을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 33으로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97을 포함한다.

[0042] 일부 이러한 조성물에서, (I) DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 41의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하고/하거나 (II) DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 41과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일하다. 일부 이러한 조성물에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 41을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 41으로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함한다.

[0043] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 가이드 RNA는 적어도 하나의 변형을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 적어도 하나의 변형은 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 적어도 하나의 변형은 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 적어도 하나의 변형은 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음의 5개 뉴클레오티드 중 하나 이상에 변형을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 적어도 하나의 변형은 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 5개 뉴클레오티드 중 하나 이상에 변형을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 적어도 하나의 변형은 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 적어도 하나의 변형은 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 적어도 하나의 변형은 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 적어도 하나의 변형은 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 적어도 하나의 변형은 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0044] 일부 이러한 조성물에서, 가이드 RNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)이다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0045] 일부 이러한 조성물에서, 가이드 RNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)이다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0046] 일부 이러한 조성물에서, 가이드 RNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)이다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-

메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0047] 일부 이러한 조성물에서, 가이드 RNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)이다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0048] 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질이다. 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질은 *스트렙토콕커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes)* Cas9 단백질이거나 이로부터 유래된다. 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질은 서열번호 11에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 포유류 세포 또는 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하며, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 적어도 하나의 변형을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 변형된 우리딘을 하나 이상의 또는 모든 우리딘 위치에 포함하도록 변형된다. 일부 이러한 조성물에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘이다. 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환된다. 일부 이러한 조성물에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘이다. 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환된다. 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 5' 캡을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함한다.

[0049] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하며, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하며, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다.

[0050] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하며, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하며, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다.

[0051] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하며, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하며, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다.

[0052] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백

질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0053] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0054] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0055] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159

를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0056] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0057] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0058] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는

인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0059] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0060] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코

딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0061] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0062] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코

딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0063] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0064] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되

고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0065] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0066] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이

드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0067] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0068] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함한다. 일부

이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0069] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0070] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0071] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백

질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0072] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0073] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0074] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159

를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0075] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0076] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열

은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0077] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0078] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고,

여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0079] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0080] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인

코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0081] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0082] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈

도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0083] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0084] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번

호 100을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0085] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0086] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0087] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이

러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0088] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0089] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0090] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백

질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0091] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0092] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제

1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0093] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0094] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는

5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0095] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0096] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의

5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0097] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0098] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인

코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0099] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코

딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0100] 일부 이러한 조성물에서, Cas 단백질 또는 Cas 단백질과 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 지질 나노입자는 양이온성 지질, 중성 지질, 헬퍼 지질, 및 스텔스 지질을 포함한다. 일부 이러한 조성물에서, 양이온성 지질은 지질 A이다. 일부 이러한 조성물에서, 중성 지질은 DSPC이다. 일부 이러한 조성물에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이다. 일부 이러한 조성물에서, 스텔스 지질은 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000(PEG2k-DMG)이다. 일부 이러한 조성물에서, 양이온성 지질은 지질 A이고, 중성 지질은 DSPC이고, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이고, 스텔스 지질은 PEG2k-DMG이다. 일부 이러한 조성물에서, 지질 나노입자는 하기 몰비로 4개의 지질을 포함한다: 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG.

[0101] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0102] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX

단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0103] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0104] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0105] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인

자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0106] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0107] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX

단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0108] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0109] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0110] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클

레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0111] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질

A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0112] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가

이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0113] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의

PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0114] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호

159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0115] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함

하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0116] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까

지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0117] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0118] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX

단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0119] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0120] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0121] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인

자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0122] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0123] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX

단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0124] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0125] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0126] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클

레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0127] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질

A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0128] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가

이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0129] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 알부민 유전자는 인간 알부민 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의

PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0130] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호

159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0131] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함

하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0132] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 225에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까

지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0133] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0134] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX

단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0135] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0136] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0137] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인

자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0138] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97을 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0139] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX

단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0140] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0141] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0142] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클

레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0143] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질

A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0144] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 94를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가

이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0145] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의

PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0146] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 97을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호

159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0147] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함

하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0148] 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 조성물은 RNA 형태의 가이드 RNA를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 105를 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 조성물은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함하는 양방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까

지: 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 165를 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 165를 포함한다. 임의로, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0149] 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 *인자 9* 핵산을 세포 내에 도입하는 방법, *인자 9* 핵산 구조체를 세포 내 표적 유전자에 통합하는 방법, 또는 세포에서 인자 IX를 발현하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 대상체에서 인자 IX 결핍을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 이러한 조성물에서, 조성물은 대상체에서 B형 혈우병을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 이러한 조성물에서, 세포는 신생아 세포이다. 일부 이러한 조성물에서, 신생아 세포는 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 조성물에서, 신생아 세포는 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 신생아 세포는 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 신생아 세포는 출생 후 4주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 조성물에서, 세포는 신생아 세포가 아니다. 일부 이러한 조성물에서, 대상체는 신생아 대상체이다. 일부 이러한 조성물에서, 신생아 대상체는 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체이다. 일부 이러한 조성물에서, 신생아 대상체는 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체이다. 일부 이러한 조성물에서, 신생아 대상체는 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체이다. 일부 이러한 조성물에서, 신생아 대상체는 출생 후 4주 이내인 인간 신생아 대상체이다. 일부 이러한 조성물에서, 대상체는 신생아 대상체가 아니다.

[0150] 또 다른 양태에서, 상기 조성물 중 임의의 것을 포함하는 세포가 제공된다. 일부 이러한 세포에서, 핵산 구조체는 내인성 표적 유전자 좌위에 통합되며, 여기서 인자 IX 단백질은 내인성 표적 유전자 좌위로부터 발현되거나, 여기서 핵산 구조체는 내인성 *알부민* 유전자좌의 인트론 1에 통합되고, 여기서 인자 IX 단백질은 내인성 *알부민* 유전자좌로부터 발현된다. 일부 이러한 세포는 인간 세포이다. 일부 이러한 세포는 간 세포(예를 들어, 인간 간 세포)이다. 임의로, 간 세포는 간세포이다. 일부 이러한 세포에서, 세포는 신생아 세포이다. 일부 이러한 세포에서, 신생아 세포는 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 세포에서, 신생아 세포는 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 세포에서, 신생아 세포는 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 세포에서, 신생아 세포는 출생 후 4주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 세포에서, 세포는 신생아 세포가 아니다. 일부 이러한 세포에서, 세포는 생체외 또는 시험관내에 존재한다. 일부 이러한 세포에서, 세포는 생체내에 존재한다.

[0151] 또 다른 양태에서, *인자 9* 핵산을 세포 내에 도입하는 방법, *인자 9* 핵산 구조체를 세포 내 표적 유전자에 통합하는 방법, 및 세포에서 인자 IX를 발현하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 방법은 상기 조성물 중 임의의 것을 세포에 투여하는 단계를 포함하는, *인자 9* 핵산을 세포 내에 도입하기 위한 것이다. 일부 이러한 방법은 상기 조성물 중 임의의 것을 세포에 투여하는 단계를 포함하는, *인자 9* 핵산 구조체를 세포 내 표적 유전자에 통합하기 위한 것이며, 여기서 뉴클레아제 작용제는 표적 유전자 내의 뉴클레아제 표적 부위를 절단하여 절단 부위를 생성하고, 핵산 구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 표적 유전자를 생성하고, 인자 IX 단백질이 변형된 표적 유전자로부터 발현된다. 일부 이러한 방법은 상기 조성물 중 임의의 것을 세포에 투여하는 단계를 포함하는, 세포에서 인자 IX를 발현하기 위한 것이며, 여기서 뉴클레아제 작용제는 표적 유전자 내의 뉴클레아제 표적 부위를 절단하여 절단 부위를 생성하고, 핵산 구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 표적 유전자를 생성하고, 인자 IX 단백질이 변형된 표적 유전자로부터 발현된다.

[0152] 일부 이러한 방법에서, 뉴클레아제 작용제는 (a) Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산; 및 (b) 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함하며, 여기서 가이드 RNA는 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 DNA-표적화 세그먼트를 포함하고, 여기서 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합하고 Cas 단백질을 가이드 RNA 표적 서열로 표적화한다.

[0153] 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체, Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산, 및 가이드 RNA 또는 가이

드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA가 동시에 투여된다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산 및 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA와 동시에 투여되지 않는다.

[0154] 일부 이러한 방법에서, 표적 유전자는 *알부민* 유전자이고, 뉴클레아제 표적 부위는 *알부민* 유전자의 인트론 1에 존재한다. 일부 이러한 방법에서, 세포는 간 세포이다. 일부 이러한 방법에서, 세포는 간세포이다. 일부 이러한 방법에서, 세포는 인간 세포(예를 들어, 인간 간 세포)이다. 일부 이러한 방법에서, 세포는 신생아 세포이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포는 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포는 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포는 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포는 출생 후 4주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 방법에서, 세포는 신생아 세포가 아니다. 일부 이러한 방법에서, 세포는 생체내에 존재한다. 일부 이러한 방법에서, 세포는 시험관내 또는 생체외에 존재한다.

[0155] 또 다른 양태에서, 대상체에서 인자 IX 결핍을 치료하는 방법, 대상체에서 B형 혈우병을 치료하는 방법, 및 B형 혈우병을 갖는 대상체에서 자연적 출혈을 예방 또는 억제하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 방법은 상기 조성물 중 임의의 것을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 인자 IX 결핍을 치료하기 위한 것이다. 일부 방법은 상기 조성물 중 임의의 것을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 B형 혈우병을 치료하기 위한 것이다. 일부 방법은 상기 조성물 중 임의의 것을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, B형 혈우병을 갖는 대상체에서 자연적 출혈을 예방 또는 억제하기 위한 것이다.

[0156] 일부 이러한 방법에서, B형 혈우병은 경증 B형 혈우병이다. 일부 이러한 방법에서, B형 혈우병은 중등도 B형 혈우병이다. 일부 이러한 방법에서, B형 혈우병은 중증 B형 혈우병이다.

[0157] 일부 이러한 방법에서, 뉴클레아제 작용제는 (a) Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산; 및 (b) 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함하며, 여기서 가이드 RNA는 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 DNA-표적화 세그먼트를 포함하고, 여기서 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합하고 Cas 단백질을 가이드 RNA 표적 서열로 표적화한다. 일부 이러한 방법에서, 가이드 RNA 표적 서열은 *알부민* 유전자의 인트론 1에 존재한다.

[0158] 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체, Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산, 및 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA가 동시에 투여된다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산 및 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA와 동시에 투여되지 않는다.

[0159] 일부 이러한 방법에서, 대상체는 인간 대상체이다. 일부 이러한 방법에서, 대상체는 신생아 대상체이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 대상체는 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 대상체는 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 대상체는 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 대상체는 출생 후 4주 이내인 인간 신생아 대상체이다. 일부 이러한 방법에서, 대상체는 신생아 대상체가 아니다.

[0160] 일부 이러한 방법에서, 방법은 대상체에서 순환 인자 IX 단백질의 치료적 유효 수준을 초래한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 대상체에서 순환 인자 IX 응고 활성의 치료적 유효 수준을 초래한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 인자 IX 단백질을 인코딩하는 에피솜 발현 벡터를 대조군 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법과 비교하여 대상체에서 인자 IX 단백질의 발현을 증가시킨다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 인자 IX 단백질을 인코딩하는 에피솜 발현 벡터를 대조군 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법과 비교하여 대상체에서 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 증가시킨다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 대상체에서 적어도 약 1 μg/mL, 적어도 약 2 μg/mL, 적어도 약 3 μg/mL, 적어도 약 4 μg/mL, 또는 적어도 약 5 μg/mL의 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 초래한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 대상체에서 적어도 약 5 μg/mL의 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 초래한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 대상체에서 약 1 μg/mL 내지 약 10 μg/mL의 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 초래한다.

[0161] 일부 이러한 방법에서, 방법은 정상의 적어도 약 1%, 정상의 적어도 약 5%, 정상의 적어도 약 10%, 정상의 적어도 약 15%, 정상의 적어도 약 20%, 정상의 적어도 약 25%, 정상의 적어도 약 30%, 정상의 적어도 약 35%, 정상의 적어도 약 40%, 정상의 적어도 약 45%, 또는 정상의 적어도 약 50%의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성

수준을 달성한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 정상의 약 40% 내지 약 150% 또는 약 40% 내지 약 100%의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성한다.

[0162] 일부 이러한 방법에서, (I) 대상체는 중증 혈우병을 갖고, 방법은 정상의 적어도 약 1% 또는 약 1% 초과의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하거나; (II) 대상체는 중등도 혈우병을 갖고, 방법은 정상의 적어도 약 5% 또는 약 5% 초과의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성하거나; 또는 (III) 대상체는 경증 혈우병을 갖고, 방법은 정상의 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 또는 약 50% 초과의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성한다.

[0163] 일부 이러한 방법에서, 방법은 정상의 적어도 약 15%의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성한다.

[0164] 일부 이러한 방법에서, 방법은 정상의 약 300% 미만, 약 250% 미만, 약 200% 미만, 또는 약 150% 미만의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성한다.

[0165] 일부 이러한 방법에서, 방법은 대상체의 기준 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준보다 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 적어도 약 1%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 증가시킨다.

[0166] 일부 이러한 방법에서, 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준은 조성물을 투여한 후 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 1년, 또는 적어도 약 2년 동안 지속된다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월차에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 50%이다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 1년차에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 50%이다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월차에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 60%이다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 2년차에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 50%이다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 2년차에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 60%이다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월차에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 60%이다.

[0167] 일부 이러한 방법에서, 방법은 조성물을 대상체에 투여하기 전에 대상체에서 기존의 AAV 면역력을 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 기존의 AAV 면역력은 기존의 AAV8 면역력이다. 일부 이러한 방법에서, 기존의 AAV 면역력을 평가하는 것은 총 항체 면역 검정 또는 중화 항체 검정을 사용하여 면역원성을 평가하는 것을 포함한다.

[0168] 또한 핵산 인코딩 인자 IX 단백질을 신생아 세포, 신생아 세포의 집단, 또는 신생아 대상체의 표적 게놈 유전자좌에 삽입하거나 신생아 세포, 신생아 세포 집단, 또는 신생아 대상체의 표적 게놈 유전자좌로부터의 핵산 인코딩 인자 IX 단백질을 발현하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 또한 인자 IX 결핍을 치료하는 방법, 자연적 출혈을 예방 또는 억제하는 방법, 및 대상체(예를 들어, 신생아 대상체)에서 B형 혈우병을 치료하는 방법이 제공된다. 또한 표적 게놈 유전자좌에 삽입된 핵산 인코딩 인자 IX 단백질을 포함하는 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단이 제공된다.

[0169] 일 양태에서, 핵산 인코딩 인자 IX 단백질을 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단 내 표적 게놈 유전자좌에 삽입하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 방법은 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에 (a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및 (b) 뉴클레아제 작용제 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고, 여기서 뉴클레아제 작용제는 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 핵산 구조체는 표적 게놈 유전자좌에 삽입된다. 또 다른 양태에서, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서 표적 게놈 유전자좌로부터 인자 IX 단백질을 발현하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 방법은 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에 (a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및 (b) 뉴클레아제 작용제 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제

표적 부위를 표적화하고, 여기서 뉴클레아제 작용제는 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 핵산 구조체는 표적 게놈 유전자좌에 삽입되어 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성하고, 인자 IX 단백질은 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현된다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포는 간 세포이거나, 신생아 세포의 집단은 간 세포의 집단이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포는 간세포이거나, 신생아 세포의 집단은 간세포의 집단이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포는 인간 세포이거나, 신생아 세포의 집단은 인간 세포의 집단이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 24주 이내인 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 12주 이내인 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 8주 이내인 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 4주 이내인 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포는 시험관내 또는 생체외에 존재하거나, 신생아 세포의 집단은 시험관내 또는 생체외에 존재한다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포는 신생아 대상체의 생체내에 존재하거나, 신생아 세포의 집단은 신생아 대상체의 생체내에 존재한다.

[0170] 또 다른 양태에서, 인자 IX 단백질을 인코딩하는 핵산을 신생아 대상체 내 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단 내 표적 게놈 유전자좌에 삽입하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 방법은 신생아 대상체에 (a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및 (b) 뉴클레아제 작용제 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고, 여기서 뉴클레아제 작용제는 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 핵산 구조체는 표적 게놈 유전자좌에 삽입된다. 또 다른 양태에서, 신생아 대상체 내 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서 표적 게놈 유전자좌로부터 인자 IX 단백질을 발현하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 방법은 신생아 대상체에 (a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및 (b) 뉴클레아제 작용제 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고, 여기서 뉴클레아제 작용제는 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 핵산 구조체는 표적 게놈 유전자좌에 삽입되어 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성하고, 인자 IX 단백질은 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현된다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포는 간 세포이거나, 신생아 세포의 집단은 간 세포의 집단이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포는 간세포이거나, 신생아 세포의 집단은 간세포의 집단이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 세포는 인간 세포이거나, 신생아 세포의 집단은 인간 세포의 집단이다.

[0171] 또 다른 양태에서, 치료하는 방법을 필요로 하는 신생아 대상체에서 인자 IX 결핍을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 방법은 신생아 대상체에 (a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및 (b) 뉴클레아제 작용제 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고, 여기서 뉴클레아제 작용제는 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 핵산 구조체는 표적 게놈 유전자좌에 삽입되어 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성하고, 인자 IX 단백질은 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현된다. 또 다른 양태에서, B형 혈우병을 갖는 신생아 대상체에서 자연적 출혈을 예방 또는 억제하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 방법은 신생아 대상체에 (a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및 (b) 뉴클레아제 작용제 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고, 여기서 뉴클레아제 작용제는 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 핵산 구조체는 표적 게놈 유전자좌에 삽입되어 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성하고, 인자 IX 단백질은 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현되고 신생아 대상체에서 자연적 출혈을 예방 또는 억제한다. 일부 이러한 방법에서, 대상체는 B형 혈우병을 갖는다. 또 다른 양태에서, 치료하는 방법을 필요로 하는 신생아 대상체에서 B형 혈우병을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 이러한 방법은 신생아 대상체에 (a) 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체; 및 (b) 뉴클레아제 작용제 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌 내 뉴클레아제 표적 부위를 표적화하고, 여기서 뉴클레아제 작용제는 뉴클레아제 표적 부위를 절단하고, 핵산 구조체는 표적 게놈 유전자좌에 삽입되어 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성하고, 인자 IX 단백질은 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현되어 B형 혈우병을 치료한다. 일부 이러한 방법에서, 대상체는 경증 B형 혈우병을 갖는다. 일부 이러한 방법에서, 대상체는 중등도 B형 혈우병을 갖는다. 일부 이러한 방법에서, 대상체는 중증 B형 혈우병을 갖는다.

[0172] 일부 이러한 방법에서, 신생아 대상체는 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 대상체는 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 대상체는 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체이다. 일부 이러한 방법에서, 신생아 대상체는 출생 후 4주 이내인 인간 신

생아 대상체이다.

[0173] 일부 이러한 방법에서, 방법은 인자 IX 단백질을 인코딩하는 에피솜 발현 벡터를 대조군 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법과 비교하여 대상체에서 인자 IX 단백질의 발현을 증가시킨다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 인자 IX 단백질을 인코딩하는 에피솜 발현 벡터를 대조군 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법과 비교하여 대상체에서 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 증가시킨다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 대상체에서 적어도 약 1 μg/mL, 적어도 약 2 μg/mL, 적어도 약 3 μg/mL, 적어도 약 4 μg/mL, 또는 적어도 약 5 μg/mL의 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 초래한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 대상체에서 적어도 약 5 μg/mL의 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 초래한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 대상체에서 약 1 μg/mL 내지 약 10 μg/mL의 인자 IX 단백질의 혈청 수준을 초래한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 인자 IX 단백질의 대상체의 기준 발현보다 인자 IX 단백질의 발현을 적어도 약 1%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 증가시킨다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 인자 IX 단백질의 대상체의 기준 혈청 수준보다 혈청 내 인자 IX 단백질의 수준을 적어도 약 1%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 증가시킨다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월차에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 50%이다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 1년차에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 50%이다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월차에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 60%이다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 2년차에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 50%이다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 2년차에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 60%이다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월차에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 인자 IX 단백질의 발현 또는 활성의 적어도 60%이다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 대상체에서 순환 인자 IX 단백질의 치료적 유효 수준을 초래한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 대상체에서 순환 인자 IX 응고 활성의 치료적 유효 수준을 초래한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 정상의 적어도 약 1%, 정상의 적어도 약 5%, 정상의 적어도 약 10%, 정상의 적어도 약 15%, 정상의 적어도 약 20%, 정상의 적어도 약 25%, 정상의 적어도 약 30%, 정상의 적어도 약 35%, 정상의 적어도 약 40%, 정상의 적어도 약 45%, 또는 정상의 적어도 약 50%의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 정상의 약 40% 내지 약 150% 또는 약 40% 내지 약 100%의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성한다. 일부 이러한 방법에서, 대상체는 중증 혈우병을 갖고, 방법은 정상의 적어도 약 1% 또는 약 1% 초과의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성한다. 일부 이러한 방법에서, 대상체는 중등도 혈우병을 갖고, 방법은 정상의 적어도 약 5% 또는 약 5% 초과의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성한다. 일부 이러한 방법에서, 대상체는 경증 혈우병을 갖고, 방법은 정상의 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 또는 약 50% 초과의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 정상의 적어도 약 15%의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 정상의 약 300% 미만, 약 250% 미만, 약 200% 미만, 또는 약 150% 미만의 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 달성한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 대상체의 기준 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준보다 순환 인자 IX 단백질 또는 응고 활성 수준을 적어도 약 1%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 증가시킨다. 일부 이러한 방법에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0174] 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산과 동시에 투여된다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산과 동시에 투여되지 않는다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 전에 투여된다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 후에 투여된다.

[0175] 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩한다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열: (I)은 서열번호 166, 165, 164, 및 167 내지 171 중 임의의 하나와 적어도 95% 동일하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 CpG-고갈되고, 코돈-최적화되고, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; (II)는 서열번호 159, 160 및 161 중 임의의 하나와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열: (I)은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; (II)는 서열번호 165와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는 (III)은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열: (I)은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는 (II)은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈된다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166, 165, 또는 159를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166, 165, 또는 159로 이루어진다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166 또는 159를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166 또는 159로 이루어진다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어진다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어진다.

[0176] 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩 서열의 상류에 스플라이스 수용체를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩 서열의 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩 서열의 상류에 스플라이스 수용체를 포함하고, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩 서열의 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 비-상동성 말단 접합을 통해 표적 게놈 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 상동성-지향 수선을 통해 표적 게놈 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않는다.

[0177] 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 양방향 구조체이고, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 인자 IX 단백질 서열을 인코딩하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 방법에서, (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 95% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 방법에서, (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 95% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠

적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 방법에서, (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 방법에서, (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되고, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 방법에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈되고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈된다 일부 이러한 방법에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 방법에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩한다. 일부 이러한 방법에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어지고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어진다. 일부 이러한 방법에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어지고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어진다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 인자 IX 단백질 서열을 인코딩하며, 여기서 제1 폴리아데닐화 신호 및 제2 폴리아데닐화 신호는 상이하다.

[0178] 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 180 또는 이의 역보체를 포함한다.

[0179] 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA 또는 이중 가닥 DNA이다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA이다.

[0180] 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 핵산 벡터 또는 지질 나노입자 내에 있다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 핵산 벡터 내에 있다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 벡터는 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터이며, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 방법에서, AAV 벡터는 단일 가닥 AAV(ssAAV) 벡터이다. 일부 이러한 방법에서, AAV 벡터는 AAV8 벡터, AAV3B 벡터, AAV5 벡터, AAV6 벡터, AAV7 벡터, AAV9 벡터, AAVrh.74 벡터, 또는 AAVhu.37 벡터로부터 유래된다. 일부 이러한 방법에서, AAV 벡터는 재조합 AAV8(rAAV8) 벡터이다. 일부 이러한 방법에서, AAV 벡터는 단일 가닥 rAAV8 벡터이다.

[0181] 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단

백질 코딩 서열이고, 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

[0182] 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 일방향 구조체이다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고; 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않으며, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0183] 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA 또는 이중 가닥 DNA이다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 단일 가닥 DNA이다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 핵산 벡터 또는 지질 나노입자 내에 있다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 핵산 벡터 내에 있다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 벡터는 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터이며, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 방법에서, AAV 벡터는 단일 가닥 AAV(ssAAV) 벡터이다. 일부 이러한 방법에서, AAV 벡터는 AAV8 벡터, AAV3B 벡터, AAV5 벡터, AAV6 벡터, AAV7 벡터, AAV9 벡터, AAVrh.74 벡터, 또는 AAVhu.37 벡터로부터 유래된다. 일부 이러한 방법에서, AAV 벡터는 재조합 AAV8(rAAV8) 벡터이다. 일부 이러한 방법에서, AAV 벡터는 단일 가닥 rAAV8 벡터이다.

[0184] 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0185] 일부 이러한 방법에서, 표적 게놈 유전자좌는 *알부민* 유전자이며, 임의로 여기서 *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이다. 일부 이러한 방법에서, 뉴클레아제 표적 부위는 *알부민* 유전자의 인트론 1에 존재한다. 일부 이러한 방법에서, 뉴클레아제 작용제는 (a) 아연 집게 뉴클레아제(ZFN); (b) 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN); 또는 (c) (i) Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산; 및 (ii) 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함하며, 여기서 가이드 RNA는 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 DNA-

표적화 세그먼트를 포함하고, 여기서 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합하고 Cas 단백질을 가이드 RNA 표적 서열로 표적화한다.

[0186] 일부 이러한 방법에서, 뉴클레아제 작용제는 (a) Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산; 및 (b) 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함하며, 여기서 가이드 RNA는 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 DNA-표적화 세그먼트를 포함하고, 여기서 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합하고 Cas 단백질을 가이드 RNA 표적 서열로 표적화한다. 일부 이러한 방법에서, 가이드 RNA 표적 서열은 *알부민* 유전자의 인트론 1에 존재한다. 일부 이러한 방법에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이다. 일부 이러한 방법에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 어느 하나에 기재된 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함하며, 임의로 여기서 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 어느 하나에 기재된 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 어느 하나에 기재된 서열과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일하며, 임의로 여기서 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 어느 하나에 기재된 서열과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일하다. 일부 이러한 방법에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나를 포함하고, 임의로 여기서 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나로 이루어지며, 임의로 여기서 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나로 이루어진다. 일부 이러한 방법에서, 가이드 RNA는 서열번호 62 내지 서열번호 125 중 어느 하나를 포함하며, 임의로 여기서 가이드 RNA는 서열번호 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, 및 105 중 임의의 하나를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일하다. 일부 이러한 방법에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 36으로 이루어진다. 일부 이러한 방법에서, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함한다.

[0187] 일부 이러한 방법에서, 방법은 RNA 형태로 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 가이드 RNA는 적어도 하나의 변형을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 적어도 하나의 변형은 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 적어도 하나의 변형은 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 적어도 하나의 변형은 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음의 5개 뉴클레오티드 중 하나 이상에 변형을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 적어도 하나의 변형은 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 5개 뉴클레오티드 중 하나 이상에 변형을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 적어도 하나의 변형은 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 적어도 하나의 변형은 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 적어도 하나의 변형은 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 적어도 하나의 변형은 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 적어도 하나의 변형은 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 가이드 RNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)이다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 RNA 형태의 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0188] 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질이다. 일부 이러한 방법에서, Cas9 단백질은 *스트렙토콕커스 피오게네스* Cas9 단백질, *스타필로콕커스 아우레우스* Cas9 단백질, *캄필로박터 제주니* Cas9 단백질, *스트렙토콕커스 써모필루스* Cas9 단백질, 또는 *네이세리아 메닌지티디스* Cas9 단백질로부터 유래한다. 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질은 *스트렙토콕커스 피오게네스* Cas9 단백질이거나 이로부터 유래된다. 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질은 서열번호 11에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 포유류 세포 또는 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 Cas 단백질을

인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 적어도 하나의 변형을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 변형된 우리딘을 하나 이상의 또는 모든 우리딘 위치에 포함하도록 변형된다. 일부 이러한 방법에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘이다. 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환된다. 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 변형된 우리딘을 하나 이상의 또는 모든 우리딘 위치에 포함하도록 변형된다. 일부 이러한 방법에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘이다. 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환된다. 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 5' 캡을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다.

[0189] 일부 이러한 방법에서, 방법은 RNA 형태의 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 방법은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 RNA 형태의 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 방법은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 방법은 RNA 형태의 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 방법은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 여기서 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호

166을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 여기서 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0190] 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질 또는 Cas 단백질과 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 방법에서, 지질 나노입자는 양이온성 지질, 중성 지질, 헬퍼 지질, 및 스텔스 지질을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 양이온성 지질은 지질 ((9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트)이다. 일부 이러한 방법에서, 중성 지질은 디스테아로일포스파티딜콜린 또는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC)이다. 일부 이러한 방법에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이다. 일부 이러한 방법에서, 스텔스 지질은 PEG2k-DMG이다. 일부 이러한 방법에서, 양이온성 지질은 지질 A이고, 중성 지질은 DSPC이고, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이고, 스텔스 지질은 PEG2k-DMG이다. 일부 이러한 방법에서, 지질 나노입자는 하기 몰비로 4개의 지질을 포함한다: 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG.

[0191] 일부 이러한 방법에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 방법은 RNA 형태의 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100을 포함하며, 여기서 방법은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 방법에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 방법은 RNA 형태의 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 방법은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘 또는 N1-메틸-슈도우리딘, 임의로 N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 방법에서, *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이며, 여기서 방법은 RNA 형태의 가이드 RNA를 투여하는 단계를 포함하고, 가이드 RNA는 서열번호 100을 포함하고, 가이드 RNA는 (i) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (ii) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합; (iii) 가이드 RNA의 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드; 및 (iv) 가이드 RNA의 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 방법은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 서열번호 226, 225, 또는 12에 기재된 서열을 포함하고, Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 슈도우리딘으로 완

전히 치환되고, 5' 캡을 포함하고, 폴리(A) 테일을 포함하며, 여기서 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는, 임의로 약 50mol%의 지질 A, 약 9mol%의 DSPC, 약 38mol%의 콜레스테롤, 및 약 3mol%의 PEG2k-DMG라는 몰비로 지질 A, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 나노입자와 관련이 있다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 여기서 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 여기서 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 조성물에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩을 포함하는 일방향 구조체이며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 스플라이스 수용체, 인자 IX 단백질 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함하고, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159 또는 서열번호 166을 포함하고, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않고, 여기서 핵산 구조체는 단일 가닥 rAAV8 벡터 내에 있고, 임의로 여기서 핵산 구조체는 각각의 단부 상 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹되고, 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 또는 임의로 여기서 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 임의로 여기서 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은

서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다.

[0192] 일부 이러한 방법에서, 방법은 조성물을 대상체에 투여하기 전에 대상체에서 기존의 AAV 면역력을 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 기존의 AAV 면역력은 기존의 AAV8 면역력이다. 일부 이러한 방법에서, 기존의 AAV 면역력을 평가하는 것은 총 항체 면역 검정 또는 중화 항체 검정을 사용하여 면역원성을 평가하는 것을 포함한다.

[0193] 다른 양태에서, 임의의 상기 방법에 의해 제조된 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단이 제공된다. 또 다른 양태에서, 표적 게놈 유전자좌에 삽입된 인자 IX 단백질 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조체를 포함하는 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단이 제공된다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 신생아 세포는 간 세포이거나, 신생아 세포의 집단은 간 세포의 집단이다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 신생아 세포는 간세포이거나, 신생아 세포의 집단은 간세포의 집단이다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 신생아 세포의 집단은 인간 세포의 집단이다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 24주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 12주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 8주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단은 출생 후 4주 이내인 인간 신생아 대상체로부터 유래된다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 신생아 세포는 시험관내 또는 생체외에 존재하거나, 신생아 세포의 집단은 시험관내 또는 생체외에 존재한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 신생아 세포는 대상체의 생체내에 존재하거나, 신생아 세포의 집단은 생체내에 존재한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질이 발현된다.

[0194] 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열:(I)은 서열번호 166, 165, 164, 및 167 내지 171 중 임의의 하나와 적어도 95% 동일하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 CpG-고갈되고, 코돈-최적화되고, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; (II)는 서열번호 159, 160 및 161 중 임의의 하나와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열: (I)은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; (II)는 서열번호 165와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는 (III)은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열: (I)은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니거나; 또는 (II)은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈된다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166, 165, 또는 159를 포함한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166, 165, 또는 159로 이루어진다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166 또는 159를 포함한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166 또는 159로 이루어진다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단

백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어진다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어진다.

[0195] 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩 서열의 상류에 스플라이스 수용체를 포함한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩 서열의 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩 서열의 상류에 스플라이스 수용체를 포함하고, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질 코딩 서열의 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않으며, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0196] 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 핵산 구조체는 양방향 구조체이고, 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 핵산 구조체는 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 포함한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 인자 IX 단백질 서열을 인코딩하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 95% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 95% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, (i) CpG-고갈되거나; (ii) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되거나; 또는 (iii) CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166과 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 코돈-최적화되고, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고; (ii) 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159와 적어도 99% 동일하고, CpG-고갈되고, 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열을 돌연변이시키도록 변형되며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈되고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 하나를 제외한 모든 CpG 디뉴클레오티드가 제거되거나 완전히 CpG 고갈된다 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하며, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99% 동일한 인자 IX 단백질을 인코딩하고, 임의로 여기서 인자 IX 단백질은 과활성 인자 IX 변이체가 아니다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 195를 포함하는 인자 IX 단백질을 인코딩한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어지고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어진다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166으로 이루어지고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159로 이루어진다. 일부 이러한 신생아 세포 또는

신생아 세포의 집단에서, 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함한다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열 및 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 인자 IX 단백질 서열을 인코딩하며, 여기서 제1 폴리아데닐화 신호 및 제2 폴리아데닐화 신호는 상이하다.

[0197] 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 핵산 구조체는 양방향 구조체이며, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열이고, 양방향 구조체는 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체를 추가로 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 5'부터 3'까지: 제1 스플라이스 수용체, 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열, 제1 폴리아데닐화 신호, 제2 폴리아데닐화 신호의 역보체, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하고, 여기서 (i) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하거나; (ii) 제1 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 166을 포함하고, 제2 인자 IX 단백질 코딩 서열은 서열번호 159를 포함하며, 여기서 핵산 구조체는 인자 IX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 여기서 인자 IX 단백질 코딩 서열은 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 핵산 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 180 또는 이의 역보체를 포함한다.

[0198] 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 표적 게놈 유전자좌는 *알부민* 유전자이며, 임의로 여기서 *알부민* 유전자는 인간 *알부민* 유전자이다. 일부 이러한 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단에서, 뉴클레아제 표적 부위는 *알부민* 유전자의 인트론 1에 존재한다.

도면의 간단한 설명

[0199] **도 1**은 응고 캐스케이드의 개략도를 나타낸다.

도 2는 *알부민(ALB)* 유전자좌에서 양방향 AAV 삽입 템플릿의 CRISPR/Cas9-매개 삽입에 대한 개략도를 나타낸다. Cas9 절단 부위가 가위로 표시되어 있는 인간 *ALB* 유전자좌가 도시되어 있다. F9 DNA 삽입 템플릿 내 스플라이스 수용체 부위 플랭킹(flanking) *인자 9(F9)* 이식유전자가 도시되어 있다. 각각의 *F9* 이식유전자에 이어서 전사를 종결시키는 폴리아데닐화 서열이 도시되어 있다. 내인성 *ALB* 프로모터에 의해 구동되는 삽입 및 전사 후, 점선으로 도해된 *ALB* 엑손 1 및 삽입된 *F9* DNA 템플릿 사이의 스플라이싱이 발생하여 하이브리드 *ALB-F9* mRNA를 생성한다. ALB 신호 펩티드(sp; 엑손 1에 인코딩되고 괄호 안에 도해됨)는 인자 IX(FIX)의 분비를 촉진하고, FIX 프로펩티드와 함께 제거되어, 단백질 성숙 동안 혈장에서 성숙한 야생형 FIX를 생성한다.

도 3은 인간 *ALB* 인트론 1을 표적화하는 Cas9 mRNA 및 sgRNA 9860을 함유하는 지질 나노입자인 개발 후보 LNPF9과 인서트 30에 의해 인코딩된 양방향 *F9* 삽입 템플릿으로 포장된 재조합 AAV8(rAAV8) 캡시드인 REGV131을 나타낸다.

도 4는 인서트 30에 의해 인코딩된 양방향 *F9* 삽입 템플릿에 대한 개략도를 나타낸다.

도 5는 시험관내 PHH 중 FIX 발현을 나타낸다. PHH를 96-웰 플레이트에 접종한 다음, rAAV8 내로 포장된 표시된 삽입 템플릿(인서트 72, 인서트 29, 또는 인서트 30)의 일정한 6.0E+4vg/세포로 처리하였다. Cas9 mRNA 및 4개의 sgRNA 표적화 *ALB* 인트론 1(g9860, g9857, g9874, 및 g9844)중 하나를 포함하는 LNP를 3배 연속 희석 시리즈에 걸쳐 1000ng/ML 내지 4.1ng/ML 범위의 농도로 웰을 복제하기 위해 첨가하였다. 세포를 3일차 및 5일차에 배지 변화와 함께 37℃에서 인큐베이션하고, 8일차에 hFIX 발현을 hFIX ELISA를 통해 측정하였다.

도 6는 시험관내 PCH 중 FIX 발현을 나타낸다. PCH를 96-웰 플레이트에 접종한 다음, rAAV8 내로 포장된 표시된 삽입 템플릿(인서트 72, 인서트 29, 또는 인서트 30)의 일정한 6.0E+4vg/세포로 처리하였다. Cas9 mRNA 및 4개의 sgRNA 표적화 *ALB* 인트론 1(g9860, g9857, g9874, 및 g9844)중 하나를 포함하는 LNP를 3배 연속 희석 시리즈에 걸쳐 1000ng/mL 내지 4.1ng/mL 범위의 농도로 웰을 복제하기 위해 첨가하였다. 세포를 3일차 및 5일차에 배지 변화와 함께 37℃에서 인큐베이션하고, 8일차에 hFIX 발현을 hFIX ELISA를 통해 측정하였다.

도 7은 LNPF9 및/또는 REGV131으로 처리된 $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스로부터의 혈장 중 hFIX의 측정된 발현을 나타낸다. 혈장을 지정된 시점에서 마우스로부터 분리하고, Meso Scale Device(MSD) 플랫폼에서 hFIX(AHIX-5041; Haematologic Technologies)에 특이적인 검출 항체를 사용하여 hFIX 수준에 대해 정량화하였다.

도 8a는 LNPF9 및/또는 REGV131으로 처리된 $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스로부터의 혈장 중 상대적인 hFIX 활성을 나타

낸다. 활성은 FIX 활성을 특이적으로 측정하는 발색 검정에 기초하였다.

도 8b는 LNPF9 및/또는 REGV131으로 처리된 *ALB*$^{hu/hu}$ / *F9*$^{-/-}$ 마우스로부터의 혈장 중 상대적인 hFIX 활성에 대한 hFIX 발현의 상관관계를 나타낸다.

도 9는 비-CpG-고갈된 *F9* 삽입 템플릿(인서트 72) 및 CpG-고갈된 *F9* 삽입 템플릿(인서트 27, 인서트 28, 인서트 29, 및 인서트 30)에 대한 1차 인간 형질세포양 DC-기반 검정에서 IFN-I 반응을 나타낸다.

도 10a는 LNPF9(g9860) 및/또는 REGV131(인서트 30) 또는 REGV013(인서트 72)로 처리된 *시노몰구스(Cynomolgus)* 원숭이로부터의 혈장 중 hFIX의 측정된 발현을 나타낸다. 혈장을 지정된 시점에서 원숭이로부터 분리하고, Meso Scale Device(MSD) 플랫폼에서 hFIX(AHIX-5041; Haematologic Technologies)에 특이적인 검출 항체를 사용하여 hFIX 수준에 대해 정량화하였다.

도 10b는 LNPF9 및/또는 REGV131 또는 REGV013로 처리된 원숭이로부터의 혈장에서 hFIX 활성에 대한 평가된 hFIX 수준의 상관관계를 나타낸다. 인간 FIX(hFIX) 단백질은 hFIX(AHIX-5041; Haematologic Technologies)에 특이적인 항체를 갖는 풀다운(pull-down) 기법을 사용하여 원숭이 혈장으로부터 분리되었고, hFIX 기능 활성은 발색 FIX 활성 검정(BioPhen FIX, hypen BioMed)으로 결정되었다.

도 10c는 6개월에 걸쳐 LNPF9(g9860) 및/또는 REGV131(인서트 30)으로 처리된 *시노몰구스* 원숭이로부터의 혈장 중 hFIX의 측정된 발현을 나타낸다. 혈장을 지정된 시점에서 원숭이로부터 분리하고, Meso Scale Device(MSD) 플랫폼에서 hFIX(AHIX-5041; Haematologic Technologies)에 특이적인 검출 항체를 사용하여 hFIX 수준에 대해 정량화하였다.

도 11은 성체 및 신생 마우스에서 시험된 상이한 인간 인자 IX(hFIX) 삽입 템플릿을 설명하는 개략도를 나타낸다.

도 12a는 신생 마우스(n = 그룹당 4마리 내지 10마리; 수컷 및 암컷) 및 성체 마우스(n = 그룹당 5마리; 암컷)의 에피솜 hFIX(Episome), LNP-g666 + hFIX-HDR-500 템플릿(HDR500), LNP-g666 + hFIX-HDR-800 템플릿(HDR800), LNP-g666 + hFIX-HDR-800 템플릿(NHEJ)의 투여 후 상이한 시점에서 hFIX 혈장 수준을 나타낸다. 신생 마우스에서의 투여는 P0 또는 P1에서 발생하였다. 식염수가 주사된 마우스는 음성 대조군으로서 사용되었다. 데이터는 로그 스케일로 나타나 있다. **도 12b**는 신생 마우스(n = 그룹당 4마리 내지 10마리; 수컷 및 암컷)의 에피솜 hFIX(Episome), LNP-g666 + hFIX-HDR-500 템플릿(HDR500), LNP-g666 + hFIX-HDR-800 템플릿(HDR800), LNP-g666 + hFIX-HDR-800 템플릿(NHEJ)의 투여 후 상이한 시점에서 hFIX 혈장 수준을 나타낸다. 신생 마우스에서의 투여는 P0 또는 P1에서 발생하였다. 식염수가 주사된 마우스는 음성 대조군으로서 사용되었다. 데이터는 선형 스케일로 나타나 있다.

도 13a 및**13b**는 145 bp ITR, 141 bp ITR, 및 130 bp ITR 플라스미드를 사용하여 생성된 재조합 AAV8 hFIX 바이러스가 1차 인간 간세포에서 유사하게 수행되는 것을 나타낸다. hFIX 발현은 7일차에 ELISA에 의해 측정되었다.

도 14a는 LNPF9 및/또는 REGV131으로 처리된 *ALB*$^{hu/hu}$ / *F9*$^{-/-}$ 마우스로부터의 혈장 중 hFIX의 측정된 발현을 나타낸다. 혈장을 지정된 시점에서 마우스로부터 분리하고, Meso Scale Device(MSD) 플랫폼에서 hFIX(AHIX-5041; Haematologic Technologies)에 특이적인 검출 항체를 사용하여 hFIX 수준에 대해 정량화하였다. 나타낸 값은 평균 +SEM이다.

도 14b는 치료 후 6주차에 LNPF9 및/또는 REGV131으로 처리된 *ALB*$^{hu/hu}$ / *F9*$^{-/-}$ 마우스로부터의 혈장 중 hFIX의 측정된 발현을 나타낸다.

도 14c는 치료 후 다양한 시점에서 LNPF9 및/또는 REGV131의 용량의 상이한 조합으로 처리된 *ALB*$^{hu/hu}$ / *F9*$^{-/-}$ 마우스로부터의 혈장 중 hFIX의 측정된 발현을 나타낸다.

도 15a는 LNPF9 및/또는 REGV131으로 처리된 *ALB*$^{hu/hu}$ / *F9*$^{-/-}$ 마우스로부터의 혈장 중 상대적인 hFIX 활성을 나타낸다. 지정된 시점에서 마우스로부터 혈장을 분리하였다. 활성은 FIX 활성을 특이적으로 측정하는 발색 검정에 기초하였다.

도 15b는 치료 후 6주차에 LNPF9 및/또는 REGV131으로 처리된 *ALB*$^{hu/hu}$ / *F9*$^{-/-}$ 마우스로부터의 혈장 중 상대적인

hFIX 활성을 나타낸다.

도 15c는 LNPF9 및/또는 REGV131으로 처리된 $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스로부터의 혈장 중 상대적인 hFIX 활성에 대한 hFIX 발현의 상관관계를 나타낸다. 데이터는 수준 대 활성의 상관관계로서 개별 동물에 대해 표시된다.

도 16은 처리 후 4주차에 LNPF9 및/또는 REGV131로 처리된 $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스에서 테일 절단 후 출혈 시간을 나타낸다. 나타낸 값은 평균 +SEM이다.

도 17은 처리 후 6주차에 LNPF9 및/또는 REGV131로 처리된 $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스로부터의 희석되지 않은 혈장 중 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT)을 나타낸다. 나타낸 값은 평균 +SEM이다.

도 18은 LNPF9 및/또는 REGV131로 처리된 $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스로부터 생성된 마우스-생성 인간 FIX가 1단계 응고/aPTT 검정에서 정제된 인간 FIX와 유사한 특이적 활성을 보인다는 것을 나타낸다.

도 19은 LNPF9 및/또는 REGV131로 처리된 $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스로부터 생성된 마우스-생성 인간 FIX가 2단계 발색 기질(CS: chromogenic substrate) 검정에서 정제된 인간 FIX와 유사한 특이적 활성을 보인다는 것을 나타낸다.

정의

본원에서 상호 교환적으로 사용되는 용어인 "단백질", "폴리펩티드" 및 "펩티드"는 코딩된 및 비-코딩된 아미노산 및 화학적으로 또는 생화학적으로 변형되거나 유도체화된 아미노산을 비롯한 임의의 길이의 아미노산의 중합체 형태를 포함한다. 용어는 또한 변형된 펩티드 백본을 갖는 폴리펩티드와 같은 변형된 중합체를 포함한다. 용어 "도메인"은 특정 기능 또는 구조체를 갖는 단백질 또는 폴리펩티드의 임의의 부분을 지칭한다.

단백질은 "N-말단"과 "C-말단"을 갖는 것으로 언급된다. 용어 "N-말단"은 유리 아민기(-NH2)를 갖는 아미노산에 의해 종결된 단백질 또는 폴리펩티드의 시작부에 관한 것이다. 용어 "C-말단"은 유리 카르복실기(-COOH)에 의해 종결된 아미노산 사슬(단백질 또는 폴리펩티드)의 단부에 관한 것이다.

본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어인 "핵산", 및 "폴리뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 또는 이의 유사체 또는 변형된 버전을 비롯한 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 포함한다. 이들은 단일 가닥, 이중 가닥 및 다중 가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 및 퓨린 염기, 피리미딘 염기 또는 기타 자연, 화학적으로 변형된, 생화학적으로 변형된, 비자연, 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하는 중합체를 포함한다.

핵산은 "5' 말단" 및 "3' 말단"을 갖는 것으로 언급되는데, 이는, 하나의 모노뉴클레오티드 펜토스 고리의 5' 포스페이트가 포스포디에스테르 결합을 통해 일 방향으로 이의 이웃 3' 산소에 부착되는 방식으로 올리고뉴클레오티드를 생성하도록 모노뉴클레오티드가 반응되기 때문이다. 올리고뉴클레오티드의 단부는 이의 5' 포스페이트가 모노뉴클레오티드 펜토스 고리의 3' 산소에 연결되지 않은 경우 "5' 단부"로 지칭된다. 올리고뉴클레오티드의 단부는 이의 3' 산소가 다른 모노뉴클레오티드 펜토스 고리의 5' 포스페이트에 연결되지 않은 경우 "3' 단부"로 지칭된다. 핵산 서열은, 더 큰 올리고뉴클레오티드에 내재하더라도, 또한 5' 및 3' 말단을 갖는 것으로 언급될 수 있다. 선형 또는 원형 DNA 분자에서, 불연속 요소는 "상류" 또는 "하류"의 5' 또는 3' 요소로 지칭된다.

용어 "게놈적으로 통합된"은, 뉴클레오티드 서열이 세포의 게놈 내로 통합되도록 세포 내로 도입된 핵산을 지칭한다. 임의의 프로토콜이 핵산을 세포의 게놈 내로 안정하게 혼입하는 데 사용될 수 있다.

용어 "바이러스 벡터"는 바이러스 기원의 적어도 하나의 요소를 포함하고 바이러스 벡터 입자 내로의 포장(packaging)에 충분하거나 이를 허용하는 요소를 포함하는 재조합 핵산을 지칭한다. 벡터 및/또는 입자는 DNA, RNA, 또는 다른 핵산을 시험관내, 생체외, 또는 생체내에서 세포 내로 이전시키는 목적에 이용될 수 있다. 수많은 형태의 바이러스 벡터가 공지되어 있다.

세포, 조직(예를 들어, 간 샘플), 단백질, 및 핵산에 관하여 용어 "분리된"은, 상기 세포, 조직(예를 들어, 간 샘플), 단백질, 및 핵산의 실질적으로 순수한 조제물까지 그리고 이를 포함하여, 발생 부위에서(*in situ*) 통상 존재할 수 있는 다른 박테리아, 바이러스, 세포, 또는 다른 성분에 관하여 상대적으로 정제된 세포, 조직(예를 들어, 간 샘플), 단백질, 및 핵산을 포함한다. 용어 "분리된"은 또한, 어떠한 자연 발생 대응물(counterpart)도 없으며, 화학적으로 합성되었고 따라서 다른 세포, 조직(예를 들어, 간 샘플), 단백질, 및 핵산에 의해 실질

적으로 오염되지 않거나, 이들이 자연적으로 수반하는 대부분의 다른 성분(예를 들어, 세포성 성분)(예를 들어, 다른 세포성 단백질, 폴리뉴클레오티드, 또는 세포성 성분)으로부터 분리 또는 정제되었던 세포, 조직(예를 들어, 간 샘플), 단백질, 또는 핵산을 포함한다.

용어 "야생형"은 정상(돌연변이체, 질환에 걸린(diseased), 변경된 등과 대조적임) 상태 또는 맥락에서 확인된 바와 같은 구조 및/또는 활성을 갖는 실체(entity)를 포함한다. 야생형 유전자 및 폴리펩티드는 종종 다수의 상이한 형태(예를 들어, 대립유전자)로 존재한다.

용어 "내인성 서열"은 세포 또는 동물 내에서 천연적으로 발생하는 핵산 서열을 지칭한다. 예를 들어, 마우스의 내인성 *ALB* 서열은 마우스 내의 *ALB* 유전자좌에서 자연적으로 발생하는 자연 *ALB* 서열을 지칭한다.

"외인성" 분자 또는 서열은 통상 해당 형태로는 세포에 존재하지 않는 분자 또는 서열을 포함한다. 정상적인 존재는, 세포의 특정 발달 단계 및 환경 조건과 관련된 존재를 포함한다. 외인성 분자 또는 서열은 예를 들어, 세포 내의 상응하는 내인성 서열의 돌연변이화된 버전, 예컨대, 내인성 서열의 인간화 버전을 포함할 수 있거나, 세포 내의 내인성 서열에 상응하지만 상이한 형태로(즉, 염색체 내에 있지 않음) 존재하는 서열을 포함할 수 있다. 대조적으로, 내인성 분자 또는 서열은, 특정 환경 조건 하에 특정 발단 단계에서 특정 세포에서 해당 형태로 통상 존재하는 분자 또는 서열을 포함한다.

용어 "이종성"은 핵산 또는 단백질의 맥락에서 사용될 때, 핵산 또는 단백질이 동일한 분자에서 함께 자연적으로 발생하지 않는 적어도 2개의 분절을 포함함을 나타낸다. 예를 들어, 용어 "이종성"은 핵산의 세그먼트 또는 단백질의 세그먼트와 관련하여 사용될 때, 핵산 또는 단백질이 자연상에서 서로(예를 들어, 함께 접합된) 동일한 관계에서 발견되지 않는 2개 이상의 하위-서열을 포함함을 나타낸다. 일례로, 핵산 벡터의 "이종성" 영역은, 자연상에서 다른 분자와 회합되어 발견되지 않는 또 다른 핵산 분자 내에 있거나 이에 부착된 핵산의 분절이다. 예를 들어, 핵산 벡터의 이종성 영역은, 자연상에서 코딩 서열과 회합되어 발견되지 않는 서열에 의해 플랭킹되는 코딩 서열을 포함할 수 있을 것이다. 마찬가지로, 단백질의 "이종성" 영역은, 자연상에서 다른 펩티드 분자(예를 들어, 융합 단백질, 또는 태그를 가진 단백질)와 회합되어 발견되지 않는 또 다른 펩티드 분자 내에 있거나 이에 부착된 아미노산의 분절이다. 유사하게는, 핵산 또는 단백질은 이종성 표지 또는 이종성 분비 또는 위치 서열을 포함할 수 있다.

"코돈 최적화"(즉, "코돈 최적화된" 서열)는 아미노산을 특정하는 다수의 3-염기쌍 코돈 조합에 의해 나타나는 바와 같이 코돈의 축퇴를 이용하고, 일반적으로 자연 아미노산 서열을 유지하면서 자연 서열의 적어도 하나의 코돈을 숙주 세포의 유전자에서 보다 빈번하게 또는 가장 빈번하게 사용되는 코돈으로 대체함으로써 특정 숙주 세포에서의 증진된 발현을 위한 핵산 서열을 변형시키는 과정을 포함한다. 예를 들어, 인자 IX 단백질을 인코딩하는 핵산은 자연 발생 핵산 서열과 비교하여, 박테리아 세포, 효모 세포, 인간 세포, 비인간 세포, 포유류 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 햄스터 세포, 또는 임의의 다른 숙주 세포를 포함하여 주어진 원핵 또는 진핵 세포에서 더 높은 사용 빈도를 갖는 코돈을 치환하도록 변형될 수 있다. 코돈 사용빈도(codon usage) 표는 일반적으로 예를 들어, "코돈 사용빈도 데이터베이스"에서 입수 가능하다. 이들 표는 많은 방식으로 적응될 수 있다. 문헌[Nakamura et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):292]을 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 특정 숙주에서의 발현을 위한 특정 서열의 코돈 최적화에 대한 컴퓨터 알고리즘이 또한 입수 가능하다(예를 들어, Gene Forge 참조).

용어 "유전자좌"는 유기체의 게놈의 염색체 상의 유전자(또는 유의한 서열), DNA 서열, 폴리펩티드-인코딩 서열, 또는 장소의 특정 위치를 지칭한다. 예를 들어, "*ALB* 유전자좌"는 이러한 서열이 체류하는 곳으로서 식별되었던 유기체의 게놈의 염색체 상의 *ALB* 유전자, *ALB* DNA 서열, 알부민-인코딩 서열, 또는 *ALB* 장소의 특정 위치를 지칭할 수 있다. "*ALB* 유전자좌"는 예를 들어, 인핸서, 프로모터, 5' 및/또는 3' 비번역 영역(UTR), 또는 이들의 조합을 포함하여 *ALB* 유전자의 조절 요소를 포함할 수 있다.

용어 "유전자"는, 자연적으로 존재한다면, 적어도 하나의 코딩 영역 및 적어도 하나의 비-코딩 영역을 함유할 수 있는 염색체 내의 DNA 서열을 지칭한다. 생성물(예를 들어, RNA 생성물 및/또는 폴리펩티드 생성물이나 이로 제한되지 않음)을 코딩하는 염색체 내의 DNA 서열은, 유전자가 전장 mRNA(5' 및 3' 미번역 서열을 포함함)에 상응하도록 5' 말단과 3' 말단 둘 다 상의 코딩 영역에 인접하게 위치한 비-코딩 인트론 및 서열이 개재되어 있는(interrupted) 코딩 영역을 포함할 수 있다. 추가로, 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 및 전사 인자 결합 부위이나 이로 제한되지 않음), 폴리아데닐화 신호, 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site), 사일런서(silencer), 인설레이션 서열(insulating sequence), 및 기질 부착 영역(matrix attachment region)을 포함한 다른 비-코딩 서열이 유전자에 존재할 수 있다. 이들 서열은 유전자의 코딩 영역에 근접해

(예를 들어, 10kb 내에 있으나 이로 제한되지 않음) 있거나 원거리 부위에 있을 수 있고, 이들은 유전자의 전사 및 번역의 수준 또는 속도에 영향을 미친다.

용어 "대립유전자"는 유전자의 변이체 형태를 지칭한다. 일부 유전자는 여러 가지 상이한 형태를 갖고, 이는 염색체 상의 동일한 위치 또는 유전자 좌위에 위치한다. 이배체(diploid) 유기체는 각각의 유전자좌에 2개의 대립유전자를 갖는다. 대립유전자의 각각의 쌍은 특정 유전자좌의 유전자형을 나타낸다. 유전자형은, 특정 유전자좌에 2개의 동일한 대립유전자가 존재한다면 동형접합성으로서 기재되고, 2개의 대립유전자가 상이하다면 이형접합성으로서 기재된다.

"프로모터"는 특정 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 적절한 전사 개시 부위에서 RNA 합성을 개시하도록 RNA 폴리머라제 II를 지시할 수 있는 TATA 박스를 통상적으로 포함하는 DNA의 조절 영역이다. 프로모터는, 전사 개시 속도에 영향을 미치는 다른 영역을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 개시된 프로모터 서열은 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절한다. 프로모터는 본원에 개시된 하나 이상의 세포 유형(예를 들어, 마우스 세포, 래트 세포, 만능성 세포, 단세포 단계(one-cell stage) 배아, 분화된 세포, 또는 이들의 조합)에서 활성적일 수 있다. 프로모터는 예를 들어, 구성적 활성(constitutively active) 프로모터, 조건적 프로모터, 유도적 프로모터, 시간적 제약(temporally restricted) 프로모터(예를 들어, 발달적 조절(developmentally regulated) 프로모터), 또는 공간적 제약(spatially restricted) 프로모터(예를 들어, 세포-특이적 또는 조직-특이적 프로모터)일 수 있다. 프로모터의 예는 예를 들어, 국제공개 WO 2013/176772호에서 확인할 수 있으며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

"작동 가능한 결합" 또는 "작동 가능하게 결합된"은 성분 둘 다 정상적으로 작용하고 상기 성분 중 적어도 하나가 다른 성분 중 적어도 하나에 발휘되는 기능을 매개할 수 있는 가능성을 가능하게 하는 2개 이상의 성분(예를 들어, 프로모터 및 또 다른 서열 요소)의 병치를 포함한다. 예를 들어, 프로모터가 하나 이상의 전사 조절 인자의 존재 또는 부재에 반응하여 코딩 서열의 전사 수준을 제어한다면, 상기 프로모터는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 작동 가능한 연결은 서로 인접하거나 트랜스로 작용하는 이러한 서열을 포함할 수 있다(예를 들어, 조절 서열은 코딩 서열의 전사를 제어하기 위해 거리를 두고 작용할 수 있음).

본원에 제공된 방법 및 조성물은 여러 가지 상이한 성분을 이용한다. 상세한 설명 전반에 걸쳐 일부 성분은 활성 변이체 및 단편을 가질 수 있다. 용어 "기능적"은, 생물학적 활성 또는 기능을 나타내는 단백질 또는 핵산(또는 이의 단편 또는 변이체)의 선천적인(innate) 능력을 지칭한다. 기능적 단편 또는 변이체의 생물학적 기능은 원래의 분자와의 비교에서 동일할 수 있거나 실제로 분자의 기본적인 생물학적 기능을 보유하면서 변경될 수 있다(예를 들어, 이의 특이성 또는 선택성 또는 효능에 관하여).

용어 "변이체"는, 집단에 가장 우세한(prevalent) 서열과 상이한(예를 들어, 1개 뉴클레오티드만큼) 뉴클레오티드 서열 또는 집단에 가장 우세한 서열과 상이한(예를 들어, 1개 아미노산만큼) 단백질 서열을 지칭한다.

용어 "단편"은 단백질을 지칭할 경우, 전장 단백질보다 더 짧거나 이보다 더 적은 수의 아미노산을 갖는 단백질을 의미한다. 용어 "단편"은 핵산을 지칭할 경우, 전장 핵산보다 더 짧거나 이보다 더 적은 수의 뉴클레오티드를 갖는 핵산을 의미한다. 단편은 예를 들어, 단백질 단편을 지칭할 경우, N-말단 단편(즉, 단백질의 C-말단 단부 중 일부의 제거), C-말단 단편(즉, 단백질의 N-말단 단부 중 일부의 제거), 또는 내부 단편(즉, 단백질의 N-말단 단부 및 C-말단 단부 각각의 일부의 제거)일 수 있다. 단편은 예를 들어, 핵산 단편을 지칭할 경우, 5' 단편(즉, 핵산의 3' 단부 중 일부의 제거), 3' 단편(즉, 핵산의 5' 단부 중 일부의 제거), 또는 내부 단편(즉, 핵산의 5' 단부 및 3' 단부 각각의 일부의 제거)일 수 있다.

2개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 맥락에서, "서열 동일성" 또는 "동일성"은 명시된 비교 범위(comparison window)에 걸쳐 최대 상응도(correspondence)를 위해 정렬될 때 동일한 2개의 서열의 잔기를 지칭한다. 서열 동일성의 백분율이 단백질과 관련하여 사용될 경우, 동일하지 않은 잔기 위치는 종종, 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성(예를 들어, 전하 또는 소수성)을 갖는 다른 아미노산 잔기로 치환되고 따라서 분자의 기능적 특성을 변화시키지 않는 보존적 아미노산 치환에 의해 달라진다. 서열이 보존적 치환에 있어 달라질 때, 서열 동일성 백분율은 치환의 보존적 성질에 대해 보정하기 위해 상향 조정될 수 있다. 이러한 보존적 치환에 의해 달라지는 서열은 "서열 유사성" 또는 "유사성"을 갖는 것으로 언급된다. 이러한 조정을 수행하기 위한 수단은 널리 공지되어 있다. 전형적으로, 이것은 완전한 불일치가 아닌 부분적인 것으로 보존적 치환을 점수를 매김(scoring)으로써 서열 동일성 백분율을 증가시키는 것을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 동일한 아미노산에 1의 점수가 주어지고 비-보존적 치환에 0의 점수가 주어지는 경우, 보존적 치환에는 0과 1 사이의 점수가 주어진다. 보존적 치환의 점수는, 예를 들어, 프로그램 PC/GENE(Intelligenetics, 미국 캘리포니아주 마운

틴 뷰 소재)에서 구현된 바와 같이 계산된다.

"서열 동일성의 백분율"은 비교 범위에 걸쳐 2개의 최적으로 정렬된 서열(완벽하게 매칭된 잔기의 최대 수)을 비교함으로써 결정된 값을 포함하고, 비교 범위에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 부분은 2개의 서열의 최적 정렬에 대한 기준 서열(첨가 또는 결실(deletion)을 포함하지 않음)과 비교하여 첨가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은, 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 서열 둘 다에서 발생하는 위치의 수를 결정하여 매칭된 위치의 수를 결정하고, 매칭된 위치의 수를 비교 범위 내의 위치의 총 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산된다. 달리 명시되지 않는 한(예를 들어, 더 짧은 서열은 연결된 이종성 서열을 포함함), 비교 범위는 비교되는 2개의 서열 중 더 짧은 서열의 전체 길이이다.

달리 언급되지 않는 한, 서열 동일성/유사성 값은 하기 파라미터를 사용하여 GAP 버전 10을 사용하여 얻어진 값을 포함한다: 50의 GAP 가중치와 3의 길이 가중치를 사용한 뉴클레오티드 서열에 대한 %동일성 및 %유사성, 및 nwsgapdna.cmp 스코어링 매트릭스; 8의 GAP 가중치와 2의 길이 가중치에 대한 %동일성 및 %유사성, 및 BLOSUM62 스코어링 매트릭스; 또는 이의 임의의 등가의 프로그램. "동등한 프로그램"은, 대상이 되는 임의의 2개의 서열에 대하여, GAP 버전 10에 의해 발생된 상응하는 정렬과 비교할 때 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 매치 및 동일한 서열 동일성 백분율을 갖는 정렬을 생성하는 임의의 서열 비교 프로그램을 포함한다.

용어 "보존적 아미노산 치환"은 서열에 정상적으로 존재하는 아미노산을 유사한 크기, 전하, 또는 극성의 상이한 아미노산으로 치환하는 것을 지칭한다. 보존적 치환의 예는 비극성(소수성) 잔기, 예컨대, 이소류신, 발린, 또는 류신을 또 다른 비극성 잔기로 치환하는 것을 포함한다. 마찬가지로, 보존적 치환의 예는, 아르기닌과 라이신 사이, 글루타민과 아스파라긴 사이, 또는 글리신과 세린 사이의 치환과 같이 하나의 극성(친수성) 잔기를 또 다른 잔기로 치환하는 것을 포함한다. 추가로, 염기성 잔기, 예컨대, 라이신, 아르기닌, 또는 히스티딘을 또 다른 잔기로 치환하는 것, 또는 산성 잔기, 예컨대, 아스파르트산 또는 글루탐산을 또 다른 산성 잔기로 치환하는 것은 보존적 치환의 추가 예이다. 비-보존적 치환의 예는, 극성(친수성) 잔기, 예컨대, 시스테인, 글루타민, 글루탐산 또는 라이신을 비극성(소수성) 아미노산 잔기, 예컨대, 이소류신, 발린, 류신, 알라닌, 또는 메티오닌으로 치환하는 것 및/또는 비극성 잔기를 극성 잔기로 치환하는 것을 포함한다. 전형적인 아미노산 분류는 하기에 요약되어 있다.

[표 1]

아미노산 범주.

알라닌	Ala	A	비극성	중성	1.8
아르기닌	Arg	R	극성	양성	-4.5
아스파라긴	Asn	N	극성	중성	-3.5
아스파르트산	Asp	D	극성	음성	-3.5
시스테인	Cys	C	비극성	중성	2.5
글루탐산	Glu	E	극성	음성	-3.5
글루타민	Gln	Q	극성	중성	-3.5
글리신	Gly	G	비극성	중성	-0.4
히스티딘	His	H	극성	양성	-3.2
이소류신	Ile	I	비극성	중성	4.5
류신	Leu	L	비극성	중성	3.8
리신	Lys	K	극성	양성	-3.9
메티오닌	Met	M	비극성	중성	1.9
페닐알라닌	Phe	F	비극성	중성	2.8
프롤린	Pro	P	비극성	중성	-1.6
세린	Ser	S	극성	중성	-0.8
트레오닌	Thr	T	극성	중성	-0.7
트립토판	Trp	W	비극성	중성	-0.9
티로신	Tyr	Y	극성	중성	-1.3
발린	Val	V	비극성	중성	4.2

"상동성" 서열(예를 들어, 핵산 서열)은, 공지된 기준 서열과 동일하거나 실질적으로 유사하여, 공지된 기준 서열과 예를 들어, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 상동성 서열은 예를 들어, 이종상동성(orthologous) 서열 및 동종상동성(paralogous) 서열을 포함할 수 있다. 상동성 유전자는 예를 들어 전형적으로, 종분화(speciation) 사건(이종상동성 유전자) 또는 유

전적 중복(duplication) 사건(동종상동성 유전자)을 통해 공통의 조상(ancestral) DNA 서열로부터 계통이 이어진다(descend). "이종상동성" 유전자는 종분화에 의해 공통의 조상 유전자로부터 진화한 상이한 종의 유전자를 포함한다. 이종상동체(ortholog)는 전형적으로, 진화 과정에서 동일한 기능을 보유한다. "동종상동성" 유전자는 게놈 내에서 중복에 의해 관련된 유전자를 포함한다. 동종상동체(paralog)는 진화의 과정에서 새로운 기능을 진화시킬 수 있다.

용어 "시험관내"는 인공 환경, 및 인공 환경(예를 들어, 시험관 또는 분리된 세포 또는 세포주) 내에서 발생하는 과정 또는 반응을 포함한다. 용어 "생체내"는 자연 환경(예를 들어, 세포 또는 유기체 또는 신체), 및 자연 환경 내에서 발생하는 과정 또는 반응을 포함한다. 용어 "생체외"는 개체의 신체로부터 제거되었던 세포, 및 이러한 세포 내에서 발생하는 과정 또는 반응을 포함한다.

본원에 사용되는 바와 같이, 인간의 맥락에서 용어 "신생아"는 최대 1년(52주) 또는 그 이하의 연령, 바람직하게는 최대 24주 또는 그 이하의 연령, 더 바람직하게는 최대 12주 또는 그 이하의 연령, 더욱 바람직하게는 최대 8주 또는 그 이하의 연령, 보다 더 바람직하게는 최대 4주 또는 그 이하의 연령의 인간 대상체를 포함한다. 특정 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 최대 4주령이다. 특정 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 최대 8주령이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 3주 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 2주 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 1주 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 7일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 6일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 5일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 4일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 3일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 2일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 1일 이내이다. 상기 개시된 시간 범위는 인간 대상체에 대한 것이며, 또한 다른 동물에 대한 대응하는 발달 시간 범위를 포괄하도록 의도된다. 본원에 사용되는 바와 같이, "신생아 세포"는 신생아 대상체의 세포이고, 신생아 세포의 집단은 신생아 대상체의 세포의 집단이다.

본원에 사용되는 바와 같이, 대조군 샘플 또는 대조군 대상체에서와 같이 "대조군"은 측정을 위한 비교기, 예를 들어 질환의 징후 또는 증상의 진단 측정이다. 특정 구현예에서, 대조군은 더 이른 시점에서, 예를 들어, 치료 개입 전에, 동일한 대상체로부터의 대상체 샘플일 수 있다. 특정 구현예에서, 대조군은 정상 대조군, 예를 들어, 대상체 샘플 내의 FIX 농도 또는 활성을 제공하기 위해 정상 대상체, 즉 치료된 대상체의 질환을 갖지 않는 대상체로부터의 측정일 수 있다. 특정 구현예에서, 정상 대조군은 집단 대조군, 즉, 일반적인 집단에서 대상체의 평균일 수 있다. 특정 구현예에서, 대조군은 동일한 질환을 갖는 비치료된 대상체일 수 있다. 특정 구현예에서, 대조군은 상이한 요법, 예를 들어, 표준 치료로 치료된 대상체일 수 있다. 특정 구현예에서, 대조군은 대상체의 질환이 비교된 대상체의 자연사 연구로부터의 대상체 또는 대상체의 집단일 수 있다. 특정 구현예에서, 대조군은 시험되는 대상체, 예를 들어 연령, 성별에 대해 특정 인자에 대해 매칭된다. 특정 구현예에서, 대조군은 특정 실험실, 예를 들어 임상 실험실에 대한 대조군 수준일 수 있다. 적절한 대조군의 선택은 당업자의 능력 내에 있다.

하나 이상의 언급된 요소를 "포함하는(comprising)" 또는 "포함하는(including)" 조성물 또는 방법은 구체적으로 언급되지 않은 다른 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질을 "포함하는(comprise)" 또는 "포함하는(include)" 조성물은 상기 단백질을 단독으로 또는 다른 성분과 조합하여 함유할 수 있다. 과도기적 어구(transitional phrase) "본질적으로 ~로 이루어진"은, 청구항의 범위가 상기 청구항에서 언급된 명시된 요소, 및 청구 발명의 기본적인 그리고 신규 특징(들)에 실제적으로 영향을 미치지 않는 것을 포괄하는 것으로 해석되어야 한다. 그러므로, 용어 "본질적으로 ~로 이루어진"은 본 발명의 청구항에서 사용될 때, "포함하는"과 동등한 것으로 해석되고자 하는 것은 아니다.

"선택적" 또는 "임의로"는 이후에 설명된 이벤트 또는 상황이 발생할 수도 있고 발생하지 않을 수도 있고 설명은 이벤트 또는 상황이 발생하는 경우와 발생하지 않는 경우를 포함한다는 것을 의미한다.

값의 범위의 표기는 그 범위 내의 또는 그 범위를 정의하는 모든 정수, 및 그 범위 내의 정수에 의해 정의되는 모든 하위범위를 포함한다. 예를 들어, 5개 내지 10개의 뉴클레오티드는 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의 뉴클레오티드로 이해되는 반면, 5% 내지 10%는 5% 및 10%까지 가능한 모든 값을 함유하는 것으로 이해된다.

20개 뉴클레오티드 서열의 적어도 17개의 뉴클레오티드는 제공된 서열의 17개, 18개, 19개, 또는 20개의 뉴클레오티드를 포함함으로써, 명확하게 이해될 바와 같이 구체적으로 제공되지 않더라도 상한을 제공하는 것으로 이해된다. 유사하게, 최대 3개의 뉴클레오티드는 0개, 1개, 2개, 또는 3개의 뉴클레오티드를 포함하는 것으로 이

해되어, 하나가 구체적으로 제공되지 않더라도 하한을 제공한다. "적어도", "최대", 또는 다른 유사한 언어가 수를 수정할 때, 일련의 각각의 수를 수정하는 것으로 이해될 수 있다.

본원에 사용되는 바와 같이, "이하" 또는 "미만"은 구문에 인접한 값으로 이해되고, 논리적 하위 값 또는 정수는 문맥에서 논리적으로 0으로 이해된다. 예를 들어, "2개 이하의 뉴클레오티드 염기 쌍"의 이중 영역은 2개, 1개, 또는 0개의 뉴클레오티드 염기쌍을 갖는다. 일련의 숫자 또는 범위 이전에 "이하" 또는 "미만"이 존재할 때, 일련의 또는 범위의 각각의 숫자가 변형되는 것으로 이해된다.

본원에 사용되는 바와 같이, 값의 최대량이, 그 값이 검출 방법에 의해 제한되는 100%(예를 들어, 100% 억제 또는 100% 캡슐화)로 나타내어지는 것으로 이해된다. 예를 들어, 100% 억제는 검정의 검출 수준 미만의 레벨로의 억제로서 이해되고, 100% 캡슐화는 캡슐화를 위해 의도된 재료가 소포 외부에서 검출될 수 없는 것으로 이해된다.

문맥으로부터 다르게 분명해지지 않는 한, 용어 "약"은 언급된 값 ± 5%를 포괄한다. 특정 구현예에서, 용어 "약"은 당업계에서 허용 변형 또는 오차, 예를 들어 평균으로부터 2의 표준 편차, 또는 측정을 취하는 데 사용되는 방법의 민감도, 또는 당업계에서 허용되는 값의 퍼센트를 포함하는 것으로 이해된다. 일련의 제1 값 전에 "약"이 존재할 때, 일련의 각각의 값을 변경하는 것으로 이해될 수 있다.

용어 "및/또는"은 대안("또는")으로 해석될 때 조합의 결여뿐만 아니라 연관된 나열된 항목 중 하나 이상의 모든 가능한 조합을 지칭하고 포괄한다.

용어 "또는"은 특정 목록의 임의의 하나의 구성원을 지칭하고, 또한 해당 목록의 구성원들의 임의의 조합을 포함한다.

단수형 형태의 관사("a", "an" 및 "the")는 문맥상 명백하게 다르게 나타내지 않는 한, 복수형 지칭을 포함한다. 예를 들어, 용어 "일 단백질" 또는 "적어도 하나의 단백질"은 복수의 단백질을 이들의 혼합물을 포함하여 포함할 수 있다.

통계학적으로 유의하다는 것은 $p \leq 0.05$를 의미한다.

응용에서 서열과 수탁 번호에서 표시된 수탁번호 또는 위치 사이에 충돌이 있는 경우, 응용의 서열이 우세하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0200] ***I. 개요***

[0201] 표적 게놈 유전자좌, 예컨대 내인성 *알부민(ALB)* 유전자좌 내로의 인자 IX(FIX) 코딩 서열의 삽입 및/또는 FIX 코딩 서열의 발현을 가능하게 하는 핵산 구조체 및 조성물이 본원에 제공된다. 핵산 구조체 및 조성물은 *인자 9(F9)* 핵산을 세포 내로 도입하는 방법, *F9* 핵산을 표적 게놈 유전자좌에 통합하는 방법, 세포 내 FIX의 발현 방법 및 대상체에서 B형 혈우병 또는 FIX 결핍을 치료하는 방법에 사용될 수 있다. 일부 경우에, 세포 또는 대상체는 본원에 정의된 바와 같은 신생아 세포 또는 신생아 대상체일 수 있다. 다른 경우에, 세포는 신생아 세포가 아니고, 대상체는 신생아 대상체가 아니다. 표적 게놈 유전자좌, 예컨대 *ALB* 유전자좌 내로의 핵산 구조체의 통합을 용이하게 하기 위해 뉴클레아제 작용제(예를 들어, 내인성 *ALB* 유전자좌를 표적화함) 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 핵산이 또한 본원에 제공된다.

[0202] 보다 구체적으로, 일부 구현예에서 본원에 기술된 것은 CRISPR/Cas9 유전자 편집 기술에 기초하고, 임의로 재조합 아데노-관련 바이러스 혈청형 8(rAAV8)에 함유된 *F9* DNA 유전자 삽입 템플릿(예를 들어, 일방향 또는 양방향 *F9* DNA 유전자 삽입 템플릿)과 관련된 지질 나노입자(LNP) 전달 시스템에 함유된 치료제이다. CRISPR/Cas9 성분은 표적 유전자 좌위(예: 간세포의 *ALB* 유전자 좌위와 같은 안전 항만 유전자좌)에서 이중 가닥 DNA를 표적화하고 절단하도록 설계되어 *F9* DNA 템플릿이 표적 게놈 유전자좌의 게놈에 삽입될 수 있다. 이식유전자 삽입은 B형 혈우병 환자에서 결손되거나 결함이 있는 게놈 *F9*를 인코딩하는 기능성 *F9* 유전자를 제공한다.

[0203] 일부 경우에, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 자연 FIX 코딩 서열과 비교하여 발현을 위해 최적화된다. 다른 경우에, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 자연 FIX 코딩 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 코돈 최적화(예를 들어, 인간 코돈), CpG 디뉴클레오티드의 고갈, 잠적 스플라이스 부위의 돌연변이, 또는 이들의 임의의 조합과 같은 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 하나의 구체적인 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드(즉, CpG 고갈됨)를 갖고, 자연 FIX 코딩 서열과 비교하여 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 잠적 스플라이스

부위를 갖는다. 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되고(예를 들어, 잠적 스플라이스 부위를 돌연변이시키기 위해 하나의 CpG를 도입함), 자연 FIX 코딩 서열과 비교하여 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 또는 모든 식별된 잠적 스플라이스 부위를 갖는다. 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, CpG 고갈됨), 자연 FIX 코딩 서열과 비교하여 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨). 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 모든 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, 완전히 CpG 고갈됨), 자연 FIX 코딩 서열과 비교하여 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨).

[0204] 특히, 2개의 상이한 FIX 코딩 서열(즉, 제1 FIX 코딩 서열 및 제2 FIX 코딩 서열의 역보체)을 포함하는 양방향 구조체가 본원에 제공된다. 이러한 양방향 구조체의 일례에서, 하나의 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, CpG 고갈됨), 자연 FIX 코딩 서열(예를 들어, 제거된 모든 CpG 디뉴클레오티드를 가지고(즉, 완전히 CpG 고갈됨), 자연 FIX 코딩 서열과 비교하여 코돈 최적화됨(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨))과 비교하여 코돈 최적화되고(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨), 다른 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, 완전히 CpG 고갈됨), 자연 FIX 코딩 서열에 비해 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 잠적 스플라이스 부위를 갖는다(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되고(예를 들어, 잠적 스플라이스 부위를 돌연변이시키기 위해 하나의 CpG를 도입함), 자연 FIX 코딩 서열과 비교하여 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 또는 모든 식별된 잠적 스플라이스 부위를 가짐).

[0205] 코돈 최적화되고 완전히 CpG가 고갈된 FIX 코딩 서열의 하나의 특정 예가 서열번호 166에 기재되어 있다. 코돈 최적화되고 완전히 CpG가 고갈된 FIX 코딩 서열의 또 다른 특정 예가 서열번호 165에 기재되어 있다. 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되고 하나 이상의 잠적 스플라이스 부위를 돌연변이시키는 최적화된 자연 FIX 코딩 서열의 하나의 특정 예가 서열번호 159에 기재되어 있다. 2개의 상이한 FIX 코딩 서열(즉, 제1 FIX 코딩 서열 및 제2 FIX 코딩 서열의 역보체)을 포함하는 양방향 구조체의 하나의 특정 예는 서열번호 166 및 서열번호 159에 기재된 FIX 코딩 서열을 포함한다. 2개의 상이한 FIX 코딩 서열(즉, 제1 FIX 코딩 서열 및 제2 FIX 코딩 서열의 역보체)을 포함하는 양방향 구조체의 또 다른 특정 예는 서열번호 165 및 서열번호 159에 기재된 FIX 코딩 서열을 포함한다.

[0206] 단일 FIX 코딩 서열을 포함하는 일방향 구조체가 또한 본원에 제공된다. 이러한 단방향 구조체의 일례에서, FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, CpG 고갈됨), 자연 FIX 코딩 서열(예를 들어, 제거된 모든 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, 완전히 CpG 고갈됨), 자연 FIX 코딩 서열과 비교하여 코돈 최적화됨(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨))과 비교하여 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨). 이러한 일방향 구조체의 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, CpG 고갈됨), 자연 FIX 코딩 서열과 비교하여 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 잠적 스플라이스 부위를 갖는다(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되고(예를 들어, 잠적 스플라이스 부위를 돌연변이시키기 위해 하나의 CpG를 도입함), 자연 FIX 코딩 서열과 비교하여 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 또는 모든 식별된 잠적 스플라이스 부위를 가짐).

[0207] 코돈 최적화되고 완전히 CpG가 고갈된 FIX 코딩 서열의 하나의 특정 예가 서열번호 166에 기재되어 있다. 코돈 최적화되고 완전히 CpG가 고갈된 FIX 코딩 서열의 또 다른 특정 예가 서열번호 165에 기재되어 있다. 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되고 하나 이상의 잠적 스플라이스 부위를 돌연변이시키는 최적화된 자연 FIX 코딩 서열의 하나의 특정 예가 서열번호 159에 기재되어 있다. 일방향 구조체의 하나의 특정 예는 서열번호 166에 기재된 FIX 코딩 서열을 포함한다. 일방향 구조체의 또 다른 특정 예는 서열번호 165에 기재된 FIX 코딩 서열을 포함한다. 일방향 구조체의 또 다른 특정 예는 서열번호 159에 기재된 FIX 코딩 서열을 포함한다.

[0208] 이전 세대 FIX 코딩 서열 및 이전 세대 양방향 *F9* 삽입 카세트와 비교하여, 본원에 개시된 구조체는 FIX 발현(수준, 활성, 낮은 변동성, 제조 가능성)을 유지하는 동시에 인간 환자의 템플릿 성능에 영향을 미칠 수 있는 잠재적인 부정적인 특징을 제거하여 야생형 마우스와 비인간 영장류에서 관찰되는 의도하지 않은 잠적 스플라이싱 이벤트를 최소화하고, AAV 바이러스 벡터의 CpG 부위에 강력한 TLR9 효능제가 될 수 있는 메틸화되지 않은 C 잔기를 함유하기 때문에 CpG를 고갈시킨다.

[0209] 본원에 기재된 유전자 삽입 플랫폼은 또한 기존의 에피솜 FIX 플랫폼에 비해 이점을 갖는다. 예를 들어, 사용

된 *F9* 삽입 템플릿은 프로모터가 없기 때문에 프로모터가 없는 구조체의 통합에 대한 우려가 없다. 사용된 AAV 카세트에는 프로모터/조절 요소가 없기 때문에, 무작위로 삽입된 경우 인접 유전자좌의 발현에 영향을 미칠 가능성이 적다. 마찬가지로, 사용된 카세트의 5' 단부에서 인-프레임 ATG/메티오닌이 없기 때문에, 템플릿으로부터 단백질이 생성되지 않는다. 또한, 정확한 판독 프레임으로의 스플라이싱으로 이어지는 인트론 삽입을 필요로 할 것이기 때문에, 표적외 삽입으로부터 단백질을 생성할 가능성은 극히 낮다. 기존 *F9* 에피솜 플랫폼에 비해 또 다른 장점은 활성이 높은 게놈 유전자좌의 전사를 활용하여 생체내 강력한 단백질 발현이 달성되었으므로, 치료 활성을 달성하기 위해 FIX의 과활성 변이체를 사용할 필요가 없다는 것이다. 대조적으로, 현재 임상 시험에서 에피솜 FIX 플랫폼은 치료적 활성 수준을 달성하기 위해 FIX의 과활성 돌연변이체 변이체를 인코딩한다. 그러나, 본원에 개시된 방법에서의 조성물은 야생형 성숙 FIX가 임의의 인공 과활성 돌연변이 없이 인코딩될 때에도 높은 수준의 발현으로 이어진다. 더욱이, 본원에 개시된 조성물 및 방법에서와 같이 코딩 서열의 통합은 비통합 에피솜 벡터에 비해 유리하므로, 시간이 지남에 따른 이식유전자 유지는 비복제 에피솜 벡터에서 문제가 될 수 있어서, 계속된 치료 반응을 위해 더 많은 바이러스를 투여하는 것이 필요하다. 그러나, 이들 후속적인 노출은 바이러스의 신속한 중화, 및 따라서 저하된 이식유전자 발현을 초래할 수 있다. 이는 본원에 개시된 조성물 및 방법에 문제가 되지 않는다-조성물 및 방법이 게놈 및 영구적인 발현에 통합되게 하기 때문에 재투여가 필요하지 않다.

[0210] ***II. 인자 IX를 발현하기 위한 조성물***

[0211] 표적 게놈 유전자좌, 예컨대 내인성 *알부민(ALB)* 유전자좌 내로의 인자 IX(FIX) 코딩 서열의 삽입 및/또는 FIX 코딩 서열의 발현을 가능하게 하는 핵산 구조체 및 조성물이 본원에 제공된다. 핵산 구조체 및 조성물은 표적 게놈 유전자좌 내로의 통합 및/또는 세포에서의 발현 방법에 또는 B형 혈우병 또는 FIX 결핍을 치료하는 방법에 사용될 수 있다. 표적 게놈 유전자좌, 예컨대 *ALB* 유전자좌 내로의 핵산 구조체의 통합을 용이하게 하기 위해 뉴클레아제 작용제(예를 들어, 내인성 *ALB* 유전자좌를 표적화함) 또는 뉴클레아제 작용제를 인코딩하는 핵산이 또한 본원에 제공된다.

[0212] ***A. 인자 9* 핵산 구조체**

[0213] 본원에 기재된 조성물 및 방법은 FIX 단백질 코딩 서열(*인자 9*(*F9*) 핵산) 또는 FIX 단백질 코딩 서열의 역보체(예를 들어, 이종성 FIX 단백질 코딩 서열(이종성*F9* 핵산) 또는 이종성 FIX 단백질 코딩 서열의 역보체)를 포함하는 핵산 구조체의 사용을 포함한다. 예를 들어, 핵산 구조체는 FIX 단백질 코딩 서열(*F9* 핵산), 예컨대 이종성 FIX 단백질 코딩 서열(예를 들어, 이종성 *F9* 핵산)을 포함할 수 있다. 이러한 핵산 구조체는 본원의 다른 곳에 개시된 바와 같은 뉴클레아제 작용제 또는 CRISPR/Cas 시스템에 의한 절단 후 표적 게놈 유전자좌에 삽입하기 위한 것일 수 있거나, 표적 게놈 유전자좌로의 삽입 없이 FIX의 발현(예를 들어, 에피솜에서)을 위한 것일 수 있다. 예를 들어, 이러한 핵산 구조체는 본원의 다른 곳에 개시된 바와 같은 뉴클레아제 작용제 또는 CRISPR/Cas 시스템에 의해 생성된 절단 부위에 삽입하기 위한 것일 수 있거나, 절단 부위에 삽입 없이 FIX의 발현(예를 들어, 에피솜에서)을 위한 것일 수 있다. 용어 절단 부위는, 닉 또는 이중 가닥 절단부가 뉴클레아제 작용제(예를 들어, 가이드 RNA와 복합체화된 Cas9 단백질)에 의해 생성되는 DNA 서열을 포함한다. "이종성" FIX 단백질 코딩 서열은 숙주 세포 게놈 내의 부위에(예를 들어, *ALB* 인트론 1을 포함하는, 안전 항만 유전자좌와 같은 게놈 유전자좌에서) 외인성 공급원으로서 도입된 코딩 서열을 지칭할 수 있다. 즉, 이종성 단백질 코딩 서열은 그의 삽입 부위에 대해 이종성이고, 이러한 이종성 코딩 서열로부터 발현된 폴리펩티드는 이종성 폴리펩티드로 지칭된다. 이종성 코딩 서열은 자연 발생되거나 조작될 수 있고, 야생형 또는 변이체일 수 있다. 이종성 코딩 서열은 이종성 폴리펩티드(예를 들어, 내부 리보솜 진입 부위)를 인코딩하는 서열 이외의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 이종성 코딩 서열은 야생형 또는 변이체(예를 들어, 돌연변이)로서 숙주 게놈에서 자연적으로 일어나는 코딩 서열일 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포가 관심 코딩 서열(야생형 또는 변이체로서)을 함유하지만, 동일한 코딩 서열 또는 이의 변이체가 외인성 공급원으로서(예를 들어, 고도로 발현되는 유전자좌에서의 발현을 위해) 도입될 수 있다. 이종성 코딩 서열은 또한 숙주 게놈에서 자연적으로 발생하지 않는 코딩 서열이거나, 숙주 게놈에서 자연적으로 발생하지 않는 이종성 폴리펩티드를 발현하는 코딩 서열일 수 있다. 이종성 코딩 서열은 외인성 핵산 서열을 포함할 수 있거나(예를 들어, 핵산 서열은 수용세포에 내인성이 아님), 또는 그의 삽입 부위 및/또는 그의 수용세포에 대해 이종일 수 있다.

[0214] 본원에 개시된 *F9* 핵산 구조체의 길이는 다양할 수 있다. 구조체는 예를 들어, 약 1kb 내지 약 5kb, 예컨대 약 1kb 내지 약 4.5kb 또는 약 1kb 내지 약 4kb일 수 있다. 예시적인 핵산 구조체는 약 1kb 내지 약 5kb 길이 또는 약 1kb 내지 약 4kb의 길이이다. 대안적으로, 핵산 구조체는 약 1kb 내지 약 1.5kb, 약 1.5kb 내지 약 2kb, 약 2kb 내지 약 2.5kb, 약 2.5kb 내지 약 3kb, 약 3kb 내지 약 3.5kb, 약 3.5kb 내지 약 4kb, 약 4kb 내

지 약 4.5kb, 또는 약 4.5kb 내지 약 5kb의 길이일 수 있다. 대안적으로, 핵산 구조체는 예를 들어, 5kb 이하, 4.5kb 이하, 4kb 이하, 3.5kb 이하, 3kb 이하, 또는 2.5kb 이하의 길이일 수 있다.

[0215] 구조체는 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA)을 포함할 수 있고, 단일 가닥, 이중 가닥 또는 부분적으로 단일 가닥 및 부분적으로 이중 가닥일 수 있고, 선형 또는 원형 (예를 들어, 미니서클) 형태로 숙주 세포에 도입될 수 있다. 예를 들어, US 2010/0047805호, US 2011/0281361호 및 US 2011/0207221호를 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 선형 형태로 도입된다면, 구조체의 말단은 널리 공지된 방법에 의해(예를 들어, 엑소뉴클레오용해성(exonucleolytic) 분해로부터) 보호될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 디데옥시뉴클레오티드 잔기는 선형 분자의 3' 말단에 첨가될 수 있고/있거나 자기-상보적 올리고뉴클레오티드가 하나 이상의 말단에 결찰될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Chang et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4959-4963 and Nehls et al. (1996) *Science* 272:886-889]을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 분해로부터 외인성 폴리뉴클레오티드를 보호하는 추가 방법은 말단 아미노기(들)의 첨가 및 예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 및 O-메틸 리보스 또는 데옥시리보스 잔기와 같이 변형된 뉴클레오티드간 연결부(internucleotide linkage)의 사용을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 예를 들어, 복제 기점, 프로모터, 및 항생제 내성을 인코딩하는 유전자와 같은 추가 서열을 갖는 벡터 분자의 일부로서 구조체를 세포에 도입할 수 있다. 구조체는 바이러스 요소를 생략할 수 있다. 더욱이, 구조체는 나상(naked) 핵산으로서 도입될 수 있거나, 리포솜 또는 폴록사머와 같은 작용제와 복합체화된 핵산으로서 도입될 수 있거나, 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스, 아데노-연관된 바이러스(AAV), 헤르페스바이러스, 레트로바이러스, 또는 렌티바이러스)에 의해 전달될 수 있다.

[0216] 본원에 개시된 구조체는 필요에 따라 그리고/또는 하나 이상의 기능적 이점을 부여하기 위해 하나 이상의 적합한 구조적 특징을 포함하도록 어느 하나 또는 양쪽 말단에서 변형될 수 있다. 예를 들어, 구조적 변형은 본원에 개시된 구조체를 숙주 세포에 전달하는 데 사용되는 방법(들)(예를 들어, 전달을 위해 지질 나노입자 내로의 바이러스 벡터 전달 또는 포장의 사용)에 따라 달라질 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 역위 말단 반복(ITR), 헤어핀, 루프, 및 환상체(toroid)와 같은 다른 구조와 같은 말단 구조체를 포함한다. 예를 들어, 본원에 개시된 구조체는 1개, 2개, 또는 3개의 ITR을 포함할 수 있거나 2개 이하의 ITR을 포함할 수 있다. 구조적 변형의 다양한 방법이 공지되어 있다.

[0217] 일부 구조체는 삽입 부위의 내인성 프로모터(예를 들어, 구조가 숙주 세포의 *ALB* 유전자좌에 통합될 때의 내인성 *ALB* 프로모터)에 의해 발현이 유도되도록 삽입될 수 있다. 이러한 구조체는 FIX의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않을 수 있다. 예를 들어, FIX의 발현은 숙주 세포의 프로모터(예를 들어, 이식유전자가 숙주 세포의 *ALB* 유전자좌에 통합될 때의 내인성 *ALB* 프로모터)에 의해 유도될 수 있다. 이러한 경우에, 구조체는 발현을 유도하는 제어 요소(예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서)가 결여되어 있을 수 있다(예를 들어, 프로모터가 없는(promoterless) 구조체). 그럼에도 불구하고, 다른 경우에, 예를 들어, 에피솜에서 또는 통합시 FIX의 발현을 유도하는 구성적 프로모터 또는 유도성 또는 조직-특이적(예를 들어, 간- 또는 혈소판-특이적) 프로모터를 포함할 수 있다. 비제한적인 예시적인 구성적 프로모터는 사이토메갈로바이러스 즉시 초기 프로모터(CMV: cytomegalovirus immediate early promoter), 시미안 바이러스(SV40) 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기(MLP: adenovirus major late) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV: Rous sarcoma virus) 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV: mouse mammary tumor virus) 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제(PGK: phosphoglycerate kinase) 프로모터, 신장 인자-알파(EF1a: elongation factor-alpha) 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, 액틴 프로모터, 튜불린 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 이의 기능적 단편, 또는 전술한 것들 중 임의의 것의 조합을 포함한다. 예를 들어, 프로모터는 CMV 프로모터 또는 결절 CMV 프로모터일 수 있다. 또 다른 예에서, 프로모터는 EF1a 프로모터일 수 있다. 비제한적인 예시적인 유도성 프로모터는 열 충격, 빛, 화학물질, 펩티드, 금속, 스테로이드, 항생제, 또는 알코올에 의해 유도가능한 것을 포함한다. 유도성 프로모터는 Tet-On® 프로모터(Clontech)와 같은 낮은 기저(비유도) 발현 수준을 갖는 것일 수 있다. 발현에 필요하지 않지만, 구조체는 프로모터, 인핸서, 절연체, 내부 리보솜 진입 부위, 펩티드를 인코딩하는 추가 서열, 및/또는 폴리아데닐화 신호와 같은 전사 또는 번역 조절 서열을 포함할 수 있다. 구조체는 신호 펩티드를 인코딩하는 신호 서열에 작동 가능하게 연결된 그리고 이종성 FIX 단백질 하류의 인코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 핵산 구조체는 FIX 단백질을 인코딩하는 핵산의 상동성-독립적 삽입에서 작용한다. 이러한 핵산 구조체는 예를 들어, 비-분열 세포(예를 들어, 상동 재조합(HR)이 아닌 비-상동성 단부 접합(NHEJ)이 이중 가닥 DNA 파괴가 복구되는 주요 메커니즘인 세포)에서 작동할 수 있다. 이러한 구조체는 예를 들어, 상동성-독립적 공여체 구조체일 수 있다. 이러한 핵산 구조체는 예를 들어, 세포를 분할하는 데(예를 들어, 세포를 능동적으로 분

할하는) 작용할 수 있다.

[0218] 본원에 개시된 구조체는 임의의 특정 용도에 대해 필요에 따라 그리고/또는 하나 이상의 원하는 기능을 부여하는 임의의 적합한 구조적 특징부를 포함하거나 배제하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 일부 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 본원에 개시된 일부 구조체는 비-상동성 단부 접합에 의해 뉴클레아제 작용제에 대한 표적 DNA 서열의 절단 부위 내로 삽입될 수 있다(예를 들어, 안전 항만 유전자, 예컨대 *ALB* 유전자좌 내로 삽입될 수 있음). 일부 이러한 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 예를 들어, 이러한 구조체는 본원에 개시된 바와 같이 뉴클레아제 작용제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)로 절단한 후 평활 단부 이중 가닥 절단부 내로 삽입될 수 있다. 구체적인 예에서, 구조체는 AAV를 통해 전달될 수 있고, 비-상동성 단부 접합(예를 들어, 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는 것일 수 있음)에 의해 삽입을 할 수 있다.

[0219] 특정한 예에서, 구조체는 상동성-독립적 표적화된 통합을 통해 삽입될 수 있다. 예를 들어, 구조체 내 이종성 *F9* 핵산은 뉴클레아제 작용제에 대한 표적 부위(예를 들어, 표적화된 삽입을 위해 표적 DNA 서열에서와 동일한 표적 부위(예를 들어, 안전 항만 유전자), 및 표적화된 삽입을 위해 표적 DNA 서열을 절단하는 데 사용되는 동일한 뉴클레아제 작용제)에 의해 각각의 면 상에 플랭킹될 수 있다. 그 후, 뉴클레아제 작용제는 이종성 *F9* 핵산을 플랭킹하는 표적 부위를 절단할 수 있다. 구체적인 예에서, 구조체는 AAV-매개 전달에 의해 전달되고, 이종성 *F9* 핵산을 플랭킹하는 표적 부위의 절단은 AAV의 역위 말단 반복(ITR)을 제거할 수 있다. 일부 경우에, 표적 삽입을 위한 표적화된 삽입(예를 들어, 플랭킹 프로토스페이서 인접 모티프를 포함하는 gRNA 표적 서열과 같은 안전 항만 유전자좌에서 표적 DNA 서열)은 이종성 *F9* 핵산이 절단 부위 또는 표적 DNA 서열에 올바른 배향으로 삽입되면 더 이상 존재하지 않지만, 이종성 *F9* 핵산이 절단 부위 또는 표적 DNA 서열에 반대 배향으로 삽입되면 재형성된다. 이는 이종성 *F9* 핵산이 발현을 위해 올바른 배향으로 삽입되는 것을 보장하는 데 일조할 수 있다.

[0220] 본원에 개시된 구조체는 폴리아데닐화 테일 서열(예를 들어, FIX 코딩 서열의 하류 또는 3')을 포함할 수 있다. 적합한 폴리아데닐화 테일 서열을 설계하는 방법은 널리 공지되어 있다. 폴리아데닐화 테일 서열은 예를 들어, FIX 코딩 서열의 "폴리-A" 신전부 하류로서 인코딩될 수 있다. 폴리-A 테일은 예를 들어, 적어도 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 또는 100개 아데닌, 및 임의로 최대 300개의 아데닌을 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 폴리-A 테일은 95개, 96개, 97개, 98개, 99개, 또는 100개의 아데닌 뉴클레오티드를 포함한다. 적합한 폴리아데닐화 테일 서열 및/또는 폴리아데닐화 신호 서열을 설계하는 방법은 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 폴리아데닐화 신호 서열 AAUAAA는 포유류 시스템에서 일반적으로 사용되지만, UAUAAA 또는 AU/GUAAA와 같은 변이체가 확인되었다. 예를 들어, 문헌[Proudfoot (2011) *Genes & Dev*. 25(17):1770-82]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 용어 폴리아데닐화 신호 서열은 전사의 종료 및 mRNA 전사물(transcript)에의 폴리-A 테일의 첨가를 지시하는 임의의 서열을 지칭한다. 진핵생물에서, 전사 종결자는 단백질 인자에 의해 인식되고, 종결에 뒤이어, 폴리(A) 폴리머라제의 존재 하에 폴리(A) 테일을 mRNA 전사물에 첨가하는 과정인 폴리아데닐화가 이어진다. 포유류 폴리(A) 신호는 전형적으로, 약 45개 뉴클레오티드 길이인 코어 서열로 구성되며, 이는 절단 및 폴리아데닐화 효율을 증강시키는 역할을 하는 다양한 보조 서열에 의해 플랭킹될 수 있다. 코어 서열은, 절단 및 폴리아데닐화-특이성 인자(CPSF)에 의해 인식되는 폴리 A 인식 모티프 또는 폴리 A 인식 서열로 지칭되는, mRNA 내의 고도로 보존된 상류 요소(AATAAA 또는 AAUAAA), 및 절단 자극 인자(CstF)에 의해 결합되는 불분명한(poorly defined) 하류 영역(U 또는 G 및 U가 풍부함)으로 구성된다. 사용될 수 있는 전사 종결자의 예는 예를 들어, 인간 성장 호르몬(HGH) 폴리아데닐화 신호, 시미안 바이러스 40(SV40) 후기 폴리아데닐화 신호, 토끼 베타-글로빈 폴리아데닐화 신호, 소 성장 호르몬(BGH) 폴리아데닐화 신호, 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 폴리아데닐화 신호, AOX1 전사 종결 서열, CYC1 전사 종결 서열, 또는 진핵생물 세포에서 유전자 발현을 조절하기에 적합한 것으로 공지된 임의의 전사 종결 서열을 포함한다. 일례에서, 폴리아데닐화 신호는 시미안 바이러스 40(SV40) 후기 폴리아데닐화 신호이다. 예를 들어, 폴리아데닐화 신호는 서열번호 199를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 또 다른 예에서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬(BGH) 폴리아데닐화 신호 또는 CpG 고갈된 BGH 폴리아데닐화 신호이다. 예를 들어, 폴리아데닐화 신호는 서열번호 200을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0221] 본원에 개시된 구조체는 또한 스플라이스 수용체 부위(예를 들어, FIX 코딩 서열의 상류 또는 5'와 같은 FIX 코딩 서열에 작동 가능하게 연결됨)를 포함할 수 있다. 스플라이스 수용체 부위는 예를 들어, NAG를 포함할 수 있거나 NAG로 이루어질 수 있다. 구체적인 예에서, 스플라이스 수용체는 *ALB* 스플라이스 수용체(예를 들어, *ALB*의 엑손 1 및 엑손 2를 함께 스플라이싱하는 데 사용되는 *ALB* 스플라이스 수용체(즉, *ALB* 엑손 2 스플라이스

수용체))이다. 예를 들어, 이러한 스플라이스 수용체는 인간 *ALB* 유전자로부터 유래될 수 있다. 또 다른 예에서, 스플라이스 수용체는 마우스 *Alb* 유전자(예를 들어, 마우스 *ALB*의 엑손 1 및 엑손 2를 함께 스플라이싱하는 데 사용되는 *Alb* 스플라이스 수용체(즉, 마우스 *Alb* 엑손 2 스플라이스 수용체))로부터 유래될 수 있다. 또 다른 예에서, 스플라이스 수용체는 *F9* 스플라이스 수용체(예를 들어, *F9*의 엑손 1 및 엑손 2를 함께 스플라이싱하는 데 사용되는 *F9* 스플라이스 수용체)이다. 예를 들어, 이러한 스플라이스 수용체는 인간 *F9* 유전자로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 이러한 스플라이스 수용체는 마우스 *F9* 유전자로부터 유래될 수 있다. 인공 스플라이스 수용체를 포함하는, 진핵생물에 유용한 추가적인 적합한 스플라이스 수용체 부위는 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Shapiro et al. (1987) *Nucleic Acids Res*. 15:7155-7174 and Burset et al. (2001) *Nucleic Acids Res*. 29:255-259]을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 구체적인 예에서, 스플라이스 수용체는 마우스 *Alb* 엑손 2 스플라이스 수용체이다. 구체적인 예에서, 스플라이스 수용체는 서열번호 201을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0222] 일부 예에서, 본원에 개시된 핵산 구조체는 양방향 구조체일 수 있으며, 이는 하기에 더 상세히 기재된다. 일부 예에서, 본원에 개시된 핵산 구조체는 일방향 구조체일 수 있으며, 이는 하기에 더 상세히 기재된다. 마찬가지로, 일부 예에서, 본원에 개시된 핵산 구조체는 본원 어디에서나 더 상세히 기재된 바와 같이 벡터(예를 들어, AAV 또는 rAAV8) 및/또는 지질 나노입자에 있을 수 있다.

[0223] ***(1) 인자 9(F9)***

[0224] 응고 인자 IX(FIX; 크리스마스 인자 또는 혈장 트롬보플라스틴 성분 또는 PTC로도 공지되어 있음)는 *인자 9(F9)*에 의해 인코딩되고, 간에서 합성된 415-아미노산 세린 프로테아제이다. 이는 Ca^{2+} 이온, 인지질, 및 인자 VIIIa의 존재 하에 인자 X를 활성 형태로 전환시킴으로써 혈액 응고의 내재성 경로에 참여하는 비타민 K-의존성 혈장 단백질이다. FIX의 혈장 농도는 인자 VIII의 약 50배이고, FIX는 약 24시간의 반감기를 갖는다.

[0225] 본원에 개시된 조성물 및 방법으로부터 발현되는 FIX는 임의의 야생형 또는 변이체 FIX일 수 있다. 일례에서, FIX는 인간 FIX 단백질이다. 인간 FIX는 UniProt 참조 번호 P00740로 지정되었다. 인간 인자 FIX에 대한 예시적인 아미노산 서열은 NCBI 수탁번호 NP_000124.1로 지정되고, 서열번호 1으로 기재된다. 예시적인 인간 *F9* mRNA(cDNA) 서열은 NCBI 수탁번호 NM_000133.4로 지정되고, 서열번호 2로 기재된다. 예시적인 인간 *F9* 코딩 서열은 CCDS ID CCDS14666.1로 지정되고, 서열번호 3으로 기재된다.

[0226] 일부 예에서, FIX(예를 들어, 인간 FIX)는 야생형 FIX(예를 들어, 야생형 인간 FIX) 서열 또는 이의 단편이다. 예를 들어, FIX는 성숙 FIX 아미노산 서열(즉, 신호 펩티드 및 프로펩티드의 제거 후 FIX 서열), 또는 성숙 FIX 아미노산 서열 및 프로펩티드의 일부를 포함하는 단편을 포함하는 단편일 수 있다. 구체적인 예에서, FIX는 서열번호 195를 포함할 수 있거나, 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일할 수 있다.

[0227] 일부 예에서, FIX(예를 들어, 인간 FIX)는 FIX의 과활성 또는 과기능성 변이체가 아니다(즉, FIX는 야생형에 비해 변이체 FIX의 활성을 증가시키는 하나 이상의 돌연변이를 갖지 않는다). 다른 예에서, FIX(예를 들어, 인간 FIX)는 FIX의 FVIII-독립적 변이체가 아니다(즉, FIX는 이의 보조인자, 인자 VIII의 부재 하에서 변이체 FIX가 응고를 활성화할 수 있게 하는 하나 이상의 돌연변이를 갖지 않는다). 다른 예에서, FIX(예를 들어, 인간 FIX)는 FIX의 과활성 또는 과기능성 변이체가 아니며, FIX의 FVIII-독립적 변이체가 아니다.

[0228] 다른 예에서, FIX(예를 들어, 인간 FIX)는 변이체 FIX(예를 들어, 변이체 인간 FIX) 또는 이의 단편이다. 예를 들어, 변이체 FIX 또는 이의 단편은 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 일례에서, 변이체 FIX 또는 이의 단편은 위치 R338에서의 아미노산 치환(예를 들어, R338A 또는 R338L) 및/또는 위치 S377에서의 아미노산 치환(예를 들어, S377W)과 같은, 야생형에 대한 변이체 FIX(과활성 또는 과기능성)의 활성을 증가시키는 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다. 예를 들어, US 2019/0017039호 및 US 2020/0172892호를 참조하며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 본원에서 지칭되는 넘버링은 표준 FIX 넘버링이며, 이때 위치 1은 서열번호 1에서 아미노산에 있는 티로신(즉, 서열번호 1에서 신호 펩티드 및 프로펩티드 다음의 성숙 FIX 단백질의 제1 아미노산)이다. 변이체 FIX의 추가적인 예는 알라닌, 류신, 발린, 이소류신, 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌, 세린 및 트레오닌으로부터 선택되는 잔기 338에서 아미노산을 포함한다. 추가의 FIX 변이체는 류신, 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 히스티딘, 라이신, 아스파라긴, 글루타민, 또는 티로신으로부터 선택되는 잔기 338에서 아미노산을 포함한다. 다른 예에서, 변이체 FIX 또는 이의 단편은 이의 보조인자, 인자 VIII, 예컨대 위치 L6, V181, E185, Y259, A261, K265, Y345, I383, E388, 또는 이들의 조합(예를 들어, L6F, V181I, E185D, E185S, Y259F, A261K, K265A, K265T, Y345F, I383V, E188G, 또는 이들의 조합)에서 아미노

산 치환의 부재 하에 변이체 FIX가 응고를 활성화할 수 있게 하는 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 예를 들어, US 10,125,357호, US 10,000,748호, US 10,604,749호, US 2008/0214462호, US 8,022,187호, 및 US 8,513,386호를 참조하며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 다른 예에서, 변이체 FIX 또는 이의 단편은 이의 보조인자, 인자 VIII, 예컨대 위치 V181, K265, I383, 또는 이들의 조합 또는 위치 L6, V181, K265, I383, E185, 또는 이들의 조합(예를 들어, L6F 돌연변이, V181I 돌연변이, K265A 또는 K265T 돌연변이, I383V 돌연변이, E185D 돌연변이, 또는 이들의 조합, 예컨대 L6F/V181I/K265A/I383V, L6F/V181I/K265T/I383V, V181I/K265A/I383V/E185D, V181I/K265T/I383V/E185D, V181I/K265A/I383V/E185S, 또는 V181I/K265T/I383V/E185S, 또는 V181I 돌연변이, K265A 또는 K265T 돌연변이, I383V 돌연변이, 또는 이들의 조합, 예컨대 V181I/K265A/I383V 또는 V181I/K265T/I383V)에서 아미노산 치환의 부재 하에 변이체 FIX가 응고를 활성화할 수 있게 하는 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 또 다른 예에서, 변이체 FIX 또는 이의 단편은 이의 보조인자, 인자 VIII의 부재 하에서 변이체 FIX가 응고를 활성화할 수 있게 하는 하나 이상의 돌연변이와 야생형 대비 변이체 FIX의 활성을 증가시키는 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다.

[0229] 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 어떠한 변형도 없이 야생형 FIX 코딩 서열을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 코돈 최적화(예를 들어, 인간 코돈), CpG 디뉴클레오티드의 고갈, 잠적 스플라이스 부위의 돌연변이, 하나 이상의 글리코실화 부위의 첨가, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 구조체의 CpG 디뉴클레오티드는 구조체의 치료 유용성을 제한할 수 있다. 먼저, 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오티드는 숙주 톨(toll)-유사 수용체-9(TLR-9)와 상호작용하여 선천성, 전염증성 면역 반응을 자극할 수 있다. 둘째, 일단 CpG 디뉴클레오티드가 메틸화되면, 이들은 메틸-CpG 결합 단백질에 의해 배위된 이식유전자 발현의 억제를 초래할 수 있다. 잠적 스플라이스 부위는 보통 스플라이스 부위로서 사용되지 않지만, 예를 들어 표준 스플라이스 부위를 비활성화하거나 스플라이스 부위를 생성하는 돌연변이에 의해 활성화될 수 있는 사전-메신저 RNA에서의 서열이다. 정확한 스플라이스 부위 선택은 성공적인 유전자 발현에 중요하고, 잠적 스플라이스 부위의 제거는 정상 또는 의도된 스플라이스 부위의 사용에 유리할 수 있다.

[0230] 일례에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 잠적 스플라이스 부위를 갖는다. 또 다른 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 모든 식별된 잠적 스플라이스 부위가 돌연변이되거나 제거된다. 또 다른 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는다(즉, CpG 고갈됨). 또 다른 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거된다. 또 다른 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 모든 CpG 디뉴클레오티드를 갖는다(즉, 완전히 CpG 고갈됨). 또 다른 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서의 발현을 위해 코돈 최적화됨). 구체적인 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, CpG 고갈됨), 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 잠적 스플라이스 부위를 갖는다. 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되고(예를 들어, 잠적 스플라이스 부위를 돌연변이시키기 위해 하나의 CpG를 도입함), 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 또는 모든 식별된 잠적 스플라이스 부위를 갖는다. 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, CpG 고갈됨), 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨). 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 모든 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, 완전히 CpG 고갈됨), 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨).

[0231] 다양한 코돈 최적화된 FIX 코딩 서열이 제공된다. FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈(예를 들어, 완전히 CpG)되고/되거나 코돈 최적화될 수 있다(예를 들어, CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화됨). 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 임의의 하나에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 어느 하나에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 어느 하나에 기재된 서열로 이루어진다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도

94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0232] 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 임의의 하나에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 어느 하나에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 어느 하나에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열은 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0233] 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166 또는 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166 또는 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166 또는 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 166 또는 서열번호 165에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 166 또는 서열번호 165에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 166 또는 서열번호 165에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열은 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는

FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0234] 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 166에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 166에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 166에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열은 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0235] 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는

100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 (서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 165에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 165에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 165에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열은 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0236] 다양한 최적화된 자연 FIX 코딩 서열이 또한 제공된다. 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 임의의 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 임의의 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 임의의 하나와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 임의의 하나에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 어느 하나에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 어느 하나에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0237] 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는

100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0238] 특정 *F9* 핵산 구조체 서열이 본원에 개시되어 있을 경우, 이들은 개시된 서열 또는 서열의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 예를 들어, 본원에 개시된 *F9* 핵산 구조체가 가상 서열 5'-CTGGACCGA-3'로 이루어지는 경우, 이는 또한 그 서열(5'-TCGGTCCAG-3')의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 마찬가지로, 양방향 구조체 요소가 특정 5'에서 3' 순서로 본원에 개시되는 경우, 이들은 또한 이러한 요소의 순서의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 마찬가지로, 일방향 구조체 요소가 특정 5'에서 3' 순서로 본원에 개시되는 경우, 이들은 또한 이러한 요소의 순서의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 이에 대한 하나의 이유는, 본원에 개시된 많은 구현예에서, *F9* 핵산 구조체는 단일 가닥 재조합 AAV 벡터의 일부라는 것이다. 단일 가닥 AAV 게놈은 센스(플러스-가닥) 또는 안티-센스(마이너스-가닥 게놈)로 포장되고, + 및 - 극성의 단일 가닥 AAV 게놈은 동일한 빈도로 성숙 rAAV 비리온으로 포장된다. 예를 들어, 문헌[LING et al. (2015) *J. Mol. Genet. Med.* 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499, and Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0239] ***(2) 양방향 구조체***

[0240] 본원에 개시된 *F9* 핵산 구조체는 양방향 구조체일 수 있다. 이러한 양방향 구조체는 인코딩된 FIX의 향상된 삽입 및 발현을 허용할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이 뉴클레아제 작용제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템, 아

연 집게 뉴클레아제(ZFN) 시스템; 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 시스템)과 조합하여 사용되는 경우, 핵산 구조체의 양방향성은 구조체가 표적 게놈 유전자좌 내에서 어느 한 방향으로 삽입(즉, 한 방향으로의 삽입에 제한되지 않음)될 수 있게 하여, 어느 한 배향으로 삽입될 때 FIX의 발현을 허용함으로써, 본원에 예시된 바와 같이 발현 효율을 향상시킨다. 예를 들어, 뉴클레아제 작용제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템, 아연 집게 뉴클레아제(ZFN) 시스템; 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 시스템)과 조합하여 사용되는 경우, 핵산 구조체의 양방향성은 구조체가 절단 부위 또는 표적 삽입 부위 내에서 어느 한 방향으로 삽입(즉, 한 방향으로의 삽입에 제한되지 않음)될 수 있게 하여, 어느 한 배향으로 삽입될 때 FIX의 발현을 허용함으로써, 본원에 예시된 바와 같이 삽입 및 발현 효율을 향상시킨다.

[0241] 본원에 개시된 바와 같은 양방향 구조체는 적어도 2개의 핵산 세그먼트를 포함할 수 있으며, 여기서 제1 세그먼트는 제1 FIX 코딩 서열을 포함하고, 제2 세그먼트는 제2 FIX 코딩 서열의 역보체를 포함하거나, 그 반대이다. 그러나, 본원에 개시된 다른 양방향 구조체는 적어도 2개의 핵산 세그먼트를 포함할 수 있으며, 여기서 제1 세그먼트는 FIX 코딩 서열을 포함하고, 제2 세그먼트는 다른 단백질에 대한 코딩 서열의 역보체를 포함하거나, 그 반대이다. 역보체는 참조 서열의 보체 서열인 서열을 지칭하며, 여기서 보체 서열은 역배향으로 기록된다. 예를 들어, 가상 서열 5'-CTGGACCGA-3'에 대해, 완벽한 보체 서열은 3'-GACCTGGCT-5'이고, 완벽한 역보체는 5'-TCGGTCCAG-3'로 기록된다. 역보체 서열은 완벽할 필요는 없고, 참조 서열과 동일한 폴리펩티드 또는 유사한 폴리펩티드를 여전히 인코딩할 수 있다. 코돈 사용 중복으로 인해, 역보체는 동일한 폴리펩티드를 인코딩하는 참조 서열로부터 벗어날 수 있다. 코딩 서열은 하나 이상의 추가 서열, 예컨대 FIX 또는 다른 단백질에 연결된, 신호 서열, 표지 서열(예를 들어, HiBit), 또는 이종성 기능적 서열(예를 들어, 핵 국소화 서열(NLS) 또는 자가-절단 펩티드)과 같은 아미노- 또는 카르복시-말단 아미노산 서열을 인코딩하는 서열을 임의로 포함할 수 있다.

[0242] 특정 양방향 구조체 서열이 본원에 개시되는 경우, 이들은 개시된 서열 또는 서열의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 예를 들어, 본원에 개시된 양방향 구조체가 가상 서열 5'-CTGGACCGA-3'로 이루어지는 경우, 이는 또한 그 서열(5'-TCGGTCCAG-3')의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 마찬가지로, 양방향 구조체 요소가 특정 5'에서 3' 순서로 본원에 개시되는 경우, 이들은 또한 이러한 요소의 순서의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 예를 들어, 5'부터 3'까지 제1 스플라이스 수용체, 제1 코딩 서열, 제1 종결자, 제2 종결자의 역보체, 제2 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하는 양방향 구조체가 본원에 개시되는 경우, 이는 또한 5'부터 3'까지 제2 스플라이스 수용체, 제2 코딩 서열, 제2 종결자, 제1 종결자의 역보체, 제1 코딩 서열의 역보체, 및 제1 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하는 구조체를 포괄하도록 의도된다. 이에 대한 하나의 이유는, 본원에 개시된 많은 구현예에서, 양방향 구조체는 단일 가닥 재조합 AAV 벡터의 일부라는 것이다. 단일 가닥 AAV 게놈은 센스(플러스-가닥) 또는 안티-센스(마이너스-가닥 게놈)로 포장되고, + 및 - 극성의 단일 가닥 AAV 게놈은 동일한 빈도로 성숙 rAAV 비리온으로 포장된다. 예를 들어, 문헌[LING et al. (2015) *J. Mol. Genet. Med.* 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499, and Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0243] 적어도 2개의 세그먼트가 FIX를 인코딩하는 경우, 적어도 2개의 세그먼트는 동일한 FIX 단백질 또는 상이한 FIX 단백질을 인코딩할 수 있다. 상이한 FIX 단백질은 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 99.5% 동일할 수 있다. 예를 들어, 제1 세그먼트는 야생형 FIX 단백질 또는 이의 단편을 인코딩할 수 있고, 제2 세그먼트는 변이체 FIX 단백질 또는 이의 단편을 인코딩할 수 있거나, 그 반대일 수 있다. 대안적으로, 제1 세그먼트는 제1 변이체 FIX 단백질을 인코딩할 수 있고, 제2 세그먼트는 제1 변이체 FIX 단백질과 상이한 제2 변이체 FIX 단백질을 인코딩할 수 있다. 바람직하게는, 2개의 세그먼트는 동일한 FIX 단백질을 인코딩한다(즉, 100% 동일함).

[0244] 2개의 세그먼트가 동일한 FIX 단백질을 인코딩할 경우에도, 제1 세그먼트 내의 FIX 코딩 서열은 제2 세그먼트 내의 FIX 코딩 서열과 상이할 수 있다. 일부 양방향 구조체에서, 제1 코딩 서열에서의 코돈 사용빈도는 제2 코딩 서열에서의 코돈 사용빈도와 동일하다. 다른 양방향 구조체에서, 제2 코딩 서열은 헤어핀 형성을 감소시키기 위해 제1 코딩 서열의 코돈 사용빈도와 상이한 코돈 사용빈도를 채택한다. 코딩 서열 중 하나 또는 둘 다는 숙주 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있다. 일부 양방향 구조체에서, 코딩 서열 중 단지 하나만 코돈-최적화된다. 일부 양방향 구조체에서, 제1 코딩 서열이 코돈-최적화된다. 일부 양방향 구조체에서, 제2 코딩 서열이 코돈-최적화된다. 일부 양방향 구조체에서, 코딩 서열은 둘 다 코돈-최적화된다. 예를 들어, 제2 FIX 코딩 서열은 코돈 최적화될 수 있거나, 또는 제1 세그먼트에서 FIX 코딩 서열에 의해 인코딩된 동일한 FIX (즉, 동일한 아미노산 서열)의 하나 이상의 아미노산에 대한 하나 이상의 대체 코돈을 사용할 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같은 대체 코돈은 주어진 아미노산에 대한 코돈 사용빈도의 변화를 지칭하고, 주어진 발현 시스

템에 대해 바람직하거나 최적화된 코돈(코돈 최적화됨)일 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 주어진 발현 시스템에서 바람직한 코돈 사용빈도, 또는 널리 용인된 코돈이 공지되어 있다.

[0245] 일례에서, 제2 세그먼트는 헤어핀 형성을 감소시키기 위해 제1 세그먼트에서 FIX 코딩 서열의 것으로부터 상이한 코돈 사용빈도를 채택하는 FIX 코딩 서열의 역보체를 포함한다. 이러한 역보체는 제1 세그먼트 내 코딩 서열의 모든 뉴클레오티드보다는 몇몇 뉴클레오티드와 염기쌍을 형성하지만, 이는 임의로 동일한 폴리펩티드를 인코딩한다. 일례에서, 제2 세그먼트 내의 역보체 서열은 제1 세그먼트 내의 코딩 서열에 실질적으로 상보적이지 않다(예를 들어, 70% 이하 상보적이지 않음). 그러나, 다른 경우에, 제2 세그먼트는 제1 세그먼트 내의 코딩 서열에 고도로 상보적인(예를 들어, 적어도 90% 상보적임) 역보체 서열을 포함한다.

[0246] 제2 세그먼트는 제1 세그먼트와 임의의 백분율의 상보성을 가질 수 있다. 예를 들어, 제2 세그먼트 서열은 제1 세그먼트와 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97%, 또는 적어도 약 99%의 상보성을 가질 수 있다. 또 다른 예로, 제2 세그먼트 서열은 제1 세그먼트와 약 30% 미만, 약 35% 미만, 약 40% 미만, 약 45% 미만, 약 50% 미만, 약 55% 미만, 약 60% 미만, 약 65% 미만, 약 70% 미만, 약 75% 미만, 약 80% 미만, 약 85% 미만, 약 90% 미만, 약 95% 미만, 약 97% 미만, 또는 약 99% 미만의 상보성을 가질 수 있다. 일부 핵산 구조체에서, 제2 코딩 서열의 역보체는, 제1 코딩 서열과 실질적으로 상보적이지 않거나(예를 들어, 70% 이하 상보적임), 제1 코딩 서열의 단편과 실질적으로 상보적이지 않거나, 제1 코딩 서열과 고도로 상보적이거나(예를 들어, 적어도 90% 상보적임), 제1 코딩 서열의 단편과 고도로 상보적이거나, 제1 코딩 서열의 역보체와 약 50% 내지 약 80% 동일하거나, 제1 코딩 서열의 역보체와 약 60% 내지 약 100% 동일하다.

[0247] 본원에 개시된 양방향 구조체는 임의의 특정 용도에 대해 필요에 따라 그리고/또는 하나 이상의 원하는 기능을 부여하는 임의의 적합한 구조적 특징을 포함하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 양방향 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함할 필요가 없고/없거나, 예를 들어 상동성-독립적 공여체 구조체일 수 있다. 부분적으로 핵산 구조체의 양방향 기능으로 인해, 양방향 구조체는 본원에 기재된 바와 같이 어느 한 방향으로 게놈 유전자좌로 삽입되어 FIX의 효율적인 삽입 및/또는 발현을 허용할 수 있다.

[0248] 일부 경우에, 양방향 핵산 구조체는 FIX의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않는다. 예를 들어, FIX의 발현은 숙주 세포의 프로모터(예를 들어, 이식유전자가 숙주 세포의 *ALB* 유전자좌에 통합될 때의 내인성 *ALB* 프로모터)에 의해 유도될 수 있다. 다른 경우에, 양방향 핵산 구조체는 FIX 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 프로모터를 포함할 수 있다. 즉, 발현에 필요하지 않지만, 본원에 개시된 구조체는 또한 프로모터, 인핸서, 절연체, 내부 리보솜 진입 부위, 펩티드를 암호화하는 추가 서열, 및/또는 폴리아데닐화 신호와 같은 전사 또는 번역 조절 서열을 포함할 수 있다. 일부 양방향 구조체는 제1 FIX 코딩 서열의 발현을 유도하는 프로모터 및/또는 제2 FIX 코딩 서열의 역보체의 발현을 유도하는 프로모터의 역보체를 포함할 수 있다.

[0249] 본원에 개시된 양방향 구조체는 임의의 특정 용도에 대해 필요에 따라 그리고/또는 하나 이상의 원하는 기능을 부여하는 임의의 적합한 구조적 특징을 포함하거나 배제하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 일부 양방향 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 부분적으로 핵산 구조체의 양방향 기능으로 인해, 양방향 구조체는 본원에 기재된 바와 같이 어느 한 방향(배향)으로 게놈 유전자좌로 삽입되어 이종성 FIX의 효율적인 삽입 및/또는 발현을 허용할 수 있다.

[0250] 양방향 구조체는 일부 경우에, 하나 이상의(예를 들어, 2개의) 폴리아데닐화 테일 서열 또는 폴리아데닐화 신호 서열을 포함할 수 있다. 일부 양방향 구조체에서, 제1 세그먼트는 제1 폴리아데닐화 신호 서열을 포함할 수 있다. 일부 양방향 구조체에서, 제1 세그먼트는 제1 폴리아데닐화 신호 서열을 포함할 수 있다. 일부 양방향 구조체에서, 제1 세그먼트는 제1 폴리아데닐화 신호 서열을 포함할 수 있고, 제2 세그먼트는 제2 폴리아데닐화 신호 서열(예를 들어, 폴리아데닐화 신호 서열의 역보체)을 포함할 수 있다. 일부 양방향 구조체에서, 제1 세그먼트는 제1 코딩 서열의 3'에 위치한 제1 폴리아데닐화 신호 서열을 포함할 수 있다. 일부 양방향 구조체에서, 제2 세그먼트는 제2 코딩 서열의 역보체의 5'에 위치한 제2 폴리아데닐화 신호 서열의 역보체를 포함할 수 있다. 일부 양방향 구조체에서, 제1 세그먼트는 제1 코딩 서열의 3'에 위치하는 제1 폴리아데닐화 신호 서열을 포함할 수 있고, 제2 세그먼트는 제2 코딩 서열의 역보체의 5'에 위치하는 제2 폴리아데닐화 신호 서열의 역보체를 포함할 수 있다. 제1 폴리아데닐화 신호 서열 및 제2 폴리아데닐화 신호 서열은 동일하거나 상이할 수 있다. 일례에서, 제1 폴리아데닐화 신호 및 제2 폴리아데닐화 신호는 상이하다. 특정 예에서, 제1 폴리아데닐화 신호는 시미안 바이러스 40(SV40) 후기 폴리아데닐화 신호(또는 이의 변이체)이고, 제2 폴리아데닐화 신호는 소

성장 호르몬(BGH) 폴리아데닐화 신호(또는 이의 변이체)이거나, 또는 그 반대이다. 예를 들어, 하나의 폴리아데닐화 신호는 SV40 폴리아데닐화 신호일 수 있고, 다른 폴리아데닐화 신호는 CpG-고갈된 BGH 폴리아데닐화 신호일 수 있다. 특정 예에서, 하나의 폴리아데닐화 신호는 서열번호 199를 포함할 수 있거나, 이로 본질적으로 이루어질 수 있거나, 이로 이루어질 수 있고, 다른 폴리아데닐화 신호는 서열번호 200을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어질 수 있거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0251] 일부 양방향 구조체에서, 제1 세그먼트 및 제2 세그먼트 둘 모두는 폴리아데닐화 테일 서열을 포함한다. 적합한 폴리아데닐화 테일 서열을 설계하는 방법이 공지되어 있다. 예를 들어, 일부 양방향 구조체에서, 제1 세그먼트 및 제2 세그먼트 중 하나 또는 둘 모두는 폴리아데닐화 테일 서열 및/또는 개방형 리딩 프레임의 폴리아데닐화 신호 서열(즉, 폴리아데닐화 테일 서열 및/또는 코딩 서열의 폴리아데닐화 신호 서열 3', 또는 코딩 서열의 역보체의 폴리아데닐화 신호 서열 5')을 포함한다. 폴리아데닐화 테일 서열은, 예를 들어, 제1 및/또는 제2 세그먼트 내의 FIX 코딩 서열(또는 다른 단백질 코딩 서열)의 "폴리-A" 신전부 하류로서 인코딩될 수 있다. 폴리-A 테일은 예를 들어, 적어도 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 또는 100개 아데닌, 및 임의로 최대 300개의 아데닌을 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 폴리-A 테일은 95개, 96개, 97개, 98개, 99개, 또는 100개의 아데닌 뉴클레오티드를 포함한다. 적합한 폴리아데닐화 테일 서열 및/또는 폴리아데닐화 신호 서열을 설계하는 방법은 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 폴리아데닐화 신호 서열 AAUAAA는 포유류 시스템에서 일반적으로 사용되지만, UAUAAA 또는 AU/GUAAA와 같은 변이체가 확인되었다. 예를 들어, 문헌[Proudfoot (2011) *Genes & Dev*. 25(17):1770-82]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 일부 양방향 구조체에서, 단일 양방향 종결자를 사용하여 센스 또는 안티센스 방향 중 어느 하나에서 RNA 폴리머라제 전사를 종결시킬 수 있다(즉, 제1 세그먼트 및 제2 세그먼트 둘 모두로부터 RNA 폴리머라제 전사를 종결시킴). 양방향 종결자의 예는 ARO4, TRP1, TRP4, ADH1, CYC1, GAL1, GAL7, 및 GAL10 종결자를 포함한다.

[0252] 양방향 구조체는 일부 경우에, 하나 이상의(예를 들어, 2개의) 스플라이스 수용체 부위를 포함할 수 있다. 일부 양방향 구조체에서, 제1 세그먼트는 스플라이스 수용체 부위를 포함할 수 있다. 일부 양방향 구조체에서, 제2 세그먼트는 스플라이스 수용체 부위를 포함할 수 있다. 일부 양방향 구조체에서, 제1 세그먼트는 제1 스플라이스 수용체 부위를 포함할 수 있고, 제2 세그먼트는 제2 스플라이스 수용체 부위(예를 들어, 스플라이스 수용체 부위의 역보체)를 포함할 수 있다. 일부 양방향 구조체에서, 제1 세그먼트는 제1 코딩 서열의 5'에 위치한 제1 스플라이스 수용체 부위를 포함한다. 일부 양방향 구조체에서, 제2 세그먼트는 제2 코딩 서열의 역보체의 3'에 위치한 제2 스플라이스 수용체 부위의 역보체를 포함한다. 일부 양방향 구조체에서, 제1 세그먼트는 제1 코딩 서열의 5'에 위치하는 제1 스플라이스 수용체 부위를 포함하고, 제2 세그먼트는 제2 코딩 서열의 역보체의 3'에 위치하는 제2 스플라이스 수용체 부위의 역보체를 포함한다. 제1 스플라이스 수용체 부위 및 제2 스플라이스 수용체 부위는 동일하거나 상이할 수 있다. 구체적인 예에서, 스플라이스 수용체 둘 모두는 마우스 *A1b* 엑손 2 스플라이스 수용체이다. 구체적인 예에서, 스플라이스 수용체 둘 모두는 서열번호 201을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0253] 양방향 구조체는 스플라이스 수용체에 결합된 제1 코딩 서열 및 스플라이스 수용체의 역보체에 작동 가능하게 연결된 제2 코딩 서열의 역보체를 인코딩하는 제1 코딩 서열을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 양방향 구조체는 또한 구조체의 어느 하나 또는 양쪽 말단 상에 스플라이스 수용체 부위, 또는 제1 세그먼트 및 제2 세그먼트 둘 모두에서 스플라이스 수용체 부위를 포함할 수 있다(예를 들어, 코딩 서열의 스플라이스 수용체 부위 5', 또는 코딩 서열의 역보체의 스플라이스 수용체 3'의 역보체). 스플라이스 수용체 부위는 예를 들어, NAG를 포함할 수 있거나 NAG로 이루어질 수 있다. 구체적인 예에서, 스플라이스 수용체는 *ALB* 스플라이스 수용체(예를 들어, *ALB*의 엑손 1 및 엑손 2를 함께 스플라이싱하는 데 사용되는 *ALB* 스플라이스 수용체(즉, *ALB* 엑손 2 스플라이스 수용체))이다. 예를 들어, 이러한 스플라이스 수용체는 인간 *ALB* 유전자로부터 유래될 수 있다. 또 다른 예에서, 스플라이스 수용체는 마우스 *A1b* 유전자(예를 들어, 마우스 *ALB*의 엑손 1 및 엑손 2를 함께 스플라이싱하는 데 사용되는 *A1b* 스플라이스 수용체(즉, 마우스 *A1b* 엑손 2 스플라이스 수용체))로부터 유래될 수 있다. 또 다른 예에서, 스플라이스 수용체는 *F9* 스플라이스 수용체(예를 들어, *F9*의 엑손 1 및 엑손 2를 함께 스플라이싱하는 데 사용되는 *F9* 스플라이스 수용체)이다. 예를 들어, 이러한 스플라이스 수용체는 인간 *F9* 유전자로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 이러한 스플라이스 수용체는 마우스 *F9* 유전자로부터 유래될 수 있다. 인공 스플라이스 수용체를 포함하는, 진핵생물에 유용한 추가적인 적합한 스플라이스 수용체 부위는 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Shapiro et al. (1987) *Nucleic Acids Res*. 15:7155-7174 and Burset et al. (2001) *Nucleic Acids Res*. 29:255-259]을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 양방향 구조체에 사용되는 스플라이스 수용체는 동일하거나 상이할 수 있다. 구체적인 예에서, 스

플라이스 수용체 둘 모두는 마우스 *Alb* 엑손 2 스플라이스 수용체이다.

[0254] 양방향 구조체는 원형 또는 선형일 수 있다. 예를 들어, 양방향 구조체는 선형일 수 있다. 제1 세그먼트 및 제2 세그먼트는 링커 서열을 통해 선형 방식으로 접합될 수 있다. 예를 들어, 역보체 서열을 포함하는 제2 세그먼트의 5' 단부는 제1 세그먼트의 3' 단부에 연결될 수 있다. 대안적으로, 제1 세그먼트의 5' 단부는 역보체 서열을 포함하는 제2 세그먼트의 3' 단부에 연결될 수 있다. 링커는 임의의 적합한 길이일 수 있다. 예를 들어, 링커는 약 5개 내지 약 2000개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 예로서, 링커 서열은 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 약 10개, 약 11개, 약 12개, 약 13개, 약 14개, 약 15개, 약 16개, 약 17개, 약 18개, 약 19개, 약 20개, 약 25개, 약 30개, 약 35개, 약 40개, 약 45개, 약 50개, 약 55개, 약 60개, 약 65개, 약 70개. 약 75개, 약 80개, 약 85개, 약 90개, 약 95개, 약 100개, 약 150개, 약 200개, 약 250개, 약 300개, 약 500개, 약 1000개, 약 1500개, 약 2000개, 또는 이상의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 링커 서열에 더하여, 또는 그 대신에 다른 구조적 요소가 또한 제1 세그먼트 및 제2 세그먼트 사이에 삽입될 수 있다.

[0255] 본원에 개시된 양방향 구조체는 DNA 또는 RNA, 단일 가닥, 이중 가닥, 또는 부분적으로 단일 가닥 및 부분적으로 이중 가닥일 수 있다. 예를 들어, 구조체는 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA일 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산은 본원에 기재된 바와 같이 변형될 수 있다(예를 들어, 뉴클레오시드 유사체를 사용함). 구체적인 예에서, 양방향 구조체는 단일 가닥(예를 들어, 단일 가닥 DNA)이다.

[0256] 본원에 개시된 양방향 구조체는 필요에 따라 그리고/또는 하나 이상의 기능적 이점을 부여하기 위해 하나 이상의 적합한 구조적 특징을 포함하도록 어느 하나 또는 양쪽 말단에서 변형될 수 있다. 예를 들어, 구조적 변형은 본원에 개시된 구조체를 숙주 세포에 전달하는 데 사용되는 방법(들)(예를 들어, 전달을 위해 지질 나노입자 내로의 바이러스 벡터 전달 또는 포장의 사용)에 따라 달라질 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 역위 말단 반복(ITR), 헤어핀, 루프, 및 환상체(toroid)와 같은 다른 구조와 같은 말단 구조체를 포함한다. 예를 들어, 본원에 개시된 구조체는 1개, 2개, 또는 3개의 ITR을 포함할 수 있거나 2개 이하의 ITR을 포함할 수 있다. 구조적 변형의 다양한 방법이 공지되어 있다.

[0257] 유사하게, 구조체의 하나 또는 양쪽 말단은 공지된 방법에 의해(예를 들어, 엑소뉴클레오용해성 분해로부터) 보호될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 디데옥시뉴클레오티드 잔기는 선형 분자의 3' 말단에 첨가될 수 있고/있거나 자기-상보적 올리고뉴클레오티드가 하나 이상의 말단에 결찰될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Chang et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4959-4963 and Nehls et al. (1996) *Science* 272:886-889]을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 분해로부터 구조체를 보호하는 추가 방법은 말단 아미노기(들)의 첨가 및 예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 및 O-메틸 리보스 또는 데옥시리보스 잔기와 같이 변형된 뉴클레오티드간 연결부의 사용을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다.

[0258] 본원에 더 상세히 개시된 바와 같이, 본원에 개시된 양방향 구조체는 예를 들어, 복제 기점, 프로모터, 및 항생제 내성을 인코딩하는 유전자와 같은 추가 서열을 갖는 벡터의 일부로서 세포에 도입될 수 있다. 구조체는 나상 핵산으로서 도입될 수 있거나, 리포솜, 중합체, 또는 폴록사머와 같은 작용제와 복합체화된 핵산으로서 도입될 수 있거나, 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, AAV, 헤르페스바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스)에 의해 전달될 수 있다.

[0259] 본원에 개시된 양방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 코돈 최적화(예를 들어, 인간 코돈), CpG 디뉴클레오티드의 고갈, 잠적 스플라이스 부위의 돌연변이, 하나 이상의 글리코실화 부위의 첨가, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 구조체의 CpG 디뉴클레오티드는 구조체의 치료 유용성을 제한할 수 있다. 먼저, 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오티드는 숙주 톨(toll)-유사 수용체-9(TLR-9)와 상호작용하여 선천성, 전염증성 면역 반응을 자극할 수 있다. 둘째, 일단 CpG 디뉴클레오티드가 메틸화되면, 이들은 메틸-CpG 결합 단백질에 의해 배위된 이식유전자 발현의 억제를 초래할 수 있다. 잠적 스플라이스 부위는 보통 스플라이스 부위로서 사용되지 않지만, 예를 들어 표준 스플라이스 부위를 비활성화하거나 스플라이스 부위를 생성하는 돌연변이에 의해 활성화될 수 있는 사전-메신저 RNA에서의 서열이다. 정확한 스플라이스 부위 선택은 성공적인 유전자 발현에 중요하고, 잠적 스플라이스 부위의 제거는 정상 또는 의도된 스플라이스 부위의 사용에 유리할 수 있다.

[0260] 일례에서, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 잠적 스플라이스 부위를 갖는다. 또 다른 예에서, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 모든 식별된 잠적 스플라이스 부위가 돌연변이되거나 제거된다. 또 다른 예에서, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는다(즉, CpG 고갈됨). 또 다른 예에서, 본원에 개시된 양방향

구조체에서 FIX 코딩 서열은 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거된다. 또 다른 예에서, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 모든 CpG 디뉴클레오티드를 갖는다(즉, 완전히 CpG 고갈됨). 또 다른 예에서, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서의 발현을 위해 코돈 최적화됨). 구체적인 예에서, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, CpG 고갈됨), 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 잠적 스플라이스 부위를 갖는다. 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되고, 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 또는 모든 식별된 잠적 스플라이스 부위를 갖는다. 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, CpG 고갈됨), 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨). 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 모든 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, 완전히 CpG 고갈됨), 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨).

[0261] 하나의 구체적인 예에서, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 하나의 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, CpG 고갈됨), 하나 이상의 잠적 스플라이스 부위를 갖고, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 다른 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, CpG 고갈됨), 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨). 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 하나의 FIX 코딩 서열은 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되고, 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 또는 모든 식별된 잠적 스플라이스 부위를 갖고, 본원에 개시된 양방향 구조체에서 다른 FIX 코딩 서열은 제거된 모든 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, 완전히 CpG 고갈됨), 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨).

[0262] 예시적인 양방향 구조체에서, 제2 세그먼트는 제1 세그먼트의 3'에 위치하고, 제1 FIX 코딩 서열 및 제2 FIX 코딩 서열은 둘 다 동일한 인간 FIX 단백질을 인코딩하고, 제2 FIX 코딩 서열은 제1 FIX 코딩 서열의 코돈 사용빈도와 상이한 코돈 사용빈도를 채택하고, 제1 세그먼트는 제1 FIX 코딩 서열의 3'에 위치한 제1 폴리아데닐화 신호 서열을 포함하고, 제2 세그먼트는 제2 FIX 코딩 서열의 역보체의 5'에 위치한 제2 폴리아데닐화 신호 서열의 역보체를 포함하고, 제1 세그먼트는 제1 FIX 코딩 서열의 5'에 위치한 제1 스플라이스 수용체 부위를 포함하고, 제2 세그먼트는 제2 FIX 코딩 서열의 역보체의 3'에 위치한 제2 스플라이스 수용체 부위의 역보체를 포함하고, 핵산 구조체는 제1 FIX 단백질 및 제2 FIX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 임의로 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다.

[0263] 양방향 구조체의 일례에서, 제1 FIX 단백질 코딩 서열 및 제2 FIX 단백질 코딩 서열은 상이하지만 동일한 FIX 단백질 서열을 인코딩하고, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화된다(예를 들어, CpG-고갈되고 코돈 최적화되거나 완전히 CpG-고갈되고 코돈 최적화됨). 일례에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 임의의 하나에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 어느 하나에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 어느 하나에 기재된 서열로 이루어진다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의

로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0264] 일례에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 임의의 하나에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 어느 하나에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 어느 하나에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0265] 일례에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166 또는 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166 또는 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166 또는 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 166 또는 서열번호 165에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 166 또는 서열번호 165에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 166 또는 서열번호 165에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0266] 일례에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적

어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 166에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 166에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 166에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0267] 일례에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거

나) 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 165에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 165에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 165에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0268] 다양한 최적화된 자연 FIX 코딩 서열이 또한 제공된다. 일례에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 임의의 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 임의의 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 임의의 하나와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 임의의 하나에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 어느 하나에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 어느 하나에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0269] 일례에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적

어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0270] 일례에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을

포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0271] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나)

서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0272] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할

수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0273] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변

형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0274] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고

예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0275] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다.

임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0276] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0277] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를

들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0278] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또

는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0279] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 166에 기재된 서열을 포함한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100%

동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0280] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 166에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할

수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0281] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 166에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의

CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0282] 일례에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어

도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0283] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195

에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0284] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0285] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어

CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0286] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적

어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0287] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX

코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0288] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수

있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0289] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코

딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0290] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코

딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0291] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 165에 기재된 서열을 포함한다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백

질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0292] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 165에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0293] 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 165에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열 중 하나는 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코

딩 서열 중 하나는 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 일례에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, 다른 FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. 다른 FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 다른 FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열 중 하나 또는 둘 모두는 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0294] 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 202 내지 서열번호 224 또는 서열번호 172 내지 서열번호 194 중 임의의 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 202 내지 서열번호 224 또는 서열번호 172 내지 서열번호 194 중 임의의 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 202 내지 서열번호 224 또는 서열번호 172 내지 서열번호 194 중 임의의 하나와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 202 내지 서열번호 224 또는 서열번호 172 내지 서열번호 194 중 임의의 하나를 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 202

내지 서열번호 224 또는 서열번호 172 내지 서열번호 194 중 임의의 하나로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 202 내지 서열번호 224 또는 서열번호 172 내지 서열번호 194 중 임의의 하나로 이루어진다.

[0295] 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 203 내지 서열번호 224 또는 서열번호 173 내지 서열번호 194 중 임의의 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 203 내지 서열번호 224 또는 서열번호 173 내지 서열번호 194 중 임의의 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 203 내지 서열번호 224 또는 서열번호 173 내지 서열번호 194 중 임의의 하나와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 203 내지 서열번호 224 또는 서열번호 173 내지 서열번호 194 중 임의의 하나를 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 203 내지 서열번호 224 또는 서열번호 173 내지 서열번호 194 중 임의의 하나로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 203 내지 서열번호 224 또는 서열번호 173 내지 서열번호 194 중 임의의 하나로 이루어진다.

[0296] 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 204 내지 서열번호 224 또는 서열번호 174 내지 서열번호 194 중 임의의 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 204 내지 서열번호 224 또는 서열번호 174 내지 서열번호 194 중 임의의 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 204 내지 서열번호 224 또는 서열번호 174 내지 서열번호 194 중 임의의 하나와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 204 내지 서열번호 224 또는 서열번호 174 내지 서열번호 194 중 임의의 하나를 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 204 내지 서열번호 224 또는 서열번호 174 내지 서열번호 194 중 임의의 하나로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 204 내지 서열번호 224 또는 서열번호 174 내지 서열번호 194 중 임의의 하나로 이루어진다.

[0297] 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 209 또는 서열번호 180 또는 서열번호 179와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 209 또는 서열번호 180 또는 서열번호 179와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 209 또는 서열번호 180 또는 서열번호 179와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 209 또는 서열번호 180 또는 서열번호 179를 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 209 또는 서열번호 180 또는 서열번호 179로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 209 또는 서열번호 180 또는 서열번호 179로 이루어진다.

[0298] 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 180과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 180과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 180과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 180을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 180으로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210 또는 서열번호 180으로 이루어진다.

[0299] 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한

서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210으로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 210으로 이루어진다.

[0300] 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 180과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 180과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 180과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 180을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 180으로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 180으로 이루어진다.

[0301] 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 209 또는 서열번호 179와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 209 또는 서열번호 179와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 209 또는 서열번호 179와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 209 또는 서열번호 179를 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 209 또는 서열번호 179로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 209 또는 서열번호 179로 이루어진다.

[0302] 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 209와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 209와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 209와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 209를 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 209로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 209로 이루어진다.

[0303] 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 179와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 179와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 179와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 179를 포함한다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 179로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 특정한 예에서, 예시적인 양방향 구조체는 서열번호 179로 이루어진다.

[0304] ***(3) 일방향 구조체***

[0305] 본원에 개시된 *F9* 핵산 구조체는 일방향 구조체일 수 있다.

[0306] 특정 일방향 구조체 서열이 본원에 개시되는 경우, 이들은 개시된 서열 또는 서열의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 예를 들어, 본원에 개시된 일방향 구조체가 가상 서열 5'-CTGGACCGA-3'로 이루어지는 경우, 이는 또한 그 서열(5'-TCGGTCCAG-3')의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 마찬가지로, 일방향 구조체 요소가 특정 5'에서 3' 순서로 본원에 개시되는 경우, 이들은 또한 이러한 요소의 순서의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 이에 대한 하나의 이유는, 본원에 개시된 많은 구현예에서, 일방향 구조체는 단일 가닥 재조합 AAV 벡터의 일부라는 것이다. 단일 가닥 AAV 게놈은 센스(플러스-가닥) 또는 안티-센스(마이너스-가닥 게놈)로 포장되고, + 및 - 극성의 단일 가닥 AAV 게놈은 동일한 빈도로 성숙 rAAV 비리온으로 포장된다. 예를 들어, 문헌[LING et al. (2015)

J. Mol. Genet. Med. 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499, and Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0307] 일방향 구조체에서, FIX 코딩 서열은 추가 변형 없이 야생형 FIX 코딩 서열일 수 있다. 일방향 구조체에서, FIX 코딩 서열은 숙주 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 코돈 최적화될 수 있거나, FIX의 하나 이상의 아미노산에 대한 하나 이상의 대체 코돈(즉, 동일한 아미노산 서열)을 사용할 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같은 대체 코돈은 주어진 아미노산에 대한 코돈 사용빈도의 변화를 지칭하고, 주어진 발현 시스템에 대해 바람직하거나 최적화된 코돈(코돈 최적화됨)일 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 주어진 발현 시스템에서 바람직한 코돈 사용빈도, 또는 널리 용인된 코돈이 공지되어 있다.

[0308] 본원에 개시된 일방향 구조체는 임의의 특정 용도에 대해 필요에 따라 그리고/또는 하나 이상의 원하는 기능을 부여하는 임의의 적합한 구조적 특징을 포함하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 일방향 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함할 필요가 없고/없거나, 예를 들어 상동성-독립적 공여체 구조체일 수 있다.

[0309] 일부 경우에, 일방향 핵산 구조체는 FIX의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않는다. 예를 들어, FIX의 발현은 숙주 세포의 프로모터(예를 들어, 이식유전자가 숙주 세포의 *ALB* 유전자좌에 통합될 때의 내인성 *ALB* 프로모터)에 의해 유도될 수 있다. 다른 경우에, 일방향 핵산 구조체는 FIX 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 프로모터를 포함할 수 있다. 즉, 발현에 필요하지 않지만, 본원에 개시된 구조체는 또한 프로모터, 인핸서, 절연체, 내부 리보솜 진입 부위, 펩티드를 암호화하는 추가 서열, 및/또는 폴리아데닐화 신호와 같은 전사 또는 번역 조절 서열을 포함할 수 있다. 일부 일방향 구조체는 FIX 코딩 서열의 발현을 유도하는 프로모터를 포함할 수 있다.

[0310] 일방향 구조체는 일부 경우에, 하나 이상의 폴리아데닐화 테일 서열 또는 폴리아데닐화 신호 서열을 포함할 수 있다. 일부 일방향 구조체는 FIX 코딩 서열의 3'에 위치한 폴리아데닐화 신호 서열을 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 폴리아데닐화 신호는 시미안 바이러스 40(SV40) 후기 폴리아데닐화 신호(또는 이의 변이체)이다. 또 다른 구체적인 예에서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬(BGH) 폴리아데닐화 신호(또는 이의 변이체)이다. 또 다른 구체적인 예에서, 폴리아데닐화 신호는 CpG-고갈된 BGH 폴리아데닐화 신호이다. 예를 들어, 폴리아데닐화 신호는 SV40 폴리아데닐화 신호 또는 CpG-고갈된 BGH 폴리아데닐화 신호일 수 있다. 구체적인 예에서, 폴리아데닐화 신호는 서열번호 199를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 또 다른 구체적인 예에서, 폴리아데닐화 신호는 서열번호 200을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0311] 적합한 폴리아데닐화 테일 서열을 설계하는 방법이 공지되어 있다. 예를 들어, 일부 일방향 구조체는 폴리아데닐화 테일 서열 및/또는 개방형 리딩 프레임의 폴리아데닐화 신호 서열 하류(즉, 폴리아데닐화 테일 서열 및/또는 코딩 서열의 폴리아데닐화 신호 서열 3')를 포함한다. 폴리아데닐화 테일 서열은, 예를 들어, 제1 및/또는 제2 세그먼트 내의 FIX 코딩 서열(또는 다른 단백질 코딩 서열)의 "폴리-A" 신전부 하류로서 인코딩될 수 있다. 폴리-A 테일은 예를 들어, 적어도 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 또는 100개 아데닌, 및 임의로 최대 300개의 아데닌을 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 폴리-A 테일은 95개, 96개, 97개, 98개, 99개, 또는 100개의 아데닌 뉴클레오티드를 포함한다. 적합한 폴리아데닐화 테일 서열 및/또는 폴리아데닐화 신호 서열을 설계하는 방법은 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 폴리아데닐화 신호 서열 AAUAAA는 포유류 시스템에서 일반적으로 사용되지만, UAUAAA 또는 AU/GUAAA와 같은 변이체가 확인되었다. 예를 들어, 문헌[Proudfoot (2011) *Genes & Dev.* 25(17):1770-82]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0312] 일방향 구조체는 일부 경우에, 하나 이상의 스플라이스 수용체 부위를 포함할 수 있다. 일부 일방향 구조체는 FIX 코딩 서열의 5'에 위치한 스플라이스 수용체 부위를 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 스플라이스 수용체는 마우스 *A1b* 엑손 2 스플라이스 수용체이다. 구체적인 예에서, 스플라이스 수용체는 서열번호 201을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0313] 스플라이스 수용체 부위는 예를 들어, NAG를 포함할 수 있거나 NAG로 이루어질 수 있다. 구체적인 예에서, 스플라이스 수용체는 *ALB* 스플라이스 수용체(예를 들어, *ALB*의 엑손 1 및 엑손 2를 함께 스플라이싱하는 데 사용되는 *ALB* 스플라이스 수용체(즉, *ALB* 엑손 2 스플라이스 수용체))이다. 예를 들어, 이러한 스플라이스 수용체는 인간 *ALB* 유전자로부터 유래될 수 있다. 또 다른 예에서, 스플라이스 수용체는 마우스 *A1b* 유전자(예를 들어, 마우스 *ALB*의 엑손 1 및 엑손 2를 함께 스플라이싱하는 데 사용되는 *A1b* 스플라이스 수용체(즉, 마우스 *A1b* 엑손 2 스플라이스 수용체))로부터 유래될 수 있다. 또 다른 예에서, 스플라이스 수용체는 *F9* 스플라이스 수용

체(예를 들어, *F9*의 엑손 1 및 엑손 2를 함께 스플라이싱하는 데 사용되는 *F9* 스플라이스 수용체)이다. 예를 들어, 이러한 스플라이스 수용체는 인간 *F9* 유전자로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 이러한 스플라이스 수용체는 마우스 *F9* 유전자로부터 유래될 수 있다. 인공 스플라이스 수용체를 포함하는, 진핵생물에 유용한 추가적인 적합한 스플라이스 수용체 부위는 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Shapiro et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:7155-7174 and Burset et al. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29:255-259]을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0314] 일방향 구조체는 원형 또는 선형일 수 있다. 예를 들어, 일방향 구조체는 선형일 수 있다.

[0315] 본원에 개시된 일방향 구조체는 DNA 또는 RNA, 단일 가닥, 이중 가닥, 또는 부분적으로 단일 가닥 및 부분적으로 이중 가닥일 수 있다. 예를 들어, 구조체는 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA일 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산은 본원에 기재된 바와 같이 변형될 수 있다(예를 들어, 뉴클레오시드 유사체를 사용함). 구체적인 예에서, 일방향 구조체는 단일 가닥(예를 들어, 단일 가닥 DNA)이다.

[0316] 본원에 개시된 일방향 구조체는 필요에 따라 그리고/또는 하나 이상의 기능적 이점을 부여하기 위해 하나 이상의 적합한 구조적 특징을 포함하도록 어느 하나 또는 양쪽 말단에서 변형될 수 있다. 예를 들어, 구조적 변형은 본원에 개시된 구조체를 숙주 세포에 전달하는 데 사용되는 방법(들)(예를 들어, 전달을 위해 지질 나노입자 내로의 바이러스 벡터 전달 또는 포장의 사용)에 따라 달라질 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 역위 말단 반복(ITR), 헤어핀, 루프, 및 환상체(toroid)와 같은 다른 구조와 같은 말단 구조체를 포함한다. 예를 들어, 본원에 개시된 구조체는 1개, 2개, 또는 3개의 ITR을 포함할 수 있거나 2개 이하의 ITR을 포함할 수 있다. 구조적 변형의 다양한 방법이 공지되어 있다.

[0317] 유사하게, 구조체의 하나 또는 양쪽 말단은 공지된 방법에 의해(예를 들어, 엑소뉴클레오용해성 분해로부터) 보호될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 디데옥시뉴클레오티드 잔기는 선형 분자의 3' 말단에 첨가될 수 있고/있거나 자기-상보적 올리고뉴클레오티드가 하나 이상의 말단에 결찰될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Chang et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4959-4963 and Nehls et al. (1996) *Science* 272:886-889]을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 분해로부터 구조체를 보호하는 추가 방법은 말단 아미노기(들)의 첨가 및 예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 및 O-메틸 리보스 또는 데옥시리보스 잔기와 같이 변형된 뉴클레오티드간 연결부의 사용을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다.

[0318] 본원에 더 상세히 개시된 바와 같이, 본원에 개시된 일방향 구조체는 예를 들어, 복제 기점, 프로모터, 및 항생제 내성을 인코딩하는 유전자와 같은 추가 서열을 갖는 벡터의 일부로서 세포에 도입될 수 있다. 구조체는 나상 핵산으로서 도입될 수 있거나, 리포솜, 중합체, 또는 폴록사머와 같은 작용제와 복합체화된 핵산으로서 도입될 수 있거나, 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, AAV, 헤르페스바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스)에 의해 전달될 수 있다.

[0319] 본원에 개시된 일방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 코돈 최적화(예를 들어, 인간 코돈), CpG 디뉴클레오티드의 고갈, 잠적 스플라이스 부위의 돌연변이, 하나 이상의 글리코실화 부위의 첨가, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 구조체의 CpG 디뉴클레오티드는 구조체의 치료 유용성을 제한할 수 있다. 먼저, 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오티드는 숙주 톨(toll)-유사 수용체-9(TLR-9)와 상호작용하여 선천성, 전염증성 면역 반응을 자극할 수 있다. 둘째, 일단 CpG 디뉴클레오티드가 메틸화되면, 이들은 메틸-CpG 결합 단백질에 의해 배위된 이식유전자 발현의 억제를 초래할 수 있다. 잠적 스플라이스 부위는 보통 스플라이스 부위로서 사용되지 않지만, 예를 들어 표준 스플라이스 부위를 비활성화하거나 스플라이스 부위를 생성하는 돌연변이에 의해 활성화될 수 있는 사전-메신저 RNA에서의 서열이다. 정확한 스플라이스 부위 선택은 성공적인 유전자 발현에 중요하고, 잠적 스플라이스 부위의 제거는 정상 또는 의도된 스플라이스 부위의 사용에 유리할 수 있다.

[0320] 일례에서, 본원에 개시된 일방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 잠적 스플라이스 부위를 갖는다. 또 다른 예에서, 본원에 개시된 일방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 모든 식별된 잠적 스플라이스 부위가 돌연변이되거나 제거된다. 또 다른 예에서, 본원에 개시된 일방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는다(즉, CpG 고갈됨). 또 다른 예에서, 본원에 개시된 일방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거된다. 또 다른 예에서, 본원에 개시된 일방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 모든 CpG 디뉴클레오티드를 갖는다(즉, 완전히 CpG 고갈됨). 또 다른 예에서, 본원에 개시된 일방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서의 발현을 위해 코돈 최적화됨). 구체적인 예에서, 본원에 개시된 일방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, CpG 고갈됨), 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 잠적 스

플라이스 부위를 갖는다. 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 일방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되고, 돌연변이되거나 제거된 하나 이상의 또는 모든 식별된 잠적 스플라이스 부위를 갖는다. 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 일방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, CpG 고갈됨), 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨). 또 다른 구체적인 예에서, 본원에 개시된 일방향 구조체에서 FIX 코딩 서열은 제거된 모든 CpG 디뉴클레오티드를 갖고(즉, 완전히 CpG 고갈됨), 코돈 최적화된다(예를 들어, 인간 또는 포유류에서 발현을 위해 코돈 최적화됨).

[0321] 예시적인 일방향 구조체에서, 구조체는 FIX 코딩 서열의 3'에 위치한 폴리아데닐화 신호 서열을 포함하고, 구조체는 FIX 코딩 서열의 5'에 위치한 스플라이스 수용체 부위를 포함하고, 핵산 구조체는 FIX 단백질의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하지 않고, 임의로 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다.

[0322] 일방향 구조체의 일례에서, FIX 단백질 코딩 서열은 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화된다(예를 들어, CpG-고갈되고 코돈 최적화되거나 완전히 CpG-고갈되고 코돈 최적화됨). 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 임의의 하나에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 어느 하나에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 162 내지 서열번호 171 중 어느 하나에 기재된 서열로 이루어진다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0323] 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 임의의 하나와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 임의의 하나에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 어느 하나에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 164 내지 서열번호 171 중 어느 하나에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열은 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은

서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0324] 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166 또는 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166 또는 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166 또는 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 166 또는 서열번호 165에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 166 또는 서열번호 165에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 166 또는 서열번호 165에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열은 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0325] 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 166과 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 166에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 166에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 166에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열은 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도

93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0326] 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 165와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 165에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 165에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 165에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열은 예를 들어 CpG-고갈되고/되거나(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 완전히 CpG-고갈됨) 코돈 최적화될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0327] 다양한 최적화된 자연 FIX 코딩 서열이 또한 제공된다. 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 임의의 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 임의의 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예

에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 임의의 하나와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 임의의 하나에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 어느 하나에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 159 내지 서열번호 161 중 어느 하나에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0328] 일례에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은(서열을 포함할 수 있거나) 서열번호 159와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하고, 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열은 서열번호 159에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진다. 또 다른 예에서, FIX 코딩 서열 중 하나는 서열번호 159에 기재된 서열로 이루어진다. FIX 코딩 서열은 예를 들어, CpG-고갈될 수 있고/있거나(예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, FIX 코딩 서열은 CpG 고갈되고(예를 들어, 예를 들어, 하나의 CpG 디뉴클레오티드를 제외하고 모두 제거되거나 완전히 CpG-고갈됨) 하나 이상의 잠적 스플라이스 공여체 서열(예를 들어, 모든 식별된 잠적 스플라이스 공여체 서열)을 돌연변이시키도록 변형될 수 있다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을

포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195와 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한(그리고 예를 들어, 자연 FIX의 활성을 유지하는) FIX 단백질(또는 서열을 포함하는 FIX 단백질)을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열을 포함하는 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 본질적으로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다. 임의로, 상기 실시예에서 FIX 코딩 서열은 서열번호 195에 기재된 서열로 이루어진 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0329] ***(4) 벡터***

[0330] 본원에 개시된 *F9* 핵산 구조체는 발현을 위해 또는 표적 게놈 유전자좌로부터의 통합 및 발현을 위해 벡터 내에 제공될 수 있다. 벡터는 예를 들어, 복제 원점, 프로모터, 및 항생제 내성을 인코딩하는 유전자와 같은 추가 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 본원의 다른 곳에 개시된 바와 같은 뉴클레아제 작용제 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 벡터는 *F9* 핵산 구조체, CRISPR/Cas 시스템(Cas 단백질 및 gRNA를 인코딩하는 핵산), CRISPR/Cas 시스템의 하나 이상의 성분, 또는 이들의 조합(예를 들어, *F9* 핵산 구조체 및 gRNA)을 포함할 수 있다. 일부 경우에, *F9* 핵산 구조체를 포함하는 벡터는 본원에 기재된 뉴클레아제 작용제의 어떠한 성분도 포함하지 않는다(예를 들어, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하지 않고, gRNA를 인코딩하는 핵산을 포함하지 않음). 일부 이러한 벡터는 표적 게놈 유전자좌 내 표적 부위에 상응하는 상동성 아암을 포함한다. 다른 이러한 벡터는 임의의 상동성 아암을 포함하지 않는다.

[0331] 일부 벡터는 원형일 수 있다. 대안적으로, 벡터는 선형일 수 있다. 벡터는 지질 나노입자, 리포솜, 비지질 나노입자, 또는 바이러스 캡시드를 통해 전달되기 위해 포장될 수 있다. 비제한적인 예시적 벡터는 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 인공 염색체, 미니염색체, 트랜스포존, 바이러스 벡터, 및 발현 벡터를 포함한다.

[0332] 벡터는 예를 들어, 바이러스 벡터, 예컨대 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터일 수 있다. AAV는 임의의 적합한 혈청형일 수 있고, 단일-가닥 AAV(ssAAV) 또는 자기-상보적 AAV(scAAV)일 수 있다. 다른 예시적인 바이러스/바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 폭스바이러스, 및 단순 포진 바이러스를 포함한다. 바이러스는 분열 세포, 비-분열 세포, 또는 분열 세포와 비-분열 세포 둘 다 감염시킬 수 있다. 바이러스는 숙주 게놈 내로 통합할 수 있거나 대안적으로는 숙주 게놈 내로 통합하지 않는다. 이러한 바이러스는 또한, 감소된 면역력을 갖도록 조작될 수 있다. 바이러스는 복제-가능(competent)일 수 있거나 복제-결함(defective)(예를 들어, 추가 라운드의 비리온 복제 및/또는 포장에 필요한 하나 이상의 유전자가 결함됨)일 수 있다. 바이러스는 일시적 발현, 장기-지속적 발현(예를 들어, 적어도 1주, 2주, 1개월, 2개월, 또는 3개월), 또는 영구적 발현을 야기할 수 있다. 바이러스 벡터는 그의 야생형 대응물로부터 유전자 변형될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 클로닝을 용이하게 하거나 벡터의 하나 이상의 특성이 변경되도록 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 이러한 특성은 포장 수용력, 형질도입 효율, 면역원성, 게놈 통합, 복제, 전사 및 번역을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 바이러스가 더 큰 크기를 갖는 외인성 서열을 포장할 수 있도록 바이러스 게놈의 일부가 결실될 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 벡터는 향상된 형질도입 효율을 가질 수 있다. 일부 예에서, 숙주에서 바이러스에 의해 유도된 면역 반응이 감소될 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 서열의 숙주 게놈으로의 통합을 촉진하는 바이러스 유전자(예컨대 인테그라제)는 바이러스가 비통합되도록 돌연변이될 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 벡터는 복제 결함일 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 벡터는 벡터 상의 코딩 서열의 발현을 유도하기 위해 외인성 전사 또는 번역 제어 서열을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 바이러스는 헬퍼-의존적일 수 있다. 예를 들어, 바이러스는 벡터를 바이러스 입자 내로 증폭 및 포장하는 데 필요한 바이러스 성분(예컨대 바이러스 단백질)을 공급하기 위해 하나 이상의 헬퍼 바이러스를 필요로 할 수 있다. 이러한 경우에, 바이러스 성분을 인코딩하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 하나 이상의 헬퍼 성분이 본원에 기재된 벡터 시스템과 함께 숙주 세포 또는 숙주 세포의 집단에 도입될 수 있다. 다른 예에서, 바이러스는 헬퍼-무함유일 수 있다. 예를 들어, 바이러스는 헬퍼 바이러스 없이 벡터를 증폭 및 포장할 수 있다. 일부 예에서, 본원에 기재된 벡터 시스템은 또한 바이러스 증폭 및 포장에 필요한 바이러스 성분을 인코딩할 수 있다.

[0333] 예시적인 바이러스 역가(예를 들어, AAV 역가)는 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15}, 및 10^{16}벡터 게놈/mL를 포함한다. 예시적인 바이러스 역가(예를 들어, AAV 역가)는 약 10^{12}, 약 10^{13}, 약 10^{14}, 약 10^{15}, 및 약 10^{16}벡터 게놈(vg)/mL, 또는 약 10^{12} 내지 약 10^{16}, 약 10^{12} 내지 약 10^{15}, 약 10^{12} 내지 약 10^{14}, 약 10^{12} 내지 약 10^{13}, 약 10^{13} 내지 약

10^{16}, 약 10^{14} 내지 약 10^{16}, 약 10^{15} 내지 약 10^{16}, 또는 약 10^{13} 내지 약 10^{15}vg/mL을 포함한다. 다른 예시적인 바이러스 역가(예를 들어, AAV 역가)는 약 10^{12}, 약 10^{13}, 약 10^{14}, 약 10^{15}, 및 약 10^{16}벡터 게놈(vg)/kg 체중, 또는 약 10^{12} 내지 약 10^{16}, 약 10^{12} 내지 약 10^{15}, 약 10^{12} 내지 약 10^{14}, 약 10^{12} 내지 약 10^{13}, 약 10^{13} 내지 약 10^{16}, 약 10^{14} 내지 약 10^{16}, 약 10^{15} 내지 약 10^{16}, 또는 약 10^{13} 내지 약 10^{15}vg/kg 체중을 포함한다. 일례에서, 바이러스 역가는 약 10^{13} 내지 약 10^{14}vg/mL 또는 vg/kg이다. 또 다른 예에서, 바이러스 역가는 약 10^{12} 내지 약 10^{13}vg/mL 또는 vg/kg(예를 들어, 약 10^{12} 내지 약 10^{13}vg/kg)이다. 또 다른 예에서, 바이러스 역가는 약 10^{12} 내지 약 10^{14}vg/mL 또는 vg/kg(예를 들어, 약 10^{12} 내지 약 10^{14}vg/kg)이다. 예를 들어, 바이러스 역가는 약 1.5E12 내지 약 1.5E13vg/kg일 수 있거나, 약 1.5E12vg/kg일 수 있거나, 약 1.5E13vg/kg일 수 있다. 또 다른 예에서, 바이러스 역가는 약 2E13vg/mL 또는 vg/kg이다.

[0334] 아데노-관련 바이러스(AAV)는 인간 및 비-인간 영장류(NHP)를 포함하는 다수의 종에서 토착화된다. 현재까지 적어도 12개의 자연 혈청형 및 수백 개의 자연 변이체가 단리되고 특성화되었다. 예를 들어, 문헌[Li et al. (2020) *Nat. Rev. Genet.* 21:255-272]를 참조하며, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. AAV 입자는 단일 가닥 DNA(ssDNA) 게놈을 함유하는 비-외피 이십면체 단백질 캡시드로 자연적으로 구성된다. DNA 게놈은 복제 및 포장 신호의 바이러스 기점으로서 역할을 하는 2개의 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹된다. *rep* 유전자는 바이러스 복제 및 포장에 필요한 4개의 단백질을 인코딩하는 반면, *cap* 유전자는 AAV 혈청형을 지시하는 3개의 구조적 캡시드 서브유닛, 및 일부 혈청형에서 비리온 조립을 촉진하는 조립 활성화 단백질(AAP: Assembly Activating Protein)을 인코딩한다.

[0335] 재조합 AAV(rAAV)는 치료적 이식유전자를 생체내 표적 세포에 전달함으로써 인간 질환을 치료하기 위해 유전자 요법에 사용되는 현재 가장 일반적으로 사용되는 바이러스 벡터 중 하나이다. 실제로, rAAV 벡터는 자연 AAV와 유사한 이십면체 캡시드로 구성되지만, rAAV 비리온은 AAV 단백질-코딩 또는 AAV 복제 서열을 캡슐화하지 않는다. 이러한 바이러스 벡터는 비복제이다. rAAV 벡터에 필요한 유일한 바이러스 서열은 rAAV 벡터의 제조 동안 게놈 복제 및 포장을 안내하는 데 필요한 2개의 ITR이다. rAAV 게놈은 AAV *rep* 및 *cap* 유전자가 없어서, 이들을 생체내 비복제하는 것이 렌더링된다. rAAV 벡터는 AAV ITR에 의해 플랭킹된 이식유전자 카세트와 조합하여, 트랜스 내 추가적인 바이러스 헬퍼 단백질과 함께 *rep* 및 *cap* 유전자를 발현함으로써 생성된다.

[0336] 치료적 rAAV 게놈에서, 유전자 발현 카세트는 ITR 서열 사이에 배치된다. 전형적으로, rAAV 게놈 카세트는 치료적 이식유전자의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하고, 이어서 폴리아데닐화 서열을 포함한다. rAAV 발현 카세트에 플랭킹하는 ITR은 보통 AAV2로부터 유래되며, 제1 혈청형은 단리되고 재조합 바이러스 벡터로 전환된다. 이후, 대부분의 rAAV 생성 방법은 AAV2 *Rep*-기반 포장 시스템에 의존한다. 예를 들어, 문헌[Colella et al. (2017) *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 8:87-104]을 참조하고, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0337] 사용될 수 있는 ITR의 일부 비제한적인 예는 서열번호 196, 서열번호 197, 또는 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 ITR을 포함한다. ITR의 다른 예는 서열번호 196, 서열번호 197, 또는 서열번호 198에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하고, 서열번호 196, 서열번호 197, 또는 서열번호 198과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일할 수 있다. 본원에 개시된 일부 rAAV 게놈에서, *F9* 핵산 구조체는 동일한 ITR(즉, 5' 단부 상 ITR, 및 3' 단부 상 ITR의 역보체)에 의해 양면 상에 플랭킹된다. 일례에서, 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어질 수 있거나, 이로 이루어질 수 있다. 또 다른 예에서, 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 197을 포함할 수 있거나, 이로 본질적으로 이루어질 수 있거나, 이로 이루어질 수 있다. 일례에서, 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 5' 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 3' 단부 상의 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어질 수 있거나, 이로 이루어질 수 있다. 일례에서, 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 5' 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 3' 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어질 수 있거나, 이로 이루어질 수 있다. 본원에 개시된 다른 rAAV 게놈에서, *F9* 핵산 구조

체는 각각의 단부 상 상이한 ITR에 의해 플랭킹된다. 일례에서, 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 다른 단부 상 ITR은 서열번호 197을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 또 다른 예에서, 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 다른 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 197을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 다른 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

[0338] 재조합 AAV 벡터의 특정 혈청형은 특정 조직에 대한 이의 생체내 향성에 영향을 미친다. AAV 캡시드 단백질은 표적 세포 내로의 부착 및 진입을 매개하고, 이어서 엔도솜 탈출 및 핵으로의 트래피킹(trafficking)을 담당한다. 따라서, rAAV 벡터가 발생할 때 혈청형의 선택은 벡터가 생체내 주입될 때 어떤 세포 유형 및 조직에 결합하고 형질도입될 가능성이 가장 높은지에 영향을 미칠 것이다. rAAV8을 포함하는 rAAV의 몇몇 혈청형은 마우스, NHP 및 인간에서 전신적으로 전달될 때 간을 형질도입할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Li et al. (2020) *Nat. Rev. Genet.* 21:255-272]를 참조하며, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0339] 일단 핵 내에서, ssDNA 게놈은 비리온으로부터 방출되고, 상보적 DNA 가닥은 이중 가닥 DNA(dsDNA) 분자를 생성하도록 합성된다. 이중 가닥 AAV 게놈은 이들의 ITR을 통해 자연적으로 원형화되고, 핵에서 염색체외 지속될 에피솜이 된다. 따라서, 에피솜 유전자 요법 프로그램의 경우, rAAV-전달 rAAV 에피솜은 분할되지 않은 세포에서 장기간 프로모터-유도 유전자 발현을 제공한다. 그러나, 이러한 rAAV-전달 에피솜 DNA는 세포 분할로서 희석된다. 대조적으로, 본원에 기재된 유전자 요법은 장기간 유전자 발현을 허용하기 위한 유전자 삽입에 기초한다.

[0340] 특정 서열을 포함하는 특정 rAAV(예를 들어, 특정 양방향 구조체 서열 또는 특정 일방향 구조체 서열)가 본원에 개시되는 경우, 이들은 개시된 서열 또는 서열의 역방향 보체를 포괄하도록 의도된다. 예를 들어, 본원에 개시된 양방향 또는 일방향 구조체가 가상 서열 5'-CTGGACCGA-3'로 이루어지는 경우, 이는 또한 그 서열(5'-TCGGTCCAG-3')의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 마찬가지로, 특정 5'에서 3' 순서로 양방향 또는 일방향 구조체 요소를 포함하는 rAAV가 본원에 개시되는 경우, 이들은 또한 이러한 요소의 순서의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 예를 들어, 5'부터 3'까지 제1 스플라이스 수용체, 제1 코딩 서열, 제1 종결자, 제2 종결자의 역보체, 제2 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하는 양방향 구조체를 포함하는 rAAV가 본원에 개시되는 경우, 이는 또한 5'부터 3'까지 제2 스플라이스 수용체, 제2 코딩 서열, 제2 종결자, 제1 종결자의 역보체, 제1 코딩 서열의 역보체, 및 제1 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하는 구조체를 포괄하도록 의도된다. 단일 가닥 AAV 게놈은 센스(플러스-가닥) 또는 안티-센스(마이너스-가닥 게놈)로 포장되고, + 및 - 극성의 단일 가닥 AAV 게놈은 동일한 빈도로 성숙 rAAV 비리온으로 포장된다. 예를 들어, 문헌[LING et al. (2015) *J. Mol. Genet. Med.* 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499, and Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0341] ssDNA AAV 게놈은 상보적 DNA 가닥의 합성을 가능하게 하는 2개의 역위 말단 반복에 의해 플랭킹되는 2개의 개방형 리딩 프레임인 Rep 및 Cap으로 이루어진다. AAV 전달 플라스미드를 구축할 때, 이식유전자는 2개의 ITR 사이에 놓이고, Rep 및 Cap는 인트랜스(in trans)로 공급될 수 있다. Rep 및 Cap 외에도, AAV는 아데노바이러스로부터의 유전자를 함유하는 헬퍼 플라스미드를 필요로 할 수 있다. 이들 유전자(E4, E2a, 및 VA)는 AAV 복제를 매개한다. 예를 들어, 전달 플라스미드인 Rep/Cap 및 헬퍼 플라스미드는 아데노바이러스 유전자 E1+를 함유하는 HEK293 세포 내로 형질주입되어, 감염성 AAV 입자를 생성할 수 있다. 대안적으로, Rep, Cap, 및 아데노바이러스 헬퍼 유전자는 단일 플라스미드 내로 조합될 수 있다. 유사한 포장 세포 및 방법이 다른 바이러스, 예컨대 레트로바이러스에 사용될 수 있다.

[0342] AAV의 다수의 혈청형이 식별되었다. 이들 혈청형은, 이들이 감염시키는 세포의 유형이 상이하여(즉, 이의 향성), 특정 세포 유형의 선호적인 형질도입을 가능하게 한다. 용어 AAV는 예를 들어, 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, 및 이들의 하이브리드, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비영장류 AAV, 및 양 AAV를 포함한다. AAV의 다양한 혈청형의 게놈 서열뿐만 아니라 자연 말단 반복(TR), Rep 단백질, 및 캡시드 서브유닛의 서열은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 서열은 문헌 또는 GenBank와 같은 공개 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이 "AAV 벡터"는 전형적으로 관심 이종성 폴리펩티드를 인코딩하는 서열을 포함하는, AAV 기원이 아닌 이종성 서열(즉, AAV에 대한 이종성 핵산 서열)을 포함하는 AAV 벡터를 지칭한다. 구조체는AAV1, 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, 및 이들의 하이브리드, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비영장류 AAV, 및 양 AAV 캡시드 서열을 포함한다. 일반적으로, 이종성 핵산 서열(이식유전자)은 적어도 하나에 의해, 그리고 일반적으로 2개의 AAV 역위 말단 반복 서열(ITR)에 의해 플랭킹된다. AAV 벡터는 단일 가닥(ssAAV) 또는 자기-상보적(scAAV)일 수 있다. 간 조직을 위한 혈청형의 예에는 AAV3B, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.74, 및 AAVhu.37, 및 특히 AAV8이 포함된다. 구체적인 예에서, 핵산 구조체를 포함하는 AAV 벡터는 재조합 AAV8(rAAV8)일 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 rAAV8 벡터는 캡시드가 AAV8 유래인 것이다. 예를 들어, AAV2로부터의 ITR을 사용하는 AAV 벡터 및 AAV8의 캡시드는 본원에서 rAAV8 벡터인 것으로 간주된다.

[0343] 향성은 위형화(pseudotyping)을 통해 추가로 정제(refined)될 수 있으며, 이는 상이한 바이러스 혈청형으로부터의 캡시드 및 게놈의 혼합이다. 예를 들어 AAV2/5는 혈청형 5로부터의 캡시드에 포장된 혈청형 2의 게놈을 함유하는 바이러스를 나타낸다. 위형화된 바이러스의 사용은 형질도입 효율을 향상시킬 뿐만 아니라, 향성을 변경시킬 수 있다. 상이한 혈청형으로부터 유래된 하이브리드 캡시드가 또한, 바이러스 향성을 변경시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, AAV-DJ는 8개의 혈청형으로부터의 하이브리드 캡시드를 함유하고, 생체내에서 광범위한 세포 유형에 걸쳐 높은 감염성을 나타낸다. AAV-DJ8은 AAV-DJ의 특성을 나타내지만 증강된 뇌 흡수(uptake)를 갖는 또 다른 예이다. AAV 혈청형은 또한, 돌연변이를 통해 변형될 수 있다. AAV2의 돌연변이적 변형의 예는 Y444F, Y500F, Y730F, 및 S662V를 포함한다. AAV3의 돌연변이적 변형의 예는 Y705F, Y731F, 및 T492V를 포함한다. AAV6의 돌연변이적 변형의 예는 S663V 및 T492V를 포함한다. 다른 위형화된/변형된 AAV 변이체는 AAV2/1, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/8, AAV2/9, AAV2.5, AAV8.2, 및 AAV/SASTG를 포함한다.

[0344] 이식유전자 발현을 가속화하기 위해, 자기-상보적 AAV(scAAV) 변이체가 사용될 수 있다. AAV는 AAV의 단일-가닥 DNA 게놈의 상보적 가닥을 합성하기 위해 세포의 DNA 복제 머시너리에 의존하기 때문에, 이식유전자 발현이 지연될 수 있다. 이러한 지연을 해결하기 위해, 감염 시 자발적으로 어닐링할 수 있는 상보적 서열을 함유하는 scAAV가 사용되어, 숙주 세포 DNA 합성을 위한 요건을 배제할 수 있다. 그러나, 단일 가닥 AAV(ssAAV) 벡터가 또한 사용될 수 있다.

[0345] 포장 수용력을 증가시키기 위해, 더 긴 이식유전자는 2개의 AAV 전달 플라스미드 사이에서 분할될 수 있으며, 제1 AAV는 3' 스플라이스 공여체이고 제2 AAV는 5' 스플라이스 수용체이다. 세포의 공동-감염 시, 이들 바이러스는 콘카티머(concatemer)를 형성하며, 함께 스플라이싱되고, 전장 이식유전자가 발현될 수 있다. 이는 더 장기적인 이식유전자 발현을 가능하게 하지만, 발현은 덜 효율적이다. 수용력을 증가시키기 위한 유사한 방법은 상동성 재조합을 이용한다. 예를 들어, 이식유전자는, 공동-발현이 전장 이식유전자의 상동성 재조합 및 발현을 유도하도록 2개의 전달 플라스미드 사이에서 그러나 실질적인 서열 중첩을 갖고 나눠질 수 있다.

[0346] 벡터(예를 들어, 재조합 AAV8과 같은 AAV)는 pH 7.3에서, 예를 들어, 10mM의 인산나트륨, 180mM의 염화나트륨, 및 0.005%의 폴록사머 188 중 제형화될 수 있다.

[0347] **B. 뉴클레아제 작용제 및 CRISPR/Cas 시스템**

[0348] 본원에 개시된 방법 및 조성물은 본원에 개시된 바와 같은 *F9* 핵산 구조체의 삽입을 위한 안전 항만 유전자(예를 들어, *ALB*)와 같은 표적 게놈 유전자좌를 변형시키기 위해, Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats(CRISPR)/CRISPR-관련(Cas) 시스템, 아연 집게 뉴클레아제(ZFN) 시스템, 또는 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 시스템과 같은 뉴클레아제 작용제 또는 이러한 시스템의 구성요소를 이용할 수 있다. 일반적으로, 뉴클레아제 작용제는 뉴클레아제 표적 부위에서 이중 가닥 절단 또는 닉(즉, 단일 가닥 절단)을 유도하기 위해 조작된 절단 시스템의 사용을 수반한다. 절단 또는 닉킹은 뉴클레아제 표적 부위의 특정 절단 또는 닉킹을 안내하기 위해 조작된 가이드 RNA를 갖는 조작된 ZFN, TALEN, 또는 CRISPR/Cas 시스템과 같은 특정 뉴클레아제의 사용을 통해 일어날 수 있다. 원하는 표적 서열에서 닉 또는 이중 가닥 절단부를 유도하는 임의의 뉴클레아제 작용제는 본원에 개시된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 뉴클레아제 작용제는 숙주 게놈 내의 원하는 유전자좌(표적 유전자)에서 삽입 부위를 생성하는 데 사용될 수 있으며, 이 부위에 *F9* 핵산 구축물을 삽입하여 FIX를 발현한다. FIX는, FIX가 정상적으로 발현되지 않는 안전 항만 유전자좌와 같은, 그의 삽입 부위 또는 유전자좌(표적 유전자)에 대해 이종성일 수 있다. 대안적으로, FIX는 결함 *F9* 유전자를 바로잡기 위한 내인성 *F9* 유전자좌 내로의 삽입과 같은 그의 삽입 부위에 대해 비-이종성일 수 있다.

[0349] 일례에서, 뉴클레아제 작용제는 CRISPR/Cas 시스템이다. 또 다른 예에서, 뉴클레아제 작용제는 하나 이상의 ZFN을 포함한다. 그와 또 다른 예에서, 뉴클레아제 작용제는 하나 이상의 TALEN을 포함한다. 구체적인 예에서, CRISPR/Cas 시스템 또는 이러한 시스템의 구성요소는 세포 내의 *ALB* 유전자 또는 유전자좌(예를 들어,

ALB 게놈 유전자좌), 또는 세포 내의 *ALB* 유전자 또는 유전자좌의 인트론 1을 표적화한다. 더 구체적인 예에서, CRISPR/Cas 시스템 또는 이러한 시스템의 구성요소는세포 내의 인간 *ALB* 유전자 또는 유전자좌, 또는 세포 내의 인간 *ALB* 유전자 또는 유전자좌의 인트론 1을 표적화한다.

[0350] CRISPR/Cas 시스템은 Cas 유전자의 발현에 관여하거나 이의 활성을 지시하는(directing) 전사물 및 다른 요소를 포함한다. CRISPR/Cas 시스템은 예를 들어, 유형 I, 유형 II, 유형 III 시스템, 또는 유형 V 시스템(예를 들어, 서브유형 V 내지 A 또는 서브유형 V 내지 B)일 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 조성물은 핵산의 부위-지시 결합 또는 절단을 위해 CRISPR 복합체(Cas 단백질과 복합체화된 가이드 RNA(gRNA)를 포함함)를 이용함으로써 CRISPR/Cas 시스템을 이용할 수 있다. *ALB* 유전자 또는 유전자좌를 표적화하는 CRISPR/Cas 시스템은 Cas 단백질(또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산) 및 하나 이상의 가이드 RNA(또는 하나 이상의 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA)를 포함하며, 각각의 하나 이상의 가이드 RNA는 표적 게놈 유전자좌에서 상이한 가이드 RNA 표적 서열을 표적화한다(예를 들어, *ALB* 유전자 또는 유전자좌).

[0351] 본원에 개시된 조성물 및 방법에 사용되는 CRISPR/Cas 시스템은 비-자연 발생일 수 있다. "비-자연적으로 발생하는" 시스템은 인위적인 관여를 나타내는 임의의 것, 예컨대 이의 자연적으로 발생하는 상태로부터 변경되거나 돌연변이화되거나, 이것이 자연상에서 자연적으로 관련된 적어도 하나의 다른 성분이 적어도 실질적으로 없거나, 이것이 자연적으로 관련이 있지 않는 적어도 하나의 다른 성분과 관련이 있는 시스템의 하나 이상의 성분을 포함한다. 예를 들어, 일부 CRISPR/Cas 시스템은, 자연적으로 함께 발생하지 않는 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 비-자연 발생 CRISPR 복합체를 이용하거나, 자연적으로 발생하지 않는 Cas 단백질을 이용하거나, 자연적으로 발생하지 않는 gRNA를 이용하지 않는다.

[0352] ***(1) 표적 게놈 유전자좌 및 알부민(ALB)***

[0353] 유전자를 발현할 수 있는 임의의 표적 게놈 유전자좌, 예컨대 안전 항만 유전자좌(안전 항만 유전자, 예컨대 *ALB*) 또는 내인성 *F9* 유전자좌가 사용될 수 있다. 핵산 구조체는 표적 게놈 유전자좌의 임의의 부분 내로 통합될 수 있다. 예를 들어, 핵산 구조체는 표적 게놈 유전자좌의 인트론 또는 엑손 내로 삽입될 수 있거나 표적 게놈 유전자좌의 하나 이상의 인트론 및/또는 엑손을 대체할 수 있다. 구체적인 예에서, 핵산 구조체는 표적 게놈 유전자좌의 인트론, 예컨대 표적 게놈 유전자좌의 제1 인트론(예를 들어, *ALB* 인트론 1) 내로 통합될 수 있다. 예를 들어, WO 2020/082042호, US 2020/0270617호, WO 2020/082041호, US 2020/0268906호, WO 2020/082046호, 및 US 2020/0289628호를 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 표적 게놈 유전자좌에 통합된 구조체는 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다(예를 들어, 내인성 *ALB* 프로모터).

[0354] 통합된 외인성 DNA와 숙주 게놈 사이의 상호작용은 통합의 신뢰성 및 안전성을 제한할 수 있고, 표적화된 유전적 변형으로 인한 것이 아니지만 대신에 주변 내인성 유전자 상 통합의 의도치 않은 효과로 인한 것인 명시적인 표현형 효과를 유발할 수 있다. 예를 들어, 무작위로 삽입된 이식유전자는 장소 효과 및 침묵화(silencing)를 받아서, 이의 발현을 신뢰 불가능하게 그리고 예측 불가능하게 만들 수 있다. 마찬가지로, 염색체 유전자좌 내로의 외인성 DNA의 통합은 주변 내인성 유전자 및 염색질에 영향을 미쳐서, 세포 거동 및 표현형을 변경시킬 수 있다. 안전 항만 유전자좌는 이식유전자 또는 다른 외인성 핵산 삽입물이 세포 거동 또는 표현형을 명시적으로 변경시키지 않으면서(즉, 숙주 세포 상의 임의의 유해 효과 없이) 모든 관심 조직에서 안정하게 그리고 신뢰할 만하게 발현될 수 있는 염색체 유전자좌를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Sadelain et al. (2012) *Nat. Rev. Cancer* 12:51-58]을 참조하며, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 예를 들어, 안전 항만 유전자좌는 삽입된 유전자 서열의 발현이 이웃 유전자로부터의 임의의 판독(read-through) 발현에 의해 동요되지(perturbed) 않는 것일 수 있다. 예를 들어, 안전 항만 유전자좌는 외인성 DNA가 내인성 유전자 구조 또는 발현에 유해한 영향을 미치지 않으면서 예측 가능한 방식으로 통합되고 작용할 수 있는 염색체 유전자좌를 포함할 수 있다. 안전 항만 유전자좌는 예를 들어, 비-본질적이거나, 불필요하거나 명시적인 표현형 결과 없이 교란될 수 있는 유전자 내의 유전자좌와 같이 유전자외(extragenic) 영역 또는 유전자내(intragenic) 영역을 포함할 수 있다.

[0355] 이러한 안전 항만 유전자좌는 모든 조직에서 개방형 염색질 배치를 제공할 수 있으며, 성체에서 배아 발달 동안 도처에서 발현될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Zambrowicz et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:3789-3794]을 참조하고, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 게다가, 안전 항만 유전자좌는 고효율로 표적화될 수 있으며, 안전 항만 유전자좌는 명시적인 표현형 없이 교란될 수 있다. 안전 항만 유전자좌의 예는 *ALB*, *CCR5*, *HPRT*, *AAVS1*, 및 *Rosa26*을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 제7,888,121호;

제7,972,8504호; 제7,914,796호; 제7,951,925호; 제8,110,379호; 제8,409,861호; 제8,586,526; 및 미국 특허 공개 제2003/0232410호; 제2005/0208489호; 제2005/0026157호; 제2006/0063231호; 제2008/0159996호; 제2010/00218264호; 제2012/0017290호; 제2011/0265198호; 제2013/0137104호; 제2013/0122591호; 제2013/0177983호; 제2013/0177960호; 및 제2013/0122591호를 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0356] 구체적인 예에서, 안전 항만 유전자좌는 게놈 내의 유전자좌이며, 여기서 유전자는 간세포와 같은 숙주 세포에 유의한 유해한 영향 없이(예를 들어, 아폽토시스, 괴사, 및/또는 노화를 야기하지 않고, 또는 대조군 세포와 비교하여 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 또는 40% 이상 아폽토시스, 괴사, 및/또는 노화를 야기하지 않으면서) 삽입될 수 있다. 안전 항만 유전자좌는 간세포와 같은 숙주 세포에 유의한 유해한 영향 없이(예를 들어, 아폽토시스, 괴사, 및/또는 노화를 야기하지 않고, 또는 대조군 세포와 비교하여 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 또는 40% 이상 아폽토시스, 괴사, 및/또는 노화를 야기하지 않으면서) 외인성 유전자의 과발현을 허용할 수 있다. 바람직한 안전 항만 유전자좌는 삽입된 유전자 서열의 발현이 이웃 유전자로부터의 판독 발현에 의해 동요되지 않는 것일 수 있다. 안전 항만은 인간 안전 항만(예를 들어, 간 조직 또는 간세포 숙주 세포에 대한)일 수 있다.

[0357] 구체적인 예에서, 표적 게놈 유전자좌는 *ALB* 유전자좌, 예컨대 *ALB* 유전자좌의 인트론 1이다. 보다 구체적인 예에서, 표적 게놈 유전자좌는 인간 *ALB* 유전자좌, 예컨대 인간 *ALB* 유전자좌의 인트론 1(예를 들어, 서열번호 4)이다.

[0358] ***(2) Cas 단백질***

[0359] Cas 단백질은 일반적으로 가이드 RNA와 상호작용할 수 있는 적어도 하나의 RNA 인식 또는 결합 도메인을 포함한다. Cas 단백질은 또한 뉴클레아제 도메인(예를 들어, DNase 도메인 또는 RNase 도메인), DNA-결합 도메인, 헬리카제 도메인, 단백질-단백질 상호작용 도메인, 이량체화 도메인, 및 다른 도메인을 포함할 수 있다. 일부 이러한 도메인(예를 들어, DNase 도메인)은 자연 Cas 단백질로부터의 것일 수 있다. 다른 이러한 도메인이 첨가되어, 변형된 Cas 단백질을 만들 수 있다. 뉴클레아제 도메인은 핵산 절단에 대해 촉매 활성을 소유하며, 이는 핵산 분자의 공유 결합의 절단을 포함한다. 절단은 평활 말단 또는 엇갈린 말단을 생성할 수 있으며, 이는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 예를 들어, 야생형 Cas9 단백질은 전형적으로, 평활 절단 생성물을 생성할 것이다. 대안적으로, 야생형 Cpf1 단백질(예를 들어, FnCpf1)은 5-뉴클레오티드 5' 오버행을 갖는 절단 생성물을 초래할 수 있으며, 절단은 비-표적화된 가닥 상의 PAM 서열로부터 18번째 염기쌍 다음에, 그리고 표적화된 가닥 상의 23번째 염기 다음에 발생한다. Cas 단백질은 표적 게놈 좌위에서 이중 가닥 절단부(예를 들어, 평활 말단을 갖는 이중 가닥 절단부)를 생성하기 위해 완전 절단 활성을 가질 수 있거나, Cas 단백질은 표적 게놈 좌위에서 단일 가닥 절단부를 생성하는 닉카제일 수 있다.

[0360] Cas 단백질의 예는 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e(CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9(Csn1 또는 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, 및 Cu1966, 및 이의 상동체 또는 변형된 버전을 포함한다.

[0361] 예시적인 Cas 단백질은 Cas9 단백질, 또는 Cas9 단백질로부터 유래된 단백질이다. Cas9 단백질은 II형 CRISPR/Cas 시스템으로부터의 것이며, 전형적으로 보존된 구조체를 갖는 4개의 주요 모티프를 공유한다. 모티프 1, 2, 및 4는 RuvC-유사 모티프이고, 모티프 3은 HNH 모티프이다. 예시적인 Cas9 단백질은 *스트렙토콕커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes)*, *스트렙토콕커스 써모필루스(Streptococcus thermophilus)*, *스트렙토콕커스 종(Streptococcus sp.)*, *스타필로콕커스 아우레우스(Staphylococcus aureus)*, *노카르디옵시스 다쏜빌레이(Nocardiopsis dassonvillei)*, *스트렙토마이세스 프리스티내스피랄리스(Streptomyces pristinaespiralis)*, *스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(Streptomyces viridochromogenes)*, *스트렙토마이세스 비리도크로모게네스*, *스트렙토스포란기움 로세움(Streptosporangium roseum)*, *스트렙토스포란기움 로세움*, *알리사이클로바실루스 악시도칼다리우스(Alicyclobacillus acidocaldarius)*, *바실루스 슈도마이코이데스(Bacillus pseudomycoides)*, *바실루스 셀레니티레두센스(Bacillus selenitireducens)*, *엑시구오박테리움 시비리쿰(Exiguobacterium sibiricum)*, *락토바실루스 델브루엑키이(Lactobacillus delbrueckii)*, *락토바실루스 살리바리우스(Lactobacillus salivarius)*, *미크로스실라 마리나(Microscilla marina)*, *부르콜데리알레스 박테리움(Burkholderiales bacterium)*, *폴라로모나스 나프탈레니보란스(Polaromonas naphthalenivorans)*, *폴라로모나스*

종(Polaromonas sp.), *크로코스패라 와트소니이(Crocosphaera watsonii)*, *시아노테세 종(Cyanothece sp.)*, *미크로사이스티스 애루기노사(Microcystis aeruginosa)*, *사이네코콕커스 종(Synechococcus sp.)*, *아세토할로비움 아라바티쿰(Acetohalobium arabaticum)*, *암모니펙스 데겐시이(Ammonifex degensii)*, *칼디셀룰로시룹토르 벡스치이(Caldicelulosiruptor becscii)*, *칸디다투스 데술포루디스(Candidatus Desulforudis)*, *클로스트리디움 보툴리눔(Clostridium botulinum)*, *클로스트리디움 디피실레(Clostridium difficile)*, *피네골디아 마그나(Finegoldia magna)*, *나트라내로비우스 써모필루스(Natranaerobius thermophilus)*, *펠로토마쿨룸 써모프로피오니쿰(Pelotomaculum thermopropionicum)*, *악시디티오바실루스 칼두스(Acidithiobacillus caldus)*, *악시디티오바실루스 페로옥시단스(Acidithiobacillus ferrooxidans)*, *알로크로마티움 비노숨(Allochromatium vinosum)*, *마리노박터 종(Marinobacter sp.)*, *니트로소콕커스 할로필루스(Nitrosococcus halophilus)*, *니트로소콕커스 와트소니(Nitrosococcus watsoni)*, *슈도알테로모나스 할로플란크티스(Pseudoalteromonas haloplanktis)*, *크테도노박터 라세미페르(Ktedonobacter racemifer)*, *메타노할로비움 에베스티가툼(Methanohalobium evestigatum)*, *아나배나 바리아빌리스(Anabaena variabilis)*, *노둘라리아 스푸미게나(Nodularia spumigena)*, *노스톡 종(Nostoc sp.)*, *아르쓰로스피라 막시마(Arthrospira maxima)*, *아르쓰로스피라 플라텐시스(Arthrospira platensis)*, *아르쓰로스피라 종(Arthrospira sp.)*, *라인그바이아 종(Lyngbya sp.)*, *미크로콜레우스 크쏘노플라스테스(Microcoleus chthonoplastes)*, *오스칠라토리아 종(Oscillatoria sp.)*, *페트로토가 모빌리스(Petrotoga mobilis)*, *써모시포 아프리카누스(Thermosipho africanus)*, *아카라이오클로리스 마리나(Acaryochloris marina)*, *네이쎄리아 메닌지티디스(Neisseria meningitidis)*,또는 *캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni)*로부터의 것이다. Cas9 패밀리 구성원의 추가 예는 WO 2014/131833호에 기재되어 있으며, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. *에스. 피오게네스(S. pyogenes)*로부터의 Cas9(SpCas9)(예를 들어, 지정된 UniProt 수탁번호 Q99ZW2)는 예시적인 Cas9 단백질이다. 예시적인 SpCas9 단백질 서열은 서열번호 8(서열번호 9로 기재된 DNA 서열에 의해 인코딩됨)로 기재된다. 예시적인 SpCas9 mRNA(cDNA) 서열은 서열번호 10으로 기재된다. 더 작은 Cas9 단백질(예를 들어, 가이드 RNA 코딩 서열 및 Cas9와 가이드 RNA에 대한 조절 요소와 조합될 때 코딩 서열이 최대 AAV 포장 수용력과 양립성인 Cas9 단백질, 예컨대 SaCas9 및 CjCas9와 Nme2Cas9)은 다른 예시적인 Cas9 단백질이다. 예를 들어, *에스. 아우레우스(S. aureus)*로부터의 Cas9(SaCas9)(예를 들어, 표기된 UniProt 수탁번호 J7RUA5)는 또 다른 예시적인 Cas9 단백질이다. 마찬가지로, *캄필로박터 제주니*로부터의Cas9(CjCas9)(예를 들어, 표기된 UniProt 수탁번호 Q0P897)는 또 다른 예시적인 Cas9 단백질이다. 예를 들어, 문헌[Kim et al. (2017) *Nat. Commun.* 8:14500]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. SaCas9는 SpCas9보다 더 작고, CjCas9는 SaCas9와 SpCas9 둘 다보다 작다. *네이쎄리아 메닌지티디스(Neisseria meningitidis)*로부터의 Cas9(Nme2Cas9)는 또 다른 예시적인 Cas9 단백질이다. 예를 들어, 문헌[Edraki et al. (2019) *Mol. Cell* 73(4):714-726]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. *스트렙토콕커스 써모필루스*로부터의Cas9 단백질(예를 들어, CRISPR1 유전자좌에 의해 인코딩되는 스트렙토콕커스 써모필루스 LMD-9 Cas9(St1Cas9) 또는 CRISPR3 유전자좌로부터의 *스트렙토콕커스 써모필루스* Cas9(St3Cas9))는 다른 예시적인 Cas9 단백질이다. *프란시셀라 노비시다(Francisella novicida)*로부터의Cas9(FnCas9), 또는 대안적인 PAM(E1369R/E1449H/R1556A 치환)을 인식하는 RHA *프란시셀라 노비시다* Cas9 변이체는 다른 예시적인 Cas9 단백질이다. 이들 및 다른 예시적인 Cas9 단백질은 예를 들어, 문헌[Cebrian-Serrano and Davies (2017) *Mamm. Genome* 28(7):247-261]에서 검토되어 있으며, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. Cas9 코딩 서열, Cas9 mRNA, 및 Cas9 단백질 서열은 WO 2013/176772호, WO 2014/065596호, WO 2016/106121호, WO 2019/067910호, WO 2020/082042호, US 2020/0270617호, WO 2020/082041호, US 2020/0268906호, WO 2020/082046호, 및 US 2020/0289628호에 제공되어 있으며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. ORF 및 Cas9 아미노산 서열의 구체적인 예는 WO 2019/067910호의 단락 [0449]의 표 30에 제공되고, Cas9 mRNA 및 ORF의 구체적인 예는 WO 2019/067910호의 단락 [0214]~[0234]에 제공된다. 또한 WO 2020/082046 A2호(pp. 84~85) 및 WO 2020/069296호를 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 예시적인 SpCas9 단백질 서열은 서열번호 11을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. SpCas9 단백질 서열을 인코딩하는 예시적인 SpCas9 mRNA 서열은 서열번호 12를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. SpCas9 단백질 서열을 인코딩하는 또 다른 예시적인 SpCas9 mRNA 서열은 서열번호 225를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. SpCas9 단백질 서열을 인코딩하는 또 다른 예시적인 SpCas9 mRNA 서열은 서열번호 226을 포함한다. 예시적인 SpCas9 코딩 서열은 서열번호 227을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0362] Cas 단백질의 또 다른 예는 Cpf1(*프레보텔라* 및 *프란시셀라* 1로부터의 CRISPR) 단백질이다. Cpf1은, Cas9의 특

징적인 아르기닌-풍부 군집(cluster)에 대한 대응물(counterpart)과 함께 Cas9의 상응하는 도메인에 상동성인 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인을 함유하는 큰 단백질(약 1300개 아미노산)이다. 그러나, Cpf1은, Cas9 단백질에 존재하는 HNH 뉴클레아제 도메인이 결여되어 있고, RuvC-유사 도메인은, HNH 도메인을 포함하는 긴 삽입물(insert)을 함유하는 Cas9와 대조적으로 Cpf1 서열에서 인접해 있다. 예를 들어, 문헌[Zetsche et al. (2015) *Cell* 163(3):759-771]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 예시적인 Cpf1 단백질은 *프란시셀라 툴라렌시스(Francisella tularensis) 1*, *프란시셀라 툴라렌시스 아종 노비시다(Francisella tularensis subsp. novicida)*, *프레보텔라 알벤시스(Prevotella albensis)*, *라흐노스피라세애 박테리움(라흐노스피라세애 박테리움(lachnospiraceae bacterium)) MC2017 1*, *부타이리비브리오 프로테오클라스티쿠스(Butyrivibrio proteoclasticus)*, *페레그리니박테리아 박테리움(Peregrinibacteria bacterium) GW2011_GWA2_33_10*, *파르쿠박테리아 박테리움(Parcubacteria bacterium) GW2011_GWC2_44_17*, *스미쎌라 종(Smithella sp.) SCADC*, *악시다미노콕커스 종(Acidaminococcus sp.) BV3L6*, *라흐노스피라세애 박테리움(lachnospiraceae bacterium) MA2020*, *칸디다투스 메타노플라스마 테르미툼(Candidatus Methanoplasma termitum)*, *유박테리움 엘리겐스(Eubacterium eligens)*, *모락셀라 보보쿨리(Moraxella bovoculi) 237*, *렙토스피라 이나다이(Leptospira inadai)*, *라흐노스피라세애 박테리움(Lachnospiraceae bacterium) ND2006*, *포르파이로모나스 크레비오리카니스(Porphyromonas crevioricanis) 3*, *프레보텔라 디시엔스(Prevotella disiens)*, 및 *포르파이로모나스 마카캐(porphyromonas macacae)*로부터의 것이다. *프란시셀라 노비시다* U112로부터의 Cpf1(FnCpf1; 표기된 UniProt 수탁번호 A0Q7Q2)은 예시적인 Cpf1 단백질이다.

[0363] Cas 단백질의 다른 예는 CasX(Cas12e)이다. CasX는 DNA에서 엇갈린 이중 가닥 절단부를 생성하는 RNA-안내된 DNA 엔도뉴클레아제이다. CasX는 1000개 미만의 아미노산 크기이다. 예시적인 CasX 단백질은 *델타프로테오박테리아*(DpbCasX 또는 DpbCas12e) 및*플란토미세테스*(PlmCasX 또는 PlmCas12e)로부터의 것이다. Cpf1과 마찬가지로, CasX는 DNA 절단을 위한 단일 RuvC 활성 부위를 사용한다. 예를 들어, 문헌[Liu et al. (2019) *Nature* 566(7743):218-223]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0364] Cas 단백질의 또 다른 예는 박테리오파지에서 고유하게 발견되는 CasΦ(CasPhi 또는 Cas12j)이다. CasΦ는 크기가 1000개 미만인 아미노산(예를 들어, 700개 내지 800개의 아미노산)이다. CasΦ 절단은 엇갈린 5' 오버행을 생성한다. CasΦ에서 단일 RuvC 활성 부위는 crRNA 가공 및 DNA 절단이 가능하다. 예를 들어, 문헌[Pausch et al. (2020) *Science* 369(6501):333-337]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0365] Cas 단백질은 야생형 단백질(즉, 자연에서 발생하는 것), 변형된 Cas 단백질(즉, Cas 단백질 변이체), 또는 야생형 또는 변형된 Cas 단백질의 단편일 수 있다. Cas 단백질은 또한, 야생형 또는 변형된 Cas 단백질의 촉매적 활성에 관하여 활성 변이체 또는 단편일 수 있다. 촉매적 활성에 관하여 활성 변이체 또는 단편은 야생형 또는 변형된 Cas 단백질 또는 이의 부분과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 포함할 수 있으며, 활성 변이체는 원하는 절단 부위에서 절단하는 능력을 보유하므로, 닉-유도 또는 이중-가닥-절단부-유도 활성을 보유한다. 닉-유도 또는 이중-가닥-절단부-유도 활성에 대한 검정은 알려져 있고, 일반적으로 절단 부위를 함유하는 DNA 기질 상에서의 Cas 단백질의 전체 활성 및 특이성을 측정한다.

[0366] 변형된 Cas 단백질의 일례는 변형된 SpCas9-HF1 단백질이며, 이는 비-특이적 DNA 접촉을 감소시키도록 설계된 변경을 보유하는 *스트렙토콕커스 피오게네스* Cas9의 고-충실도(high-fidelity) 변이체이다(N497A/R661A/Q695A/Q926A). 예를 들어, 문헌[Kleinstiver et al. (2016) *Nature* 529(7587):490-495]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 변형된 Cas 단백질의 또 다른 예는 표적-외(off-target) 효과를 감소시키도록 설계된 변형된 eSpCas9 변이체(K848A/K1003A/R1060A)이다. 예를 들어, 문헌[Slaymaker et al. (2016) *Science* 351(6268):84-88]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 다른 SpCas9 변이체는 K855A 및 K810A/K1003A/R1060A를 포함한다. 이들 및 다른 변형된 Cas 단백질은 예를 들어, 문헌[Cebrian-Serrano 및 Davies (2017) *Mamm. Genome* 28(7):247-261]에서 검토되어 있으며, *Genome* 28(7):247-261]에서 검토되어 있으며, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 변형된 Cas9 단백질의 또 다른 예는 xCas9이며, 이는 확장된 범위의 PAM 서열을 인식할 수 있는 SpCas9 변이체이다. 예를 들어, 문헌[Hu et al. (2018) *Nature* 556:57-63]을 참조하며, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0367] Cas 단백질은 핵산 결합 친화도, 핵산 결합 특이성, 및 효소적 활성 중 하나 이상을 증가시키거나 저하시키도록 변형될 수 있다. Cas 단백질은 또한, 단백질의 임의의 다른 활성 또는 특성, 예컨대 안정성을 변화시키도록 변

형될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질의 하나 이상의 뉴클레아제 도메인은 변형, 결실 또는 불활성화될 수 있거나, Cas 단백질은 단백질의 기능에 본질적이지 않은 도메인을 제거하기 위해 또는 Cas 단백질의 활성 또는 특성을 최적화하기 위해(예를 들어, 증강시키거나 감소시키기 위해) 절단될 수 있다.

[0368] Cas 단백질은 적어도 하나의 뉴클레아제 도메인, 예컨대 DNase 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 야생형 Cpf1 단백질은 일반적으로, 아마도 이량체 배치에서 표적 DNA의 양쪽 가닥을 절단하는 RuvC-유사 도메인을 포함한다. 마찬가지로, CasX 및 CasΦ는 일반적으로 표적 DNA의 두 가닥을 절단하는 단일 RuvC-유사 도메인을 포함한다. Cas 단백질은 또한 적어도 2개의 뉴클레아제 도메인, 예컨대 DNase 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 야생형 Cas9 단백질은 일반적으로 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인 및 HNH-유사 뉴클레아제 도메인을 포함한다. RuvC 도메인 및 HNH 도메인은 각각 이중 가닥 DNA의 상이한 가닥을 절단하여, DNA에서 이중 가닥 절단부를 만들 수 있다. 예를 들어, 문헌[Jinek et al. (2012) *Science* 337(6096):816-821]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0369] 뉴클레아제 도메인 중 하나 이상은 결실되거나 돌연변이화될 수 있어서, 이들은 더 이상 기능적이지 않거나 감소된 뉴클레아제 활성을 갖는다. 예를 들어, 뉴클레아제 도메인 중 하나가 Cas9 단백질에서 결실되거나 돌연변이화된다면, 생성된 Cas9 단백질은 닉카제로 지칭될 수 있고, 이중 가닥 절단부가 아니라 이중 가닥 표적 DNA 내에서 단일 가닥 절단부를 발생시킬 수 있다(즉, 이는 상보적 가닥과 비-상보적 가닥 둘 다가 아니라 둘 중 하나를 절단할 수 있음). 뉴클레아제 도메인 중 어느 것도 Cas9 단백질에서 결실되지 않거나 돌연변이화되지 않는다면, Cas9 단백질은 이중-가닥-절단부-유도 활성을 유지할 것이다. Cas9를 닉카제로 전환시키는 돌연변이의 일례는 *에스. 피오게네스*로부터의 Cas9의 RuvC 도메인 내의 D10A(Cas9의 위치 10에서 아스파르테이트로부터 알라닌으로의) 돌연변이이다. 마찬가지로, *에스. 피오게네스*로부터의 Cas9의 HNH 도메인 내 H939A(아미노산 위치 839에서 히스티딘으로부터 알라닌으로), H840A(아미노산 위치 840에서 히스티딘으로부터 알라닌으로), 또는 N863A(아미노산 위치 N863에서 아스파라긴으로부터 알라닌으로)는 Cas9를 닉카제로 전환시킬 수 있다. Cas9를 닉카제로 전환시키는 돌연변이의 다른 예는 *에스. 써모필루스*(*S. thermophilus*)로부터의 Cas9에 대한 상응하는 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Sapranauskas et al. (2011) *Nucleic Acids Res.* 39(21):9275-9282] 및 WO 2013/141680호를 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 이러한 돌연변이는 부위-안내(directed) 돌연변이유발(mutagenesis), PCR-매개 돌연변이유발, 또는 전체 유전자 합성과 같은 방법을 사용하여 발생될 수 있다. 닉카제를 생성하는 다른 돌연변이의 예는 예를 들어, WO 2013/176772호 및 WO 2013/142578호에서 찾을 수 있으며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0370] xCas9의 촉매적 도메인에서의 불활성화 돌연변이의 예는 SpCas9에 대해 상기 기재된 것과 동일하다. *스타필로콕커스 아우레우스* Cas9 단백질의 촉매적 도메인에서의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지되어 있다. 예를 들어, *스타필로콕커스 아우레우스* Cas9 효소(SaCas9)는 위치 N580에서 치환(예를 들어, N580A 치환) 또는 위치 D10에서 치환(예를 들어, D10A 치환)을 포함하여, Cas 닉카제를 발생시킬 수 있다. 예를 들어, WO 2016/106236호를 참조하며, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. Nme2Cas9의 촉매적 도메인에서의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지되어 있다(예를 들어, D16A 또는 H588A). St1Cas9의 촉매적 도메인에서의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지되어 있다(예를 들어, D9A, D598A, H599A, 또는 N622A). St3Cas9의 촉매적 도메인에서의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지되어 있다(예를 들어, D10A 또는 N870A). CjCas9의 촉매적 도메인에서의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지되어 있다(예를 들어, D8A 또는 H559A의 조합). FnCas9 및 RHA FnCas9의 촉매적 도메인에서의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지되어 있다(예를 들어, N995A).

[0371] Cpf1 단백질의 촉매적 도메인에서의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지되어 있다. *프란시셀라 노비시다* U112(FnCpf1), *악시다미노콕커스 종* BV3L6(AsCpf1), *라흐노스피라세애 박테리움* ND2006(LbCpf1), 및 *모락셀라 보보쿨리* 237(MbCpf1 Cpf1)로부터의 Cpf1 단백질에 관하여, 이러한 돌연변이는 AsCpf1의 위치 908, 993, 또는 1263 또는 Cpf1 이종상동체 내 상응하는 위치, 또는 LbCpf1의 위치 832, 925, 947, 또는 1180 또는 Cpf1 이종상동체 내 상응하는 위치에서 돌연변이를 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 예를 들어, AsCpf1의 돌연변이 D908A, E993A, 및 D1263A 또는 Cpf1 이종상동체 내 상응하는 돌연변이, 또는 LbCpf1의 D832A, E925A, D947A, 및 D1180A 또는 Cpf1 이종상동체 내 상응하는 돌연변이 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, US 2016/0208243호를 참조하며, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0372] CasX 단백질의 촉매적 도메인에서의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지되어 있다. *델타프로테오박테리아*로부터의 CasX 단백질에 관하여, D672A, E769A, 및 D935A(단독으로 또는 조합하여) 또는 다른 CasX 이종상동체 내의 상응하는 위치가 불활성화된다. 예를 들어, 문헌[Liu et al. (2019) *Nature* 566(7743):218-223]을 참조하고,

이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0373] CasΦ 단백질의 촉매적 도메인에서의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지되어 있다. 예를 들어, 단독으로 또는 조합하여 D371A 및 D394A는 불활성화 돌연변이이다. 예를 들어, 문헌[Pausch et al. (2020) *Science* 369(6501):333-337]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0374] Cas 단백질은 또한 이종성 폴리펩티드에 융합 단백질로서 작동 가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 절단 도메인에 융합될 수 있다. WO 2014/089290호를 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. Cas 단백질은 또한 증가되거나 감소된 안정성을 제공하는 이종성 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 융합된 도메인 또는 이종성 폴리펩티드는 Cas 단백질 내의 N-말단, C-말단, 또는 내부적으로 위치할 수 있다.

[0375] 일례로, Cas 단백질은 세포내 위치화(subcellular localization)를 제공하는 하나 이상의 이종성 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 이러한 이종성 폴리펩티드는 예를 들어, 핵으로의 표적화를 위한 하나 이상의 핵 위치 신호(NLS), 예컨대 단립(monopartite) SV40 NLS 및/또는 이분(bipartite) 알파-임포틴(importin) NLS, 미토콘드리아로의 표적화를 위한 미토콘드리아 위치 신호, ER 체류 신호 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Lange et al. (2007) *J. Biol. Chem.* 282(8):5101-5105]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 이러한 세포 내 위치 신호는 Cas 단백질 내의 N-말단, C-말단, 또는 어디에서나 위치할 수 있다. NLS는 염기성 아미노산의 신전부를 포함할 수 있고, 단립 서열 또는 이분 서열일 수 있다. 임의로, Cas 단백질은 N-말단에서의 NLS(예를 들어, 알파-임포틴 NLS 또는 단립 NLS) 및 C-말단에서의 NLS(예를 들어, SV40 NLS 또는 이분 NLS)를 포함하여 2개 이상의 NLS를 포함할 수 있다. Cas 단백질은 또한, N-말단에 2개 이상의 NLS 및/또는 C-말단에 2개 이상의 NLS를 포함할 수 있다.

[0376] Cas 단백질은 예를 들어, 1개 내지 10개의 NLS와 융합될 수 있다(예를 들어, 1개 내지 5개의 NLS와 융합되거나 하나의 NLS와 융합될 수 있음). 하나의 NLS가 사용되는 경우, NLS는 Cas 단백질 서열의 N-말단 또는 C-말단에서 연결될 수 있다. NLS는 또한 Cas 단백질 서열 내에 삽입될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질은 하나 초과의 NLS와 융합될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 2개, 3개, 4개, 또는 5개의 NLS와 융합될 수 있다. 구체적인 예에서, Cas 단백질은 2개의 NLS와 융합될 수 있다. 소정의 상황에서, 2개의 NLS는 동일하거나(예를 들어, 2개의 SV40 NLS) 상이할 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 카르복시 말단에 연결된 2개의 SV40 NLS 서열에 융합될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질은 2개의 NLS와 융합될 수 있으며, 하나의 NLS는 N-말단에 결합되고 하나의 NLS는 C-말단에 결합된다. 다른 예에서, Cas 단백질은 3개의 NLS와 융합될 수 있거나 어떠한 NLS와도 융합되지 않을 수 있다. NLS는 예를 들어, SV40 NLS, PKKKRKV(서열번호 13) 또는 PKKKRRV(서열번호 14)와 같이 단립 서열일 수 있다. NLS는 이분 서열, 예컨대 핵플라스민의 NLS, KRPAATKKAGQAKKKK(서열번호 15)일 수 있다. 구체적인 예에서, 단일 PKKKRKV(서열번호 13) NLS는 Cas 단백질의 C-말단에 결합될 수 있다. 하나 이상의 링커는 임의로 융합 부위에 포함된다.

[0377] Cas 단백질은 또한, 세포-투과 도메인 또는 단백질 형질도입 도메인에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, 세포-투과 도메인은 HIV-1 TAT 단백질, 인간 B형 간염 바이러스로부터의 TLM 세포-투과 모티프, MPG, Pep-1, VP22, 단순 포진 바이러스로부터의 세포 투과 펩티드, 또는 폴리아르기닌 펩티드 신호로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, WO 2014/089290호 및 WO 2013/176772호를 참조하며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 세포-투과 도메인은 Cas 단백질 내의 N-말단, C-말단, 또는 어디에서나 위치할 수 있다.

[0378] Cas 단백질은 또한, 추적(tracking) 또는 정제의 용이성을 위해 이종성 폴리펩티드, 예컨대 형광 단백질, 정제 태그, 또는 에피토프 태그에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 형광 단백질의 예는 녹색 형광 단백질(예를 들어, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, eGFP, 에메랄드, 아자미 그린, 단량체성 아자미 그린, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), 황색 형광 단백질(예를 들어, YFP, eYFP, 시트린, 비너스, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), 청색 형광 단백질(예를 들어, eBFP, eBFP2, 아주라이트, mKalama1, GFPuv, 사파이어, T-사파이어), 시안색 형광 단백질(예를 들어, eCFP, 세룰린, CyPet, AmCyan1, 미도리이시-시안색), 적색 형광 단백질(예를 들어, mKate, mKate2, mPlum, DsRed 단량체, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-단량체, HcRed-탠덤, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred), 주황색 형광 단백질(예를 들어, mOrange, mKO, 쿠사비라-오렌지, 단량체성 쿠사비라-오렌지, mTangerine, tdTomato), 및 임의의 다른 적합한 형광 단백질을 포함한다. 태그의 예는 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 키틴 결합 단백질(CBP), 말토스 결합 단백질, 티오레독신(TRX), 폴리(NANP), 탠덤 친화도 정제(TAP: tandem affinity purification) 태그, myc, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2,

FLAG, 헤마글루티닌(HA), nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 히스티딘(His), 비오틴 카르복실 담체 단백질(BCCP), 및 칼모듈린(calmodulin)을 포함한다.

[0379] Cas 단백질은 또한 표지된 핵산에 테터링(tether)될 수 있다. 이러한 테터링(즉, 물리적 연결)은 공유 상호작용 또는 비공유 상호작용을 통해 달성될 수 있으며, 테터링은 직접적일 수 있거나(예를 들어, 단백질 상의 시스테인 또는 라이신 잔기의 변형 또는 인테인(intein) 변형에 의해 달성될 수 있는 직접적 융합 또는 화학적 접합을 통해), 하나 이상의 개입 링커 또는 어댑터 분자, 예컨대 스트렙타비딘(streptavidin) 또는 앱타머(aptamer)를 통해 달성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[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]; 문헌[Goodman et al. (2009) *Chembiochem.* 10(9):1551-1557; and Khatwani et al. (2012) *Bioorg. Med. Chem.* 20(14):4532-4539]에 기재되어 있으며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 단백질-핵산 접합체를 합성하기 위한 비공유 전략은 비오틴-스트렙타비딘 및 니켈-히스티딘 방법을 포함한다. 공유 단백질-핵산 접합체는, 적절하게 작용화된 핵산 및 단백질을 광범위하게 다양한 화학을 사용하여 연결함으로써 합성될 수 있다. 이들 화학 중 일부는 단백질 표면 상의 아미노산 잔기(예를 들어, 라이신 아민 또는 시스테인 티올)에의 올리고뉴클레오티드의 직접적 부착을 수반하는 한편, 다른 더욱 복잡한 계획은 단백질의 번역-후 변형 또는 촉매적 또는 반응성 단백질 도메인의 수반을 필요로 한다. 핵산에의 단백질의 공유 부착 방법은 예를 들어, 단백질 라이신 또는 시스테인 잔기에의 올리고뉴클레오티드의 화학적 가교, 발현된 단백질-리게이션, 화학효소적 방법, 및 포토앱타머(photoaptamer)의 사용을 포함할 수 있다. 표지된 핵산은 Cas 단백질 내의 C-말단, N-말단에, 또는 내부 영역에 테터링될 수 있다. 일례에서, 표지된 핵산은 Cas 단백질의 C-말단 또는 N-말단에 테터링된다. 마찬가지로, Cas 단백질은 표지된 핵산 내의 5' 단부, 3' 단부에, 또는 내부 영역에 테터링될 수 있다. 다시 말해, 표지된 핵산은 임의의 배향 및 극성으로 테터링될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 표지된 핵산 내의 5' 단부 또는 3' 단부에 테터링될 수 있다.

[0380] Cas 단백질은 임의의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 단백질, 예컨대, gRNA와 복합체화된 Cas 단백질의 형태로 제공될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산, 예컨대, RNA(예를 들어, 메신저 RNA(mRNA)) 또는 DNA의 형태로 제공될 수 있다. 임의로, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 특정 세포 또는 유기체에서 단백질로의 효율적인 번역을 위해 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 자연 발생 폴리뉴클레오티드 서열과 비교하여, 박테리아 세포, 효모 세포, 인간 세포, 비인간 세포, 포유류 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 또는 임의의 다른 관심 숙주 세포에서 더 높은 사용 빈도를 갖는 코돈을 치환하도록 변형될 수 있다. Cas 단백질을 인코딩하는 핵산이 세포 내로 도입될 때, Cas 단백질은 세포에서 일시적으로, 조건적으로, 또는 구성적으로 발현될 수 있다.

[0381] Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 세포의 게놈에 안정하게 통합되고 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 발현 구조체에서 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 발현 구조체는 관심 유전자 또는 다른 핵산 서열(예를 들어, Cas 유전자)의 발현을 지시할 수 있는 임의의 핵산 구조체를 포함하고, 이는 이러한 관심 핵산 서열을 표적 세포로 이전시킬 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 gRNA를 인코딩하는 DNA를 포함하는 벡터에 존재할 수 있다. 대안적으로, 이는, gRNA를 인코딩하는 DNA를 포함하는 벡터와는 별개인 벡터 또는 플라스미드에 존재할 수 있다. 발현 구조체에 사용될 수 있는 프로모터는 예를 들어, 진핵 세포, 인간 세포, 비인간 세포, 포유류 세포, 비인간 포유류 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 만능성 세포, 배아 줄기(ES)세포, 성인 줄기세포, 발달 제약 전구세포(progenitor cell), 유도 만능성 줄기(iPS)세포, 또는 1-세포 단계 배아 중 하나 이상에서 활성인 프로모터를 포함한다. 이러한 프로모터는 예를 들어, 조건적 프로모터, 유도적 프로모터, 구성적 프로모터, 또는 조직-특이적 프로모터일 수 있다. 임의로, 프로모터는 하나의 방향에서 Cas 단백질과 다른 방향에서 가이드 RNA 둘 다의 발현을 구동하는 양방향 프로모터일 수 있다. 이러한 양방향 프로모터는 (1) 3개의 외부 제어 요소를 함유하는 완전한 종래의 일방향적 Pol III 프로모터: 원위부 서열 요소(DSE), 근위부 서열 요소(PSE), 및 TATA 박스; 및 (2) 역배향에서 DSE의 5' 말단에 융합된 TATA 박스 및 PSE를 포함하는 제2 기본(basic) Pol III 프로모터로 구성될 수 있다. 예를 들어, H1 프로모터에서, DSE는 PSE 및 TATA 박스에 인접하고, 프로모터는, U6 프로모터로부터 유래된 TATA 박스 및 PSE를 부착함으로써 역방향에서의 전사가 제어되는 하이브리드 프로모터를 생성함으로써 양방향성으로 될 수 있다. 예를 들어, US 2016/0074535호를 참조하며, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. Cas 단백질을 인코딩하는 유전자 및 가이드 RNA를 발현하기 위한 양방향 프로모터의 사용은 동시에, 전달을 용이하게 하기 위해 컴팩트(compact) 발현 카세트의 발생을 가능하게 한다.

[0382] 상이한 프로모터는 Cas 발현 또는 Cas9 발현을 구동하는 데 사용될 수 있다. 일부 방법에서, 작은 프로모터가

사용되어 Cas 또는 Cas9 코딩 서열이 AAV 구조체 내로 적합화(fit)될 수 있다. 예를 들어, Cas 또는 Cas9 및 하나 이상의 gRNA(예를 들어, 1개의 gRNA 또는 2개의 gRNA 또는 3개의 gRNA 또는 4개의 gRNA)는 LNP-매개 전달(예를 들어, RNA의 형태) 또는 아데노-관련 바이러스(AAV)-매개 전달(예를 들어, AAV2-매개 전달, AAV5-매개 전달, AAV8-매개 전달, 또는 AAV7m8-매개 전달)을 통해 전달될 수 있다. 예를 들어, 뉴클레아제 작용제는 CRISPR/Cas9일 수 있고, 내인성 인간 *ALB* 유전자좌의 인트론 1을 표적화하는 Cas9 mRNA 및 gRNA는 LNP-매개 전달 또는 AAV-매개 전달을 통해 전달될 수 있다. Cas 또는 Cas9 및 gRNA(들)는 단일 AAV에서 또는 2개의 별개의 AAV를 통해 전달될 수 있다. 예를 들어, 제1 AAV는 Cas 또는 Cas9 발현 카세트를 운반할 수 있고, 제2 AAV는 gRNA 발현 카세트를 운반할 수 있다. 유사하게는, 제1 AAV는 Cas 또는 Cas9 발현 카세트를 운반할 수 있고, 제2 AAV는 2개 이상의 gRNA 발현 카세트를 운반할 수 있다. 대안적으로, 단일 AAV는 Cas 또는 Cas9 발현 카세트(예를 들어, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 Cas 또는 Cas9 코딩 서열) 및 gRNA 발현 카세트(예를 들어, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 gRNA 코딩 서열)를 운반할 수 있다. 유사하게는, 단일 AAV는 Cas 또는 Cas9 발현 카세트(예를 들어, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 Cas 또는 Cas9 코딩 서열) 및 2개 이상의 gRNA 발현 카세트(예를 들어, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 gRNA 코딩 서열)를 운반할 수 있다. 상이한 프로모터는 gRNA, 예컨대 U6 프로모터 또는 작은 tRNA Gln의 발현을 구동하는 데 사용될 수 있다. 마찬가지로, 상이한 프로모터가 Cas9 발현을 구동하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 작은 프로모터가 사용되어, Cas9 코딩 서열은 AAV 구조체 내로 적합화될 수 있다. 유사하게는, 작은 Cas9 단백질(예를 들어, SaCas9 또는 CjCas9)은 AAV 포장 수용력을 최대화하는 데 사용된다.

[0383] mRNA로서 제공된 Cas 단백질은 향상된 안정성 및/또는 면역원성 특성을 위해 변형될 수 있다. 변형은 mRNA 내의 하나 이상의 뉴클레오시드에 이루어질 수 있다. mRNA 대한 화학적 변형의 예는 슈도우리딘, 1-메틸-슈도우리딘, 및 5-메틸-시티딘을 포함한다. Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA가 또한 캡핑될 수 있다. 캡은 예를 들어, +1 리보뉴클레오티드가 리보스의 2'O 위치에서 메틸화되는 캡 1 구조일 수 있다. 캡핑은 예를 들어 우수한 생체내 활성을 제공할 수 있고(예를 들어, 자연 캡을 모방함으로써), 숙주의 선천적 면역계의 자극을 감소시키는 자연 구조체를 초래할 수 있다(예를 들어, 선천적 면역계에서 패턴 인식 수용체의 활성화를 감소시킬 수 있음). Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 또한 폴리아데닐화(폴리(A) 테일을 포함하도록)될 수 있다. Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 또한 슈도우리딘을 포함하도록 변형될 수 있다(예를 들어, 슈도우리딘으로 완전히 치환될 수 있음). 또 다른 예로서, N1-메틸-슈도우리딘을 함유하는 캡핑된 및 폴리아데닐화된 Cas mRNA가 사용될 수 있다. Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 또한 N1-메틸-슈도우리딘을 포함하도록 변형될 수 있다(예를 들어, N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환될 수 있음). 또 다른 예로, 슈도우리딘으로 완전히 치환된 Cas mRNA가 사용될 수 있다(즉, 모든 표준 우라실 잔기는, 우라실이 질소-탄소보다는 탄소-탄소 결합으로 부착되는 우리딘 이성질체인 슈도우리딘으로 대체됨). 또 다른 예로서, N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환된 Cas mRNA가 사용될 수 있다(즉, 모든 표준 우라실 잔기는 N1-메틸-슈도우리딘으로 대체됨). 마찬가지로, Cas mRNA는 동의 코돈을 사용한 우리딘의 결핍에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, 슈도우리딘으로 완전히 치환된, 캡핑되고 폴리아데닐화된 Cas mRNA가 사용될 수 있다. 예를 들어, 슈도우리딘으로 완전히 치환된, 캡핑되고 폴리아데닐화된 Cas mRNA가 사용될 수 있다.

[0384] Cas mRNA는 적어도 하나의, 복수의, 또는 모든 우리딘 위치에 변형된 우리딘을 포함할 수 있다. 변형된 우리딘은 5 위치에서(예를 들어, 할로겐, 메틸, 또는 에틸로) 변형된 우리딘일 수 있다. 변형된 우리딘은 1 위치에서(예를 들어, 할로겐, 메틸, 또는 에틸로) 변형된 슈도우리딘일 수 있다. 변형된 우리딘은 예를 들어, 슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 5-메톡시우리딘, 5-아이오도우리딘, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 5-메톡시우리딘이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 5-아이오도우리딘이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 N1-메틸-슈도우리딘이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘과 N1-메틸-슈도우리딘의 조합이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘과 5-메톡시우리딘의 조합이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 N1-메틸 슈도우리딘과 5-메톡시우리딘의 조합이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 5-아이오도우리딘과 N1-메틸-슈도우리딘의 조합이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘과 5-아이오도우리딘의 조합이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 5-아이오도우리딘과 5-메톡시우리딘의 조합이다.

[0385] 본원에 개시된 Cas mRNA는 또한 5' 캡, 예컨대 Cap0, Cap1, 또는 Cap2를 포함할 수 있다. 5' 캡은 일반적으로 5'-트리포스페이트를 통해 mRNA의 5'-으로부터-3' 사슬의 제1 뉴클레오티드의 5' 위치(즉, 제1 캡-근접(cap-proximal) 뉴클레오티드)에 결합된 7-메틸구아닌 리보뉴클레오티드(이는 예를 들어, ARCA에 관해 추가로 변형될 수 있음)이다. Cap0에서, mRNA의 제1 캡-근접 뉴클레오티드의 리보스와 제2 캡-근접 뉴클레오티드의 리보스는 둘 다 2'-하이드록실을 포함한다. Cap1에서, mRNA의 제1 전사된 뉴클레오티드의 리보스와 제2 전사된 뉴클레오

티드의 리보스는 2'-메톡시 및 2'-하이드록실을 각각 포함한다. Cap2에서, mRNA의 제1 캡-근접 뉴클레오티드의 리보스와 제2 캡-근접 뉴클레오티드의 리보스는 둘 다 2'-메톡시를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Katibah et al. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(33):12025-30 and Abbas et al. (2017) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114(11):E2106-E2115]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 포유류 mRNA, 예컨대 인간 mRNA를 포함한 대부분의 내인성 고등 진핵생물 mRNA는 Cap1 또는 Cap2를 포함한다. Cap0, 및 Cap1과 Cap2와 상이한 다른 캡 구조체는 인간과 같은 포유류에서 내재성 면역계의 성분, 예컨대 IFIT-1 및 IFIT-5에 의해 비자기(non-self)로서 인식되므로 면역원성일 수 있으며, 이는 유형 I 인터페론을 포함한 상승된 사이토카인 수준을 초래할 수 있다. 내재성 면역계의 성분, 예컨대 IFIT-1 및 IFIT-5는 또한, Cap1 또는 Cap2 이외의 캡과 mRNA의 결합을 위해 eIF4E와 경쟁하여, mRNA의 번역을 잠재적으로 저해할 수 있다.

[0386] 캡은 공동-전사적으로(co-transcriptionally) 포함될 수 있다. 예를 들어, ARCA(안티-리버스 캡 유사체(anti-reverse cap analog); Thermo Fisher Scientific 카탈로그 번호 AM8045)는 시험관내에서 개시 시 전사물 내로 혼입될 수 있는 구아닌 리보뉴클레오티드의 5' 위치에 연결된 7-메틸구아닌 3'-메톡시-5'-트리포스페이트를 포함하는 캡 유사체이다. ARCA는, 제1 캡-근접 뉴클레오티드의 2' 위치가 하이드록실인 Cap0 캡을 이끈다. 예를 들어, 문헌[Stepinski et al. (2001) *RNA* 7:1486-1495]를 참조하며, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0387] CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies 카탈로그 번호 N-7113) 또는 CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies 카탈로그 번호 N-7133)를 사용하여 Cap1 구조체를 공동-전사적으로 제공할 수 있다. CleanCap™ AG 및 CleanCap™ GG의 3'-O-메틸화된 버전은 또한 TriLink Biotechnologies로부터 각각 카탈로그 번호 N-7413 및 N-7433으로서 입수 가능하다.

[0388] 대안적으로, 캡은 RNA에 전사-후에(post-transcriptionally) 첨가될 수 있다. 예를 들어, 백시니아 캡핑 효소는 상업적으로 입수 가능하고(New England Biolabs 카탈로그 번호 M2080S), 이의 D1 서브유닛에 의해 제공되는 RNA 트리포스파타제 및 구아닐릴트랜스퍼라제 활성, 및 이의 D12 서브유닛에 의해 제공되는 구아닌 메틸트랜스퍼라제를 갖는다. 이와 같이, 이는 7-메틸구아닌을 RNA에 첨가하여, S-아데노실 메티오닌 및 GTP의 존재 하에 Cap0을 제공할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Guo and Moss (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:4023-4027 and Mao and Shuman (1994) *J. Biol. Chem.* 269:24472-24479]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0389] Cas mRNA는 폴리-아데닐화된(폴리-A 또는 폴리(A) 또는 폴리-아데닌) 테일을 추가로 포함할 수 있다. 폴리-A 테일은 예를 들어, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 또는 적어도 100개의 아데닌, 그리고 임의로 300개까지의 아데닌을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리-A 테일은 95개, 96개, 97개, 98개, 99개, 또는 100개의 아데닌 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0390] ***(3) 가이드 RNA***

[0391] "가이드 RNA" 또는 "gRNA"는, Cas 단백질(예를 들어, Cas9 단백질)에 결합하고 Cas 단백질을 표적 DNA 내의 특정 위치로 표적화하는 RNA 분자이다. 가이드 RNA는 2개의 세그먼트를 포함할 수 있다: "DNA-표적화 세그먼트"(가이드 서열"이라고도 부름) 및 "단백질-결합 세그먼트". "세그먼트"는 분자의 구획 또는 영역, 예컨대 RNA 내 뉴클레오티드의 인접 신전부를 포함한다. 일부 gRNA, 예컨대 Cas9에 대한 gRNA는 2개의 별개의 RNA 분자를 포함할 수 있다: "활성자-RNA"(예를 들어, tracrRNA) 및 "표적자(targeter)-RNA"(예를 들어, CRISPR RNA 또는 crRNA). 다른 gRNA는 단일 RNA 분자(단일 RNA 폴리뉴클레오티드)이며, 이는 또한 "단일-분자 gRNA", "단일-가이드 RNA", 또는 "sgRNA"라고도 할 수 있다. 예를 들어, WO 2013/176772호, WO 2014/065596호, WO 2014/089290호, WO 2014/093622호, WO 2014/099750호, WO 2013/142578호, 및 WO 2014/131833호를 참조하며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 가이드 RNA는 CRISPR RNA(crRNA) 또는 crRNA와 트랜스-활성화 CRISPR RNA(tracrRNA)의 조합을 지칭할 수 있다. crRNA 및 tracrRNA는 단일 RNA 분자(단일 가이드 RNA 또는 sgRNA)로서 또는 2개의 별개의 RNA 분자(이중 가이드 RNA 또는 dgRNA)에서 연관될 수 있다. Cas9의 경우, 예를 들어, 단일-가이드 RNA는 tracrRNA에(예를 들어, 링커를 통해) 융합된 crRNA를 포함할 수 있다. Cpf1 및 CasΦ의 경우, 예를 들어, 표적 서열에의 결합을 달성하기 위해 단지 crRNA가 필요하다. 용어 "가이드 RNA" 및 "gRNA"는 이중-분자(즉, 모듈형) gRNA와 단일-분자 gRNA 둘 다 포함한다. 본원에 개시된 방법 및 조성물 중 일부에서, gRNA는 *에스. 피오게네스* Cas9 gRNA 또는 이의 등가물이다. 본원에 개시된 방법 및 조성물 중 일부에서, gRNA는 *에스. 아우레우스* Cas9 gRNA 또는 이의 등가물이다.

[0392] 예시적인 2-분자 gRNA는 crRNA-유사("CRISPR RNA" 또는 "표적자-RNA" 또는 "crRNA" 또는 "crRNA 반복부") 분자

및 상응하는 tracrRNA-유사("트랜스-활성화 CRISPR RNA" 또는 "활성자-RNA" 또는 "tracrRNA") 분자를 포함한다. crRNA는 gRNA의 DNA-표적화 세그먼트(단일 가닥) 및 gRNA의 단백질-결합 세그먼트의 dsRNA 듀플렉스 중 하나의 절반을 형성하는 뉴클레오티드의 신전부 둘 다 포함한다. DNA-표적화 세그먼트의 하류(3')에 위치한 crRNA 테일의 예(예를 들어, *에스. 피오게네스* Cas9과 사용하기 위한)는 GUUUUAGAGCUAUGCU(서열번호 16) 또는 GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG(서열번호 17)를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 본원에 개시된 임의의 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 16 또는 서열번호 17의 5' 단부에 접합되어, crRNA를 형성할 수 있다.

[0393] 상응하는 tracrRNA(활성자-RNA)는 gRNA의 단백질-결합 분절의 dsRNA 듀플렉스 중 다른 절반을 형성하는 뉴클레오티드의 신전부를 포함한다. crRNA의 뉴클레오티드의 신전부는 tracrRNA의 뉴클레오티드의 신전부에 상보적이고 이와 혼성화하여 gRNA의 단백질-결합 도메인의 dsRNA 듀플렉스를 형성한다. 이와 같이, 각각의 crRNA는 상응하는 tracrRNA를 갖고 있다고 할 수 있다. tracrRNA 서열의 예(예를 들어, *에스. 피오게네스* Cas9과 사용하기 위한)는 AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU(서열번호 18), AAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU(서열번호 19), 또는 GUUGGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(서열번호 20) 중 임의의 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

[0394] crRNA와 tracrRNA 둘 다 필요한 시스템에서, crRNA 및 상응하는 tracrRNA는 혼성화하여 gRNA를 형성한다. crRNA만 필요한 시스템에서, crRNA는 gRNA일 수 있다. crRNA는, 표적 DNA의 상보적 가닥에 혼성화하는 단일 가닥 DNA-표적화 세그먼트를 추가로 제공한다. 세포 내에서의 변형에 사용된다면, 주어진 crRNA 또는 tracrRNA 분자의 정확한 서열은 RNA 분자가 사용될 종에 특이적이도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Mali et al. (2013) *Science* 339(6121):823-826; Jinek et al. (2012) *Science* 337(6096):816-821]; 문헌[Hwang et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(3):227-229]; 문헌[Jiang et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(3):233-239]; 및 문헌[Cong et al. (2013) *Science* 339(6121):819-823]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0395] 주어진 gRNA의 DNA-표적화 세그먼트(crRNA)은, 하기에서 더욱 상세히 기재된 바와 같이 표적 DNA의 상보적 가닥 상의 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. gRNA의 DNA-표적화 세그먼트는 혼성화(즉, 염기쌍 형성(base pairing))을 통해 서열-특이적 방식으로 표적 DNA와 상호작용한다. 이와 같이, DNA-표적화 세그먼트의 뉴클레오티드 서열은 다양할 수 있고, gRNA 및 표적 DNA가 상호작용할 표적 DNA 내에서의 위치를 결정한다. 대상체 gRNA의 DNA-표적화 세그먼트는 표적 DNA 내의 임의의 원하는 서열에 혼성화하도록 변형될 수 있다. 자연 발생 crRNA는 CRISPR/Cas 시스템 및 유기체에 따라 상이하지만, 종종 21개 내지 46개 뉴클레오티드 길이의 2개의 직접 반복부(DR: direct repeat)에 의해 플랭킹되는 21개 내지 72개 뉴클레오티드 길이의 표적화 세그먼트를 함유한다(예를 들어, WO 2014/131833호를 참조하며, 이는 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함됨). *에스. 피오게네스*의 경우, DR은 36개 뉴클레오티드 길이이고, 표적화 세그먼트는 30개 뉴클레오티드 길이이다. 3' 위치한 DR은 상응하는 tracrRNA에 상보적이고 이와 혼성화하며, 이는 다시 Cas 단백질에 결합한다.

[0396] DNA-표적화 세그먼트는 예를 들어, 적어도 약 12개, 적어도 약 15개, 적어도 약 17개, 적어도 약 18개, 적어도 약 19개, 적어도 약 20개, 적어도 약 25개, 적어도 약 30개, 적어도 약 35개, 또는 적어도 약 40개 뉴클레오티드의 길이를 가질 수 있다. 이러한 DNA-표적화 세그먼트는 예를 들어, 약 12개 내지 약 100개, 약 12개 내지 약 80개, 약 12개 내지 약 50개, 약 12개 내지 약 40개, 약 12개 내지 약 30개, 약 12개 내지 약 25개, 약 12개 내지 약 20개 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, DNA 표적화 세그먼트는 약 15개 내지 약 25개 뉴클레오티드(예를 들어, 약 17개 내지 약 20개 뉴클레오티드, 또는 약 17개, 18개, 19개, 또는 20개 뉴클레오티드)일 수 있다. 예를 들어, US 2016/0024523호를 참조하며, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. *에스. 피오게네스*로부터의 Cas9의 경우, 전형적인 DNA-표적화 세그먼트는 16개 내지 20개 뉴클레오티드 길이 또는 17개 내지 20개 뉴클레오티드 길이이다. *에스. 아우레우스*로부터의 Cas9의 경우, 전형적인 DNA-표적화 세그먼트는 21개 내지 23개 뉴클레오티드 길이이다. Cpf1의 경우, 전형적인 DNA-표적화 세그먼트는 적어도 16개 뉴클레오티드 길이 또는 적어도 18개 뉴클레오티드 길이이다.

[0397] 일례에서, DNA-표적화 세그먼트는 약 20개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 그러나, 더 짧은 서열 및 더 긴 서열이 또한 표적화 세그먼트(예를 들어, 15개 내지 25개 뉴클레오티드 길이, 예컨대 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 또는 25개 뉴클레오티드 길이)에 사용될 수 있다. DNA-표적화 분절과 상응하는 가이드 RNA 표적 서열 사이의 동일성 정도(degree)(또는 DNA-표적화 분절과 가이드 RNA 표적 서열의 다른 가닥 사이의 상보성의 정도)는 예를 들어, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약

98%, 약 99%, 또는 약 100%일 수 있다. DNA-표적화 세그먼트 및 상응하는 가이드 RNA 표적 서열은 하나 이상의 미스매치를 함유할 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트 및 상응하는 가이드 RNA 표적 서열은 1개 내지 4개, 1개 내지 3개, 1개 내지 2개, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 미스매치를 함유할 수 있다(예를 들어, 가이드 RNA 표적 서열의 총 길이가 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개 이상의 뉴클레오티드인 경우). 예를 들어, 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트 및 상응하는 가이드 RNA 표적 서열은 1개 내지 4개, 1개 내지 3개, 1개 내지 2개, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 미스매치를 함유할 수 있으며, 여기서 가이드 RNA 표적 서열의 총 길이는 20개 뉴클레오티드이다.

[0398] 일례로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트(즉, 가이드 서열)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트) 중 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트) 중 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드로부터 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다.

[0399] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트(즉, 가이드 서열)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트) 중 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포

함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트) 중 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드로부터 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다.

[0400] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트(즉, 가이드 서열)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트) 중 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트) 중 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 36에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드로부터 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다.

[0401] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트(즉, 가이드 서열)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트) 중 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도

97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트) 중 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 30에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드로부터 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다.

[0402] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 33에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트(즉, 가이드 서열)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 33에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 33에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 33에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 33에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트) 중 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 33에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트) 중 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 33에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 33에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드로부터 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다.

[0403] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 41에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트(즉, 가이드 서열)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 41에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 41에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 41에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 41에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트) 중 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도

97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 41에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트) 중 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 41에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)과 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 41에 기재된 서열(DNA-표적화 세그먼트)의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드로부터 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다.

[0404] [표 2]

인간 *ALB* 인트론 1 가이드 서열

가이드 서열	서열번호
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
ACCUUUUUUUUUUUUUACCU	55
AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU	56
UGAUUCCUACAGAAAAACUC	57
UGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	58
CCUCACUCUUGUCUGGGCAA	59
ACCUCACUCUUGUCUGGGCA	60
UGAGCAACCUCACUCUUGUC	61

[0405]

[0406] [표 3]

인간 ***ALB*** 인트론 **1 sgRNA** 서열

전체 서열	변형된 전체 서열
GAGCAACCUCACUCUUGUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 62)	mG*mA*mG*CAACCUCACUCUUGUCUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 94)
AUGCAUUUGUUUCAAAAUAUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 63)	mA*mU*mG*CAUUUGUUUCAAAAUAUGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 95)
UGCAUUUGUUUCAAAAUAUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 64)	mU*mG*mC*AUUUGUUUCAAAAUAUUGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 96)
AUUUAUGAGAUCAACAGCACGUUUUA GAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 65)	mA*mU*mU*UAUGAGAUCAACAGCACGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 97)
GAUCAACAGCACAGGUUUUGGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 66)	mG*mA*mU*CAACAGCACAGGUUUUGGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 98)
UUAAAUAAAGCAUAGUGCAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 67)	mU*mU*mA*AAUAAAGCAUAGUGCAAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 99)
UAAAGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 68)	mU*mA*mA*AGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 100)
UAGUGCAAUGGAUAGGUCUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 69)	mU*mA*mG*UGCAAUGGAUAGGUCUUGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 101)
UACUAAAACUUUAUUUUACUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 70)	mU*mA*mC*UAAAACUUUAUUUUACUGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 102)

[0407]

[0408]

전체 서열	변형된 전체 서열
AAAGUUGAACAAUAGAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 71)	mA*mA*mA*GUUGAACAAUAGAAAAAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 103)
AAUGCAUAAUCUAAGUCAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 72)	mA*mA*mU*GCAUAAUCUAAGUCAAAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 104)
UAAUAAAAUUCAAACAUCCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 73)	mU*mA*mA*UAAAAUUCAAACAUCCUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 105)
GCAUCUUUAAAGAAUUAUUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 74)	mG*mC*mA*UCUUUAAAGAAUUAUUUGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 106)
UUUGGCAUUUAUUUCUAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 75)	mU*mU*mU*GGCAUUUAUUUCUAAAAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 107)
UGUAUUUGUGAAGUCUUACAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 76)	mU*mG*mU*AUUUGUGAAGUCUUACAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 108)
UCCUAGGUAAAAAAAAAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 77)	mU*mC*mC*UAGGUAAAAAAAAAAAAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 109)
UAAUUUUCUUUUGCGCACUAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 78)	mU*mA*mA*UUUUCUUUUGCGCACUAGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 110)
UGACUGAAACUUCACAGAAUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 79)	mU*mG*mA*CUGAAACUUCACAGAAUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 111)
GACUGAAACUUCACAGAAUAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 80)	mG*mA*mC*UGAAACUUCACAGAAUAGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 112)

전체 서열	변형된 전체 서열
UUCAUUUUAGUCUGUCUUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 81)	mU*mU*mC*AUUUUAGUCUGUCUUCUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 113)
AUUAUCUAAGUUUGAAUAUAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 82)	mA*mU*mU*AUCUAAGUUUGAAUAUAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 114)
AAUUUUUAAAAUAGUAUUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 83)	mA*mA*mU*UUUUAAAAUAGUAUUCUGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 115)
UGAAUUAUUCUUCUGUUUAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 84)	mU*mG*mA*AUUAUUCUUCUGUUUAAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 116)
AUCAUCCUGAGUUUUUCUGUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 85)	mA*mU*mC*AUCCUGAGUUUUUCUGUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 117)
UUACUAAAACUUUAUUUUACGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 86)	mU*mU*mA*CUAAAACUUUAUUUUACGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 118)
ACCUUUUUUUUUUUUUUACCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 87)	mA*mC*mC*UUUUUUUUUUUUUUACCUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 119)
AGUGCAAUGGAUAGGUCUUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 88)	mA*mG*mU*GCAAUGGAUAGGUCUUUGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 120)
UGAUUCCUACAGAAAAACUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 89)	mU*mG*mA*UUCCUACAGAAAAACUCGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 121)
UGGGCAAGGGAAGAAAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 90)	mU*mG*mG*GCAAGGGAAGAAAAAAAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 122)

[0409]

전체 서열	변형된 전체 서열
CCUCACUCUUGUCUGGGCAAGUUUUA GAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 91)	mC*mC*mU*CACUCUUGUCUGGGCAAGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 123)
ACCUCACUCUUGUCUGGGCAGUUUUA GAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 92)	mA*mC*mC*UCACUCUUGUCUGGGCAGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 124)
UGAGCAACCUCACUCUUGUCGUUUUA GAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 93)	mU*mG*mA*GCAACCUCACUCUUGUCGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 125)

[0410]

[0411] [표 4]

마우스 ***Alb*** 인트론 **1** 가이드 서열

가이드 서열	서열번호
CACUCUUGUCUGUGGAAACA	228

[0412]

[0413] [표 5]

마우스 *Alb* 인트론 1 sgRNA 서열

전체 서열	변형된 전체 서열
CACUCUUGUCUGUGGAAACAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 230)	mC*mA*mC*UCUUGUCUGUGGAAACAGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (서열번호 231)

[0414]

[0415] TracrRNA는 임의의 형태(예를 들어, 전장 tracrRNA 또는 활성 부분 tracrRNA) 및 다양한 길이일 수 있다. 이들은 1차 전사물 또는 가공된 형태를 포함할 수 있다. 예를 들어, tracrRNA(단일-가이드 RNA의 파트로서, 또는 2-분자 gRNA의 파트와 별개의 분자로서)는 야생형 tracrRNA 서열 중 모두 또는 부분(예를 들어, 야생형 tracrRNA 서열의 약 20개, 26개, 32개, 45개, 48개, 54개, 63개, 67개, 85개 이상 또는 이를 초과하는 뉴클레오티드)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. *에스. 피오게네스*로부터의 야생형 tracrRNA 서열은 171-뉴클레오티드, 89-뉴클레오티드, 75-뉴클레오티드, 및 65-뉴클레오티드 버전을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Deltcheva et al. (2011) *Nature* 471(7340):602-607]; WO 2014/093661호를 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 단일-가이드 RNA(sgRNA) 내의 tracrRNA의 예는 sgRNA의 +48, +54, +67, 및 +85 버전 내에서 발견되는 tracrRNA 세그먼트를 포함하며, 여기서, "+n"은 야생형 tracrRNA의 +n개 이하의 뉴클레오티드가 sgRNA에 포함됨을 나타낸다. US 8,697,359호를 참조하며, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0416] 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트와 표적 DNA의 상보적 가닥 사이의 상보성 백분율은 적어도 60%(예를 들어, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%)일 수 있다. DNA-표적화 세그먼트와 표적 DNA의 상보적 가닥 사이의 상보성 백분율은 약 20개 인접 뉴클레오티드에 걸쳐 적어도 60%일 수 있다. 예로서, DNA-표적화 세그먼트와 표적 DNA의 상보적 가닥 사이의 상보성 백분율은 표적 DNA의 상보적 가닥의 5' 단부에서의 약 14개 인접 뉴클레오티드에 걸쳐 적어도 100%일 수 있고 나머지에 걸쳐 0%만큼 낮을 수 있다. 이러한 경우, DNA-표적화 세그먼트는 14개 뉴클레오티드 길이인 것으로 여겨질 수 있다. 또 다른 예로, DNA-표적화 세그먼트와 표적 DNA의 상보적 가닥 사이의 상보성 백분율은 표적 DNA의 상보적 가닥의 5' 단부에서의 7개 인접 뉴클레오티드에 걸쳐 적어도 100%일 수 있고 나머지에 걸쳐 0%만큼 낮을 수 있다. 이러한 경우, DNA-표적화 세그먼트는 7개 뉴클레오티드 길이인 것으로 여겨질 수 있다. 일부 가이드 RNA에서, DNA-표적화 세그먼트 내의 적어도 17개 뉴클레오티드는 표적 DNA의 상보적 가닥에 상보적이다. 예를 들어, DNA-표적화 세그먼트는 20개 뉴클레오티드 길이일 수 있고, 표적 DNA의 상보적 가닥과 1개, 2개 또는 3개의 미스매치를 포함할 수 있다. 일례에서, 미스매치는 프로토스페이서 인접 모티프(PAM: protospacer adjacent motif) 서열에 상응하는 상보적 가닥의 영역에 인접해 있지 않다(즉, PAM 서열의 역보체)(예를 들어, 미스매치는 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트의 5' 단부에 있거나, 미스매치는 PAM 서열에 상응하는 상보적 가닥의 영역으로부터 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 또는 19개 염기쌍만큼 떨어져 있음).

[0417] gRNA의 단백질-결합 세그먼트는, 서로 상보적인 뉴클레오티드의 2개 신전부를 포함할 수 있다. 단백질-결합 세그먼트의 상보적 뉴클레오티드는 혼성화하여, 이중 가닥 RNA 듀플렉스(dsRNA)를 형성한다. 대상체 gRNA의 단백질-결합 세그먼트는 Cas 단백질과 상호작용하고, gRNA는 결합된 Cas 단백질을, DNA-표적화 세그먼트를 통해 표적 DNA 내의 특정 뉴클레오티드 서열로 안내한다.

[0418] 단일-가이드 RNA는 DNA-표적화 세그먼트 및 스캐폴드 서열(즉, 가이드 RNA의 단백질-결합 또는 Cas-결합 서열)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 가이드 RNA는 3' 스캐폴드 서열에 접합된 5' DNA-표적화 세그먼트를 가질 수 있다. 예시적인 스캐폴드 서열(예를 들어, *에스. 피오게네스* Cas9)은 GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU(버전 1; 서열번호 21); GUUGGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(버전 2; 서열번호 22); GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(버전 3; 서열번호 23); 및 GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(버전 4; 서열번호 24); GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU(버전 5; 서열번호 25); GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU(버전 6; 서열번호 26); GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU(버전 7; 서열번호 27); 또는 GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC(버전 8; 서열번

호 28)를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 가이드 sgRNA에서, 버전 6의 4개의 말단 U 잔기는 존재하지 않는다. 일부 sgRNA에서, 버전 6의 4개의 말단 U 잔기 중 단지 1개, 2개, 또는 3개가 존재한다. 본원에 개시된 임의의 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 가이드 RNA는 예를 들어, 가이드 RNA의 3' 단부 상의 임의의 예시적인 가이드 RNA 스캐폴드 서열에 융합된 가이드 RNA의 5' 단부 상에 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 즉, 본원에 개시된 임의의 DNA-표적화 세그먼트는 임의의 하나의 상기 스캐폴드 서열의 5' 단부에 접합되어, 단일 가이드 RNA(키메라 가이드 RNA)를 형성할 수 있다.

[0419] 가이드 RNA는 추가적인 바람직한 특징(예를 들어, 변형된 또는 조절된 안정성; 준세포 표적화; 형광 표지로 추적; 단백질 또는 단백질 복합체에 대한 결합 부위 등)을 제공하는 변형 또는 서열을 포함할 수 있다. 다시 말해, 가이드 RNA는 표준 A, G, C, 및 U 잔기 대신에 또는 이에 더하여 사용되는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 또는 하나 이상의 비천연 및/또는 자연 발생 성분 또는 배치를 포함할 수 있다. 이러한 변형의 예는, 예를 들어, 5' 캡(예를 들어, 7-메틸구아닐레이트 캡(m7G)); 3' 폴리아데닐화된 테일(즉, 3' 폴리(A) 테일); 리보스위치 서열(예를 들어, 단백질 및/또는 단백질 복합체에 의한 조절된 안정성 및/또는 조절된 접근성을 허용하기 위해); 안정성 제어 서열; dsRNA 듀플렉스(즉, 헤어핀)를 형성하는 서열; 서브세포 위치(예를 들어, 핵, 미토콘드리아, 엽록체 등)에 RNA를 표적화하는 변형 또는 서열; 추적을 제공하는 변형 또는 서열(예를 들어, 형광 분자에 대한 직접 접합, 형광 검출을 용이하게 하는 모이어티에 대한 접합, 형광 검출을 가능하게 하는 서열 등); 단백질(예를 들어, 전사 활성화제, 전사 억제제, DNA 메틸트랜스퍼라제, DNA 탈메틸화효소, 히스톤 아세틸트랜스퍼라제, 히스톤 탈아세틸화효소 등을 포함하는 DNA에 작용하는 단백질)에 대한 결합 부위를 제공하는 변형 또는 서열; 및 이들의 조합을 포함한다. 변형의 다른 예는 조작된 스템 루프 듀플렉스 구조, 조작된 벌지(bulge) 영역, 스템 루프 듀플렉스 구조의 조작된 헤어핀 3', 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 예를 들어, US 2015/0376586호를 참조하며, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 벌지는 crRNA-유사 영역 및 최소 tracrRNA-유사 영역으로 이루어진 듀플렉스 내의 뉴클레오티드의 홑(unpaired) 영역일 수 있다. 벌지는, 듀플렉스의 하나의 측면(side) 상에, X가 임의의 퓨린이고 Y가 반대 가닥 상의 뉴클레오티드와 워블 쌍(wobble pair)을 형성할 수 있는 뉴클레오티드일 수 있는 홑 5′-XXXY-3′, 및 듀플렉스의 다른 측면 상에 홑 뉴클레오티드 영역을 포함할 수 있다.

[0420] 가이드 RNA는 예를 들어 하기 중 하나 이상을 포함하는 변형된 뉴클레오시드 및 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다: (1) 결합 포스페이트 산소 중 하나 또는 둘 모두의 변경 또는 대체 및/또는 포스포디에스테르 백본 결합(예시적인 백본 변형)에서 포스페이트 산소의 연결 중 하나 이상의 변경 또는 대체; (2) 리보스 당 상의 2' 하이드록실의 변경 또는 대체(예시적인 당 변형)와 같은 리보스 당의 구성분의 변경 또는 대체; (3) 데포스포링커(예시적인 백본 변형)로 포스페이트 모이어티의 대체(예를 들어, 전면 대체); (4) 비표준 핵염기를 포함하는, 자연 발생 핵염기의 변형 또는 대체(예시적인 염기 변형); (5) 리보스-포스페이트 백본의 대체 또는 변형(예시적인 백본 변형); (6) 올리고뉴클레오티드의 3' 단부 또는 5' 단부의 변형(예를 들어, 말단 포스페이트기의 제거, 변형 또는 대체 또는 모이어티, 캡 또는 링커의 접합(이러한 3' 또는 5' 캡 변형은 당 및/또는 백본 변형을 포함할 수 있음); 및 (7) 당의 변형 또는 대체(예시적인 당 변형). 다른 가능한 가이드 RNA 변형은 우라실 또는 폴리-우라실 트랙트(tract)의 변형 또는 대체를 포함한다. 예를 들어, WO 2015/048577 호 및 US 2016/0237455호를 참조하며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 유사한 변형은 Cas-인코딩 핵산, 예컨대 Cas mRNA에 대해 이루어질 수 있다. 예를 들어, Cas mRNA는 동의 코돈을 사용한 우리딘의 결핍에 의해 변형될 수 있다.

[0421] 상기 나열된 이러한 호스(hose)에서의 화학적 변형은 조합되어, 2개, 3개, 4개 이상의 변형을 가질 수 있는 잔기(뉴클레오시드 및 뉴클레오티드)를 포함하는 변형된 gRNA 및/또는 mRNA를 제공할 수 있다. 예를 들어, 변형된 잔기는 변형된 당 및 변형된 핵염기를 가질 수 있다. 일례에서, gRNA의 모든 염기는 변형된다(예를 들어, 모든 염기는 변형된 포스페이트기, 예컨대 포스포로티오에이트기를 가짐). 예를 들어, gRNA의 모든 또는 실질적으로 모든 포스페이트기는 포스포로티오에이트기로 대체될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 변형된 gRNA는 5' 단부 또는 그 부근에 적어도 하나의 변형된 잔기를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 변형된 gRNA는 3' 단부 또는 그 부근에 적어도 하나의 변형된 잔기를 포함할 수 있다.

[0422] 일부 gRNA는 1개, 2개, 3개 이상의 변형된 잔기를 포함한다. 예를 들어, 변형된 gRNA 내 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%의 위치는 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드일 수 있다.

[0423] 비변형된 핵산은 분해에 취약할 수 있다. 외인성 핵산은 또한 선천적 면역 반응을 유도할 수 있다. 변형은 안

정성을 도입하고 면역원성을 감소시키는 것을 도울 수 있다. 본원에 기재된 일부 gRNA는 세포내 또는 혈청-기초 뉴클레아제에 대한 안정성을 도입하기 위해 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 본원에 기재된 일부 변형된 gRNA는 세포 집단 내로 도입될 때 감소된 내재성 면역 반응을 나타낼 수 있다.

[0424] 본원에 개시된 gRNA는, 산소 중 하나 이상을 상이한 치환기로 대체함으로써 변형되는 잔기의 포스페이트기가 변형될 수 있는 백본 변형을 포함할 수 있다. 변형은 비변형된 포스페이트 모이어티를 본원에 기재된 바와 같은 변형된 포스페이트기로 전체적으로 대체하는 것을 포함할 수 있다. 포스페이트 백본의 백본 변형은 또한, 비하전된 링커 또는 비대칭성 전하 분포를 갖는 하전된 링커를 이끄는 변경을 포함할 수 있다.

[0425] 변형된 포스페이트기의 예는 포스포로티오에이트, 포스포로셀레네이트, 보라노 포스페이트, 보라노 포스페이트 에스테르, 하이드로겐 포스포네이트, 포스포로아미데이트, 알킬 또는 아릴 포스포네이트 및 포스포트리에스테르를 포함한다. 비변형된 포스페이트기 내의 인 원자는 비카이랄이다. 그러나, 비브릿지(non-bridging) 산소 중 하나를 상기 원자 또는 원자군 중 하나로 대체하는 것은 인 원자를 카이랄로 되게 할 수 있다. 입체형성(stereogenic) 인 원자는 "R" 배치(Rp) 또는 "S" 배치(Sp)를 소유할 수 있다. 백본은 또한, 브릿지 산소(즉, 포스페이트를 뉴클레오시드에 연결하는 산소)를 질소(브릿지화된 포스포로아미데이트), 황(브릿지화된 포스포로티오에이트) 및 탄소(브릿지화된 메틸렌포스포네이트)로 대체함으로써 변형될 수 있다. 교체는 결합 산소에서 또는 결합 산소 중 둘 다에서 발생할 수 있다.

[0426] 포스페이트기는 소정의 백본 변형에서 비-인 함유 커넥터에 의해 대체될 수 있다. 일부 구현예에서, 하전된 포스페이트기는 중성 모이어티에 의해 대체될 수 있다. 포스페이트기를 대체할 수 있는 모이어티의 예는 제한 없이, 예를 들어, 메틸 포스포네이트, 하이드록실아미노, 실록산, 카르보네이트, 카르복시메틸, 카르바메이트, 아미드, 티오에테르, 에틸렌 옥사이드 링커, 설포네이트, 설폰아미드, 티오포름아세탈, 포름아세탈, 옥심, 메틸렌이미노, 메틸렌메틸이미노, 메틸렌하이드라조, 메틸렌디메틸하이드라조 및 메틸렌옥시메틸이미노를 포함할 수 있다.

[0427] 핵산을 모방할 수 있는 스캐폴드가 또한 구성될 수 있으며, 여기서 포스페이트 링커 및 리보스 당은 뉴클레아제 내성 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 대리에 의해 대체된다. 이러한 변형은 백본 및 당 변형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 핵염기는 대리물 백본에 의해 테더링(tether)될 수 있다. 예는 제한 없이, 모르폴리노, 사이클로부틸, 피롤리딘 및 펩티드 핵산(PNA) 뉴클레오시드 대리물을 포함할 수 있다.

[0428] 변형된 뉴클레오사이드 및 변형된 뉴클레오티드는 당 기에 하나 이상의 변형(당 변형)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 2' 하이드록실기(OH)는 변형(예를 들어, 다수의 상이한 옥시 또는 데옥시 치환기로 대체)될 수 있다. 2' 하이드록실기에의 변형은, 하이드록실이 더 이상 탈양성자화되어 2'-알콕사이드 이온을 형성할 수 없기 때문에 핵산의 안정성을 증강시킬 수 있다.

[0429] 2' 하이드록실기 변형의 예는 알콕시 또는 아릴옥시(OR, 여기서 "R"은 예를 들어, 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴 또는 당일 수 있음); 폴리에틸렌글리콜(PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$을 포함할 수 있으며, 여기서 R은 예를 들어, H 또는 임의로 치환된 알킬일 수 있고, n은 0 내지 20(예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 8, 0 내지 10, 0 내지 16, 1 내지 4, 1 내지 8, 1 내지 10, 1 내지 16, 1 내지 20, 2 내지 4, 2 내지 8, 2 내지 10, 2 내지 16, 2 내지 20, 4 내지 8, 4 내지 10, 4 내지 16, 및 4 내지 20)의 정수일 수 있다. 2' 하이드록실기 변형은 2'-O-Me일 수 있다. 마찬가지로, 2' 하이드록실기 변형은 2'-플루오로 변형일 수 있으며, 이는 2' 하이드록실기를 플루오라이드로 대체한다. 2' 하이드록실기 변형은 잠금 핵산(LNA)을 포함할 수 있으며, 여기서 2 하이드록실은 예를 들어, C_{1-6} 알킬렌 또는 C_{1-6} 헤테로알킬렌 브릿지에 의해 동일한 리보스 당의 4' 탄소에 연결될 수 있고, 여기서 예시적인 브릿지는 메틸렌, 프로필렌, 에테르, 또는 아미노 브릿지; O-아미노(여기서 아미노는 예를 들어, NH_2; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴아미노, 헤테로아릴아미노, 또는 디헤테로아릴아미노, 에틸렌디아민, 또는 폴리아미노일 수 있음) 및 아미노알콕시, $O(CH_2)_n$-아미노(여기서, 아미노는 예를 들어, NH_2; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴아미노, 헤테로아릴아미노, 또는 디헤테로아릴아미노, 에틸렌디아민, 또는 폴리아미노일 수 있음)를 포함할 수 있다. 2' 하이드록실기 변형은 비잠금 핵산(UNA: unlocked nucleic acid)을 포함할 수 있으며, 여기서 리보스 고리는 C2'-C3' 결합이 결여되어 있다. 2' 하이드록실기 변형은 메톡시에틸기(MOE)($OCH_2CH_2OCH_3$, 예를 들어, PEG 유도체)를 포함할 수 있다.

[0430] 데옥시 2' 변형은 수소(즉, 데옥시리보스 당, 예를 들어, 부분적으로 dsRNA의 오버행 부분에서); 할로(예를 들어, 브로모, 클로로, 플루오로, 또는 아이오도); 아미노(여기서 아미노는 예를 들어, NH2; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴아미노, 헤테로아릴아미노, 디헤테로아릴아미노, 또는 아미노산일 수 있음); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$-아미노(여기서, 아미노는 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같을 수 있음), -NHC(O)R(여기서, R은 예를 들어, 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴 또는 당일 수 있음), 시아노; 메르캅토; 알킬-티오-알킬; 티오알콕시; 및 예를 들어, 본원에 기재된 아미노로 임의로 치환될 수 있는, 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 알케닐 및 알키닐을 포함할 수 있다.

[0431] 당 변형은, 리보스에서 상응하는 탄소보다 반대되는 입체화학적 배치를 소유하는 하나 이상의 탄소를 또한 함유할 수 있는 당 기를 포함할 수 있다. 그러므로, 변형된 핵산은 예를 들어, 아라비노스를 당으로서 함유하는 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 변형된 핵산은 또한 무염기성(abasic) 당을 포함할 수 있다. 이들 무염기성 당은 또한, 구성분 당 원자 중 하나 이상에서 추가로 변형될 수 있다. 변형된 핵산은 또한, L 형태로 존재하는 하나 이상의 당을 포함할 수 있다(예를 들어, L-뉴클레오시드).

[0432] 변형된 핵산 내로 혼입될 수 있는 본원에 기재된 변형된 뉴클레오시드 및 변형된 뉴클레오티드는 핵염기라고도 하는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 핵염기의 예는 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C), 및 우라실(U)을 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 이들 핵염기는, 변형된 핵산 내로 혼입될 수 있는 변형된 잔기를 제공하기 위해 변형되거나 전체적으로 대체될 수 있다. 뉴클레오티드의 핵염기는 독립적으로, 퓨린, 피리미딘, 퓨린 유사체, 또는 피리미딘 유사체로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵염기는 예를 들어, 염기의 자연-발생 및 합성 유도체를 포함할 수 있다.

[0433] 이중 가이드 RNA에서, 각각의 crRNA 및 tracrRNA는 변형을 함유할 수 있다. 이러한 변형은 crRNA 및/또는 tracrRNA의 하나의 말단 또는 말단 둘 다에 존재할 수 있다. sgRNA에서, sgRNA의 하나의 말단 또는 말단 둘 다에서의 하나 이상의 잔기가 화학적으로 변형될 수 있고/있거나 내부 뉴클레오시드가 변형될 수 있고/있거나 전체 sgRNA가 화학적으로 변형될 수 있다. 일부 gRNA는 5' 단부 변형을 포함한다. 일부 gRNA는 3' 단부 변형을 포함한다.

[0434] 본원에 개시된 가이드 RNA는 WO 2018/107028 A1호에 개시된 변형 패턴 중 하나를 포함할 수 있으며, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 본원에 개시된 가이드 RNA는 US 2017/0114334호에 개시된 구조/변형 패턴 중 하나를 포함할 수 있으며, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 본원에 개시된 가이드 RNA는 WO 2017/136794호, WO 2017/004279호, US 2018/0187186호, 또는 US 2019/0048338호에 개시된 구조/변형 패턴 중 하나를 포함할 수 있으며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0435] 일례로, 가이드 RNA의 5' 또는 3' 단부에서의 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 연결부를 포함할 수 있다(예를 들어, 염기는, 포스포로티오에이트기인 변형된 포스페이트기를 가질 수 있음). 예를 들어, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 5' 및/또는 3' 단부의 2개, 3개, 또는 4개 말단 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 연결부를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, 가이드 RNA의 5' 및/또는 3' 단부에서의 뉴클레오티드는 2'-O-메틸 변형을 가질 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 5' 및/또는 3' 단부(예를 들어, 5' 단부)의 2개, 3개, 또는 4개 말단 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, WO 2017/173054 A1호 및 문헌 [Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22(9):2227-2235]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 다른 가능한 변형은 본원 어디에서나 더욱 상세히 기재되어 있다. 구체적인 예에서, 가이드 RNA는 처음 3개 5' 및 3' 말단 RNA 잔기에 2'-O-메틸 유사체 및 3' 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결부를 포함한다. 이러한 화학적 변형은 예를 들어, 엑소뉴클레아제로부터 가이드 RNA에 대한 더 큰 안정성 및 보호를 제공하여, 이들이 비변형된 가이드 RNA보다 더 오랫동안 세포 내에서 지속되게 할 수 있다. 이러한 화학적 변형은 또한 예를 들어, RNA를 적극적으로 분해할 수 있는 선천적 세포내 면역 반응으로부터 보호하거나, 세포 사멸을 유발하는 면역 캐스케이드를 촉발할 수 있다.

[0436] 일례로, 본원에 기재된 임의의 가이드 RNA는 적어도 하나의 변형을 포함할 수 있다. 일례에서, 적어도 하나의 변형은 2'-O-메틸(2'-O-Me) 변형된 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 사이에서의 포스포로티오에이트(PS) 결합, 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오티드, 또는 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, 적어도 하나의 변형은 2'-O-메틸(2'-O-Me) 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 적어도 하나의 변형은 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트(PS) 결합을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 적어도 하나의 변형은 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일례에서, 본원에 기재된 가이드 RNA는 하나

이상의 2'-O-메틸(2'-O-Me) 변형된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 사이에서의 하나 이상의 포스포로티오에이트(PS) 결합을 포함한다.

[0437] 변형은 가이드 RNA에서 어디에서나 발생할 수 있다. 일례로, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 5' 단부에서의 처음 5개 뉴클레오티드 중 하나 이상에 변형을 포함하거나, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 3' 단부에서의 마지막 5개 뉴클레오티드 중 하나 이상에 변형을 포함하거나, 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합, 가이드 RNA의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 결합, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 5' 단부에서의 처음 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-Me 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있거나, 가이드 RNA의 3' 단부에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드에 2'-O-Me 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있거나, 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0438] 일례에서, 변형된 gRNA는 다음의 서열: mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU(서열번호 29)을 포함할 수 있으며, 여기서 "N"은 임의의 자연 또는 비자연 뉴클레오티드이다. 예를 들어, N 잔기의 전체는 본원에 기재된 바와 같은 인간 *ALB* 인트론 1 DNA-표적화 세그먼트를 포함한다(예를 들어, 서열번호 29에 기재된 서열, 여기서 N 잔기는 서열번호 30 내지 서열번호 61 중 임의의 하나의 DNA-표적화 세그먼트, 서열번호 36, 30, 33, 및 41 중 임의의 하나의 DNA-표적화 세그먼트, 또는 서열번호 36의 DNA-표적화 세그먼트로 대체됨). 예를 들어, 변형된 gRNA는 서열번호 94 내지 서열 125 중 임의의 하나에 기재된 서열, 서열번호 100, 94, 97, 및 105 중 임의의 하나에 기재된 서열, 또는 표 3에 서열번호 100에 기재된 서열을 포함할 수 있다. 용어 "mA," "mC," "mU," 및 "mG"는 2'-O-Me로 변형되었던 뉴클레오티드(각각 A, C, U, 및 G)를 의미한다. 부호 "*"는 포스포로티오에이트 변형을 도시한다. 포스포로티오에이트 연결부 또는 결합은, 황이 포스포디에스테르 연결부에서, 예를 들어 뉴클레오티드 염기 사이의 결합에서 하나의 비브릿지 포스페이트 산소에 대해 치환되는 결합을 지칭한다. 포스포로티오에이트가 올리고뉴클레오티드를 생산하는 데 사용될 때, 변형된 올리고뉴클레오티드는 또한 S-올리고로 지칭될 수 있다. 용어 A*, C*, U*, 또는 G*는 포스포로티오에이트 결합으로 다음(예를 들어, 3') 뉴클레오티드에 연결되는 뉴클레오티드를 의미한다. 용어 "mA*," "mC*," "mU*," 및 "mG*"는 2'-O-Me로 치환되었고 포스포로티오에이트 결합으로 다음(예를 들어, 3') 뉴클레오티드에 연결되는 뉴클레오티드(각각 A, C, U, 및 G)를 의미한다.

[0439] 뉴클레오티드 당 고리에 영향을 미치는 것으로 나타난 또 다른 화학적 변형은 할로겐 치환이다. 예를 들어, 뉴클레오티드 당 고리 상에서의 2'-플루오로(2'-F) 치환은 올리고뉴클레오티드 결합 친화도 및 뉴클레아제 안정성을 증가시킬 수 있다. 무염기성 뉴클레오티드는 질소형성 염기가 결여된 것을 지칭한다. 역전된 염기는 정상적인 5'로부터 3' 연결부로부터 역전된 연결부(즉, 5'로부터 5' 연결부 또는 3'로부터 3' 연결부)를 갖는 것을 지칭한다.

[0440] 무염기성 뉴클레오티드는 역위 연결부와 부착될 수 있다. 예를 들어, 무염기성 뉴클레오티드는 5'로부터 5' 연결부를 통해 말단 5' 뉴클레오티드에 부착될 수 있거나, 무염기성 뉴클레오티드는 3'로부터 3' 연결부를 통해 말단 3' 뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 말단 5' 또는 3' 뉴클레오티드에서의 역전된 무염기성 뉴클레오티드는 역전된 무염기성 단부 캡이라고도 할 수 있다.

[0441] 일례에서, 5' 말단에서 처음 3개, 4개, 또는 5개의 뉴클레오티드 중 하나 이상, 및 3' 말단에서 마지막 3개, 4개, 또는 5개의 뉴클레오티드 중 하나 이상은 변형된다. 변형은 예를 들어, 2'-O-Me, 2'-F, 역전된 무염기성 뉴클레오티드, 포스포로티오에이트 결합, 또는 안정성 및/또는 성능을 증가시키는 것으로 널리 공지된 다른 뉴클레오티드 변형일 수 있다.

[0442] 또 다른 예에서, 5' 말단에서의 처음 4개 뉴클레오티드, 및 3' 말단에서의 마지막 4개 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 결합으로 연결될 수 있다.

[0443] 또 다른 예에서, 5' 말단에서의 처음 3개 뉴클레오티드, 및 3' 말단에서의 마지막 3개 뉴클레오티드는 2'-O-메틸(2'-O-Me) 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 5' 말단에서의 처음 3개 뉴클레오티드, 및 3' 말단에서의 마지막 3개 뉴클레오티드는 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 예에서, 5' 말단에서의 처음 3개 뉴클레오티드, 및 3' 말단에서의 마지막 3개 뉴클레오티드는 역전된 무염기성 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0444] 가이드 RNA는 임의의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, gRNA는 2개의 분자(별개의 crRNA 및 tracrRNA)로서

또는 1개의 분자(sgRNA)로서 RNA의 형태로, 그리고 임의로 Cas 단백질과의 복합체의 형태로 제공될 수 있다. gRNA는 또한 gRNA를 인코딩하는 DNA의 형태로 제공될 수 있다. gRNA를 인코딩하는 DNA는 단일 RNA 분자(sgRNA) 또는 별개의 RNA 분자(예를 들어, 별개의 crRNA 및 tracrRNA)를 인코딩할 수 있다. 후자의 경우, gRNA를 인코딩하는 DNA는 1개의 DNA 분자로서 또는 crRNA 및 tracrRNA를 각각 인코딩하는 별개의 DNA 분자로서 제공될 수 있다.

[0445] gRNA가 DNA 형태로 제공될 때, gRNA는 세포에서 일시적으로, 조건적으로, 또는 구성적으로 발현될 수 있다. gRNA를 인코딩하는 DNA는 세포의 게놈 내로 안정하게 통합되고 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 대안적으로, gRNA를 인코딩하는 DNA는 발현 구조체에서 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, gRNA를 인코딩하는 DNA는 이종성 핵산, 예컨대 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터에 존재할 수 있다. 대안적으로, 이는, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로부터 별개인 벡터 또는 플라스미드에 존재할 수 있다. 이러한 발현 구조체에 사용될 수 있는 프로모터는 예를 들어, 진핵 세포, 인간 세포, 비인간 세포, 포유류 세포, 비인간 포유류 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 만능성 세포, 배아 줄기(ES)세포, 성인 줄기세포, 발달 제약 전구 세포, 유도 만능성 줄기(iPS)세포, 또는 1-세포 단계 배아 중 하나 이상에서 활성인 프로모터를 포함한다. 이러한 프로모터는 예를 들어, 조건적 프로모터, 유도적 프로모터, 구성적 프로모터, 또는 조직-특이적 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터는 또한 예를 들어, 양방향 프로모터일 수 있다. 적합한 프로모터의 구체적인 예는 RNA 폴리머라제 III 프로모터, 예컨대 인간 U6 프로모터, 래트 U6 폴리머라제 III 프로모터, 또는 마우스 U6 폴리머라제 III 프로모터를 포함한다.

[0446] 대안적으로, gRNA는 다양한 다른 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, gRNA는 예를 들어, T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, WO 2014/089290호 및 WO 2014/065596호를 참조하며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다). 가이드 RNA는 또한, 화학적 합성에 의해 제조된 합성적으로 생성된 분자일 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA는 처음 3개 5' 및 3' 말단 RNA 잔기에 2'-O-메틸 유사체 및 3' 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결부를 포함하도록 화학적으로 합성될 수 있다.

[0447] 가이드 RNA(또는 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산)는 하나 이상의 가이드 RNA(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개 이상의 가이드 RNA) 및 가이드 RNA의 안정성을 증가시키는(예를 들어, 주어진 저장 조건(예를 들어, -20℃, 4℃ 또는 주위 온도) 하에서 분해 생성물이 역치 미만에, 예컨대 출발 핵산 또는 단백질의 0.5중량% 미만에서 유지되는 기간을 연장시키거나; 생체내에서의 안정성을 증가시키는) 담체를 포함하는 조성물에 존재할 수 있다. 이러한 담체의 비제한적인 예는 폴리(락트산)(PLA) 미소구체, 폴리(D,L-락틱-코글리콜-산)(PLGA) 미소구체, 리포솜, 미셀, 인버스 미셀, 지질 코킬레에이트, 및 지질 미세소관을 포함한다. 이러한 조성물은 Cas 단백질, 예컨대 Cas9 단백질, 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 추가로 포함할 수 있다.

[0448] 일례로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 62 내지 서열번호 125 중 임의의 하나에 기재된 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 62 내지 서열번호 125 중 임의의 하나에 기재된 DNA-표적화 세그먼트와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 62 내지 서열번호 125 중 임의의 하나에 기재된 DNA-표적화 세그먼트와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 62 내지 서열번호 125 중 임의의 하나에 기재된 서열과 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0449] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, 및 105 중 임의의 하나에 기재된 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, 및 105 중 임의의 하나에 기재된 DNA-표적화 세그먼트와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, 및 105 중 임의

의 하나에 기재된 DNA-표적화 세그먼트와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, 및 105 중 임의의 하나에 기재된 서열과 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0450] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100에 기재된 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100에 기재된 DNA-표적화 세그먼트와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100에 기재된 DNA-표적화 세그먼트와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 68 또는 서열번호 100에 기재된 서열과 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0451] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94에 기재된 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94에 기재된 DNA-표적화 세그먼트와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94에 기재된 DNA-표적화 세그먼트와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 62 또는 서열번호 94에 기재된 서열과 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0452] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97에 기재된 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97에 기재된 DNA-표적화 세그먼트와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97에 기재된 DNA-표적화 세그먼트와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 65 또는 서열번호 97에 기재된 서열과 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0453] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105에 기재된 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105에 기재된 DNA-표적화 세그먼트와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105에 기재된 DNA-표적화 세그먼트와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 73 또는 서열번호 105에 기재된 서열과 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 뉴클레오티드만큼 상이한 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다.

[0454] *(4) 가이드 RNA 표적 서열*

[0455] 가이드 RNA에 대한 표적 DNA는 결합에 대해 충분한 조건이 존재한다면 gRNA의 DNA-표적화 세그먼트가 결합할 DNA에 존재하는 핵산 서열을 포함한다. 적합한 DNA/RNA 결합 조건은 세포에 정상적으로 존재하는 생리학적 조건을 포함한다. 다른 적합한 DNA/RNA 결합 조건(예를 들어, 세포-무함유 시스템에서의 조건)은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook 등, Harbor Laboratory Press 2001)]을 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함됨). gRNA에 상보적이고 이와 혼성화하는 표적 DNA의 가닥은 "상보적 가닥"이라고 할 수 있으며, "상보적 가닥"에 상보적인(따라서 Cas 단백질 또는 gRNA에 상보적이지 않은) 표적 DNA의 가닥은 "비상보적 가닥" 또는 "주형 가닥"이라고 할 수 있다.

[0456] 표적 DNA는, 가이드 RNA가 혼성화하는 상보적 가닥 상의 서열과, 비-상보적 가닥 상의 상응하는 서열(예를 들어, 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)에 인접함) 둘 다 포함한다. 본원에 사용된 용어 "가이드 RNA 표적 서열"은 구체적으로, 가이드 RNA가 상보적 가닥 상에서 혼성화하는 서열에 상응하는 비-상보적 가닥 상의 서열(즉, 이의 역보체)을 지칭한다. 다시 말해, 가이드 RNA 표적 서열은 PAM에 인접한 비-상보적 가닥 상의 서열을 지칭한다(예를 들어, Cas9의 경우 PAM의 상류 또는 5'). 가이드 RNA 표적 서열은 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트에 동등하지만, 우라실 대신에 티민을 갖는다. 일례로, SpCas9 효소에 대한 가이드 RNA 표적 서열은 비-상보적 가닥 상의 5'-NGG-3' PAM의 상류 서열을 지칭할 수 있다. 가이드 RNA는 표적 DNA의 상보적 가닥에 대해 상보성을 갖도록 설계되며, 여기서 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트와 표적 DNA의 상보적 가닥 사이의 혼성화는 CRISPR 복합체의 형성을 촉진한다. 혼성화를 야기하고 CRISPR 복합체의 형성을 촉진하기에 충분한 상보성이 존재한다면, 완전 상보성이 본질적으로 필요한 것은 아니다. 가이드 RNA가 본원에서 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 것으로 지칭된다면, 의미하는 것은, 상기 가이드 RNA가, 비-상보적 가닥 상의 가이드 RNA 표적 서열의 역보체인 표적 DNA의 상보적 가닥 서열에 혼성화한다는 것이다.

[0457] 표적 DNA 또는 가이드 RNA 표적 서열은 임의의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 세포의 핵 또는 세포질에 또는 세포의 세포소기관, 예컨대 미토콘드리아 또는 엽록체 내에 위치할 수 있다. 표적 DNA 또는 가이드 RNA 표적 서열은 세포에 대해 내인성 또는 외인성인 임의의 핵산 서열일 수 있다. 가이드 RNA 표적 서열은 유전자 생성물(예를 들어, 단백질)을 코딩하는 서열 또는 비-코딩 서열(예를 들어, 조절 서열)일 수 있거나, 둘 다 포함할 수 있다.

[0458] Cas 단백질에 의한 표적 DNA의 부위-안내 결합 및 절단은 (i) 가이드 RNA와 표적 DNA의 상보적 가닥 사이의 염기쌍-형성 상보성, 및 (ii) 표적 DNA의 비-상보적 가닥에서 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)라고 하는 짧은 모티프 둘 다에 의해 결정된 위치에서 발생할 수 있다. PAM은 가이드 RNA 표적 서열을 플랭킹할 수 있다. 임의로, 가이드 RNA 표적 서열은 3' 단부에서 PAM에 의해 플랭킹될 수 있다(예를 들어, Cas9의 경우). 대안적으로, 가이드 RNA 표적 서열은 5' 단부에서 PAM에 의해 플랭킹될 수 있다(예를 들어, Cpf1의 경우). 예를 들어, Cas 단백질의 절단 부위는 PAM 서열(예를 들어, 가이드 RNA 표적 서열 내)의 약 1 내지 약 10개, 또는 약 2 내지 약 5개 염기쌍(예를 들어, 3개 염기쌍)일 수 있다. SpCas9의 경우, PAM 서열(즉, 비-상보적 가닥 상)은 5'-N_1GG-3'일 수 있으며, 여기서, N_1은 임의의 DNA 뉴클레오티드이며, PAM은 표적 DNA의 비-상보적 가닥 상의 가이드 RNA 표적 서열의 즉시(immediately) 3'이다. 이와 같이, 상보적 가닥(즉, 역보체) 상의 PAM에 상응하는 서열은 5'-CCN_2-3'일 것이며, 여기서, N_2는 임의의 DNA 뉴클레오티드이며 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트가 표적 DNA의 상보적 가닥 상에서 혼성화하는 서열의 즉시 5'이다. 일부 이러한 경우, N_1 및 N_2는 상보적일 수 있고, N_1 내지 N_2 염기쌍은 임의의 염기쌍일 수 있다(예를 들어, N_1=C 및 N_2=G; N_1=G 및 N_2=C; N_1=A 및 N_2=T; 또는 N_1=T, 및 N_2=A). *에스. 아우레우스*로부터의 Cas9의 경우, PAM은 NNGRRT 또는 NNGRR일 수 있으며, 여기서 N은 A, G, C, 또는 T일 수 있고, R은 G 또는 A일 수 있다. *씨. 제주니*로부터의 Cas9의 경우, PAM은 예를 들어, NNNNACAC 또는 NNNNRYAC일 수 있으며, 여기서 N은 A, G, C, 또는 T일 수 있고, R은 G 또는 A일 수 있다. 일부 경우에(예를 들어, FnCpf1의 경우), PAM 서열은 5' 단부의 상류일 수 있고, 서열 5'-TTN-3'을 갖는다. DpbCasX의 경우, PAM은 서열 5'-TTCN-3'을 가질 수 있다. CasΦ의 경우, PAM은 서열 5'-TBN-3'을 가질 수 있으며, 여기서 B는 G, T, 또는 C이다.

[0459] 가이드 RNA 표적 서열의 일례는, SpCas9 단백질에 의해 인식되는 NGG 모티프 바로 앞의 20-뉴클레오티드 DNA 서열이다. 예를 들어, 가이드 RNA 표적 서열 + PAM의 2개 예는 GN_{19}NGG(서열번호 5) 또는 N_{20}NGG(서열번호 6)이다. 예를 들어, WO 2014/165825호를 참조하며, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된

다. 5' 단부에서의 구아닌은 세포에서 RNA 폴리머라제에 의한 전사를 용이하게 할 수 있다. 가이드 RNA 표적 서열 + PAM의 다른 예는 시험관내에서 T7 폴리머라제에 의한 효율적인 전사를 용이하게 하기 위해 5' 단부에 2개의 구아닌 뉴클레오티드(예를 들어, $GGN_{20}NGG$; 서열번호 27)를 포함할 수 있다. 예를 들어, WO 2014/065596 호를 참조하며, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 다른 가이드 RNA 표적 서열 + PAM은, 5' G 또는 GG 및 3' GG 또는 NGG를 포함하여 서열번호 5 내지 서열번호 7의 4개 내지 22개 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 더욱 다른 가이드 RNA 표적 서열 + PAM은 서열번호 5 내지 서열번호 7의 14개 내지 20개 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다.

[0460] 표적 DNA에 혼성화된 CRISPR 복합체의 형성은 가이드 RNA 표적 서열에 상응하는 영역 내에서 또는 그 부근에서 표적 DNA의 하나의 가닥 또는 양쪽 가닥의 절단을 초래할 수 있다(즉, 표적 DNA의 비-상보적 가닥 상의 가이드 RNA 표적 서열, 및 가이드 RNA가 혼성화하는 상보적 가닥 상의 역보체). 예를 들어, 절단 부위는 가이드 RNA 표적 서열 내에 있을 수 있다(예를 들어, PAM 서열에 비해 정의된 위치에서). "절단 부위"는, Cas 단백질이 단일 가닥 절단부 또는 이중 가닥 절단부를 생성하는 표적 DNA의 위치를 포함한다. 절단 부위는 이중 가닥 DNA 중 단지 하나의 가닥 상에 존재할 수 있거나(예를 들어, 닉카제가 사용될 때) 또는 2개 가닥 모두 상에 존재할 수 있다. 절단 부위는 2개 가닥 모두 상의 동일한 위치에 있거나(평활 말단을 생성함; 예를 들어 Cas9)), 각각의 가닥 상의 상이한 부위에 있을 수 있다(엇갈린 말단(즉, 오버행)을 생성함); 예를 들어 Cpf1). 엇갈린 말단은 예를 들어, 각각이 상이한 가닥 상의 상이한 절단 부위에서 단일 가닥 절단부를 생성하여 이중 가닥 절단부를 생성하는 2개의 Cas 단백질을 사용함으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, 제1 닉카제는 이중 가닥 DNA(dsDNA)의 제1 가닥 상에 단일 가닥 절단부를 생성할 수 있고, 제2 닉카제는 오버행 서열이 생성되도록 dsDNA의 제2 가닥 상에 단일 가닥 절단부를 생성할 수 있다. 일부 경우, 제1 가닥 상의 가이드 RNA 표적 서열 또는 닉카제의 절단 부위는 제2 가닥 상의 가이드 RNA 표적 서열 또는 닉카제의 절단 부위로부터 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 40개, 50개, 75개, 100개, 250개, 500개, 또는 1,000개 염기쌍만큼 분리된다.

[0461] 가이드 RNA 표적 서열은 또한, 표적-외 변형을 최소화하거나 표적-외 효과를 피하기 위해 선택될 수 있다(예를 들어, 표적-외 게놈 서열에 대해 2개 이하의 미스매치를 피함으로써).

[0462] 일례로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 126 내지 서열번호 157 중 임의의 하나에 기재된 가이드 RNA 표적 서열을 표적화할 수 있다. 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 126 내지 서열번호 157 중 임의의 하나에 기재된 가이드 RNA 표적 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드를 표적화할 수 있다.

[0463] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 132, 126, 129, 및 137 중 임의의 하나에 기재된 가이드 RNA 표적 서열을 표적화할 수 있다. 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 132, 126, 129, 및 137 중 임의의 하나에 기재된 가이드 RNA 표적 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드를 표적화할 수 있다.

[0464] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 132에 기재된 가이드 RNA 표적 서열을 표적화할 수 있다. 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 132에 기재된 가이드 RNA 표적 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드를 표적화할 수 있다.

[0465] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 126에 기재된 가이드 RNA 표적 서열을 표적화할 수 있다. 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 126에 기재된 가이드 RNA 표적 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드를 표적화할 수 있다.

[0466] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 129에 기재된 가이드 RNA 표적 서열을 표적화할 수 있다. 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 129에 기재된 가이드 RNA 표적 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드를 표적화할 수 있다.

[0467] 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 137에 기재된 가이드 RNA 표적 서열을 표적화할 수 있다. 또 다른 예로, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1을 표적화하는 가이드 RNA는 서열번호 137에 기재된 가이드 RNA 표적 서열의 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 인접 뉴클

레오티드를 표적화할 수 있다.

[0468] [표 6]

인간 *ALB* 인트론 1 가이드 RNA 표적 서열

가이드 RNA 표적 서열	서열번호
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
ACCTTTTTTTTTTTTTACCT	151
AGTGCAATGGATAGGTCTTT	152
TGATTCCTACAGAAAAACTC	153
TGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	154
CCTCACTCTTGTCTGGGCAA	155
ACCTCACTCTTGTCTGGGCA	156
TGAGCAACCTCACTCTTGTC	157

[0469]

[0470] [표 7]

마우스 *Alb* 인트론 1 가이드 RNA 표적 서열

가이드 RNA 표적 서열	서열번호
CACTCTTGTCTGTGGAAACA	229

[0471]

[0472] ***(5) 뉴클레아제 작용제를 포함하는 지질 나노입자***

[0473] 뉴클레아제 작용제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)를 포함하는 지질 나노입자가 또한 제공된다. 지질 나노입자는 대안적으로 또는 추가적으로 본원에 개시된 바와 같은 *F9* 핵산 구조체를 포함한다. 예를 들어, 지질 나노입자는 뉴클레아제 작용제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)를 포함할 수 있거나, 뉴클레아제 작용제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템) 및 *F9* 핵산 구조체 둘 모두를 포함할 수 있다. CRISPR/Cas 시스템에 관하여, 지질 나노입자는 임의의 형태(예를 들어, 단백질, DNA, 또는 mRNA)에서 Cas 단백질을 포함할 수 있고/있거나 임의의 형태(예를 들어, DNA 또는 RNA)에서 가이드 RNA(들)를 포함할 수 있다. 일례에서, 지질 나노입자는 mRNA(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 변형된 RNA)의 형태로 Cas 단백질 및 RNA(예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 변형된 가이드 RNA)의 형태로 가이드 RNA(들)를 포함한다. 또 다른 예로, 지질 나노입자는 단백질의 형태로 Cas 단백질 및 RNA의 형태로 가이드 RNA(들)를 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, 가이드 RNA 및 Cas 단백질은 각각 동일한 LNP에서 LNP-매개 전달을 통해 RNA 형태로 도입된다. 본원 어디에서나 더 상세히 논의되는 바와 같이, RNA 중 하나 이상이 변형될 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA는 5' 단부 및/또는 3' 단부에서 하나 이상의 안정화 단부 변형을 포함하도록 변형될 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 5' 단부 및/또는 3' 단부에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결부 또는 5' 단부 및/또는 3' 단부에서 하나 이상의 2'-O-메틸 변형을 포함할 수 있다. 또 다른 예로, Cas mRNA 변형은 슈도우리딘으로 치환(예를 들어, 슈도우리딘으로 완전히 치환됨), 5' 캡, 및 폴리아데닐화를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, Cas mRNA 변형은 N1-메틸-슈도우리딘으로 치환(예를 들어, N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환됨), 5' 캡, 및 폴리아데닐화를 포함할 수 있다. 다른 변형이 또한 본원의 다른 곳에 개시된 바와 같이 고려된다. 이러한 방법을 통한 전달은 일시적인 Cas 발현 및/또는 가이드 RNA의 일시적인 존재를 초래할 수 있고, 생분해성 지질은 청소율(clearance)을 향상시키며, 내약성

(tolerability)을 향상시키고, 면역원성을 저하시킨다. 지질 제형은 생물학적 분자의 세포 흡수를 향상시키는 한편, 이들 분자를 분해로부터 보호할 수 있다. 지질 나노입자는 분자간 힘에 의해 서로 물리적으로 관련되어 있는 복수의 지질 분자를 포함하는 입자이다. 이들은 미소구체(유니라멜라(unilamellar) 및 멀티라멜라(multilamella) 소낭, 예를 들어, 리포솜을 포함함), 에멀젼 중 분산상, 미셀, 또는 현탁액 중 내부상(internal pahse)을 포함한다. 이러한 지질 나노입자는 전달을 위해 하나 이상의 핵산 또는 단백질을 캡슐화하는 데 사용될 수 있다. 양이온성 지질을 함유하는 제형은 다가음이온(polyanion), 예컨대, 핵산을 전달하는 데 유용하다. 포함될 수 있는 다른 지질은 중성 지질(즉, 비하전된 또는 쌍성이온성(zwitterionic) 지질), 음이온성 지질, 형질주입을 증강시키는 헬퍼 지질, 및 나노입자가 생체내에서 존재할 수 있는 시간의 길이를 증가시키는 스텔스 지질이다. 적합한 양이온성 지질, 중성 지질, 음이온성 지질, 헬퍼 지질, 및 스텔스 지질의 예는 예를 들어, WO 2016/010840 A1호 및 WO 2017/173054 A1호에서 찾을 수 있으며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 예시적인 지질 나노입자는 양이온성 지질 및 하나 이상의 다른 성분을 포함할 수 있다. 일례에서, 다른 성분은 헬퍼 지질, 예컨대, 콜레스테롤을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 다른 성분은 헬퍼 지질, 예컨대, 콜레스테롤 및 중성 지질, 예컨대, DSPC를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 다른 성분은 헬퍼 지질, 예컨대, 콜레스테롤, 선택적인 중성 지질, 예컨대, DSPC, 및 스텔스 지질, 예컨대, S010, S024, S027, S031, 또는 S033을 포함할 수 있다.

[0474] LNP는 하기 중 하나 이상 또는 전부를 함유할 수 있다: (i) 캡슐화 및 엔도좀 탈출을 위한 지질; (ii) 안정화를 위한 중성 지질; (iii) 안정화를 위한 헬퍼 지질; 및 (iv) 스텔스 지질. 예를 들어, 문헌[Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22(9):2227-2235] 및 WO 2017/173054 A1호를 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 소정의 LNP에서, 카고는 가이드 RNA, 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 소정의 LNP에서, 카고는 Cas 뉴클레아제, 예컨대, Cas9를 인코딩하는 mRNA, 및 가이드 RNA, 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 소정의 LNP에서, 카고는 본원 어디에서나 기재된 바와 같은 *F9* 핵산 구조체를 포함할 수 있다. 소정의 LNP에서, 카고는 Cas 뉴클레아제, 예컨대 Cas9를 인코딩하는 mRNA, 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산, 및 *F9* 핵산 구조체를 포함할 수 있다. 일부 LNP에서, 지질 성분은 생분해성, 이온화 가능한 지질과 같은 아민 지질을 포함한다. 일부 경우에, 지질 성분은 생분해성, 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG-DMG를 포함한다. 예를 들어, Cas9 mRNA 및 gRNA는 이온화 가능한 지질 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z, 12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트)라고도 하는 ((9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데칸-9,12-디에노에이트, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 제형을 사용하여 세포 및 동물에게 전달될 수 있다.

[0475] 일부 예에서, LNP는 양이온성 지질을 포함한다. 일부 예에서, LNP는 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트)라고도 하는 (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트 또는 또 다른 이온화 가능한 지질을 포함할 수 있다. 예를 들어, WO 2019/067992호, WO 2017/173054호 및 WO 2014/136086호를 참조하며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 일부 예에서, LNP는 약 4.5, 약 5.0, 약 5.5, 약 6.0, 또는 약 6.5의 양이온성 지질 아민 대 RNA 포스페이트(N:P)의 몰비를 포함한다. 일부 예에서, LNP 지질의 맥락에서 용어 양이온성 및 이온화 가능한은 상호 교환 가능하다(예를 들어, 여기서 이온화 가능한 지질은 pH에 따라 양이온성임).

[0476] 캡슐화 및 엔도솜 탈출을 위한 지질은 양이온성 지질일 수 있다. 지질은 또한, 생분해성 지질, 예컨대, 생분해성 이온화 가능한 지질일 수 있다. 적합한 지질의 일례는 지질 A 또는 LP01이며, 이는 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트라고도 하는 (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트이다. 예를 들어, 문헌[Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22(9):2227-2235] 및 WO 2017/173054 A1호를 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 적합한 지질의 또 다른 예는 지질 B이며, 이는 ((5-((디메틸아미노)메틸)-1,3-페닐렌)비스(옥시))비스(옥탄-8,1-디일)비스(데카노에이트)라고도 하는 ((5-((디메틸아미노)메틸)-1,3-페닐렌)비스(옥시))비스(옥탄-8,1-디일)비스(데카노에이트)이다. 적합한 지질의 또 다른 예는 지질 C이며, 이는 2-((4-(((3-(디메틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)헥사데카노일)옥시)프로판-1,3-디일(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-비스(옥타데카-9,12-디에노에이트)이다. 적합한 지질의 또 다른 예는 지질 D이며, 이는 3-(((3-(디메틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)-13-(옥타노일옥시)트리데실 3-옥틸운데카노에이트이다. 다른 적합한 지질은 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트([(6*Z*,9*Z*,28*Z*,31*Z*)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일] 4-

(디메틸아미노)부타노에이트 또는 Dlin-MC3-DMA(MC3))로도 알려져 있음)를 포함한다.

[0477] 본원에 기재된 LNP에서 사용하기에 적합한 일부 이러한 지질은 생체내에서 생분해성이다. 예를 들어, 이러한 지질을 포함하는 LNP는 적어도 75%의 지질이 8시간, 10시간, 12시간, 24시간 또는 48시간, 또는 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 10일 내에 혈장으로부터 청소되는 것을 포함한다. 또 다른 예로, 적어도 50%의 LNP는 8시간, 10시간, 12시간, 24시간 또는 48시간, 또는 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 10일 내에 혈장으로부터 청소된다.

[0478] 이러한 지질은 그들이 들어있는 배지의 pH에 따라 이온화 가능할 수 있다. 예를 들어, 약간 산성 배지에서 지질이 양성자화될 수 있고, 따라서 양전하를 가질 수 있다. 대조적으로, 예를 들어, pH가 대략 7.35인 혈액과 같은 약간의 염기성 배지에서, 지질은 양성화되지 않으므로 전하를 보유하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 지질은 적어도 약 9, 9.5, 또는 10의 pH에서 양성자화될 수 있다. 전하를 보유하는 이러한 지질의 능력은 이의 내재성 pKa와 관련이 있다. 예를 들어, 지질은 독립적으로, 약 5.8 내지 약 6.2 범위의 pKa를 가질 수 있다.

[0479] 중성 지질은 LNP의 가공을 안정화시키고 향상시키는 작용을 한다. 적합한 중성 지질의 예는 여러 가지 중성, 비하전된 또는 쌍성이온성 지질을 포함한다. 본 개시내용에 사용하기에 적합한 중성 인지질의 예는 5- 헵타데실벤젠-1,3-디올(레조르시놀), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디스테아로일포스파티딜콜린 또는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 포스포콜린(DOPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 포스파티딜콜린(PLPC), 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DAPC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 달걀 포스파티딜콜린(EPC), 디라우릴로일포스파티딜콜린(DLPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 1-미리스토일-2-팔미토일 포스파티딜콜린(MPPC), 1-팔미토일-2-미리스토일 포스파티딜콜린(PMPC), 1-팔미토일-2-스테아로일 포스파티딜콜린(PSPC), 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DBPC), 1-스테아로일-2-팔미토일 포스파티딜콜린(SPPC), 1,2-디에이코세노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DEPC), 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린(POPC), 리소포스파티딜콜린, 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(DOPE), 디리놀레오일포스파티딜콜린 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(DSPE), 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민(DMPE), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민(DPPE), 팔미토일올레오일 포스파티딜에탄올아민(POPE), 리소포스파티딜에탄올아민, 1-스테아로일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(SOPC), 및 이들의 조합을 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 예를 들어, 중성 인지질은 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC) 및 디미리스토일 포스파티딜 에탄올아민(DMPE)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0480] 헬퍼 지질은 형질주입을 증강시키는 지질을 포함한다. 헬퍼 지질이 형질주입을 증강시키는 기전은 입자 안정성을 증강시키는 단계를 포함할 수 있다. 소정의 경우, 헬퍼 지질은 막 융합원성(fusogenicity)을 증강시킬 수 있다. 헬퍼 지질은 스테로이드, 스테롤, 및 알킬 레조르시놀을 포함한다. 적합한 헬퍼 지질의 예는 적합한 콜레스테롤, 5-헵타데실레조르시놀, 및 콜레스테롤 헤미숙시네이트를 포함한다. 일례에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 헤미숙시네이트일 수 있다.

[0481] 스텔스 지질은, 나노입자가 생체내에서 존재할 수 있는 시간의 길이를 변경시키는 지질을 포함한다. 스텔스 지질은 예를 들어, 입자 응집을 감소시키고 입자 크기를 제어함으로써 제형 과정에 일조할 수 있다. 스텔스 지질은 LNP의 약물동력학적 특성을 조절할 수 있다. 적합한 스텔스 지질은 지질 모이어티에 연결된 친수성 헤드 기(head group)를 갖는 지질을 포함한다.

[0482] 스텔스 지질의 친수성 헤드 기는 예를 들어, PEG(이따금 폴리(에틸렌 옥사이드)로 지칭됨), 폴리(옥사졸린), 폴리(비닐 알코올), 폴리(글리세롤), 폴리(N- 비닐피롤리돈), 폴리아미노산, 및 폴리 N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아미드에 기초한 중합체로부터 선택되는 중합체 모이어티를 포함할 수 있다. 용어 PEG는 임의의 폴리에틸렌 글리콜 또는 다른 폴리알킬렌 에테르 중합체를 의미한다. 소정의 LNP 제형에서, PEG는 PEG 2000이라고도 하는 PEG-2K이며, 이는 약 2,000달톤의 평균 분자량을 갖는다. 예를 들어, WO 2017/173054 A1호를 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0483] 스텔스 지질의 지질 모이어티는 예를 들어, 독립적으로 약 C4 내지 약 C40 포화된 또는 불포화된 탄소 원자를 포함하는 알킬 사슬 길이를 갖는 디알킬글리세롤 또는 디알킬글리카미드 기를 포함하는 것을 포함하여 디아실글리세롤 또는 디아실글리카미드로부터 유래될 수 있으며, 여기서 사슬은 예를 들어, 아미드 또는 에스테르와 같은 하나 이상의 작용기를 포함할 수 있다. 디알킬글리세롤 또는 디알킬글리카미드 기는 하나 이상의 치환된 알킬기를 추가로 포함할 수 있다.

[0484] 일례로, 스텔스 지질은 PEG-디라우로일글리세롤, PEG-디미리스토일글리세롤(PEG-DMG), PEG-디팔미토일글리세롤, PEG-디스테아로일글리세롤(PEG-DSPE), PEG-디라우일글리카미드, PEG-디미리스틸글리카미드, PEG-디팔미토일글리카미드, 및 PEG-디스테아로일글리카미드, PEG-콜레스테롤 (1-[8'-(콜레스트-5-엔-3[베타]-옥시)카르복사미도-

3',6'-디옥사옥타닐]카르바모일-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌 글리콜), PEG-DMB(3,4-디테트라데콕실벤질-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌 글리콜)에테르), 1,2-디미리스토일-sn- 글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DMG), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DMPE), 또는 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리옥시에틸렌 글리콜-2000(PEG2k-DMG), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DSPE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세롤, 메톡시폴리 에틸렌 글리콜(PEG2k-DSG), 폴리(에틸렌 글리콜)-2000-디메타크릴레이트(PEG2k-DMA), 및 1,2-디스테아릴옥시프로필-3-아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DSA)으로부터 선택될 수 있다. 하나의 특정한 예에서, 스텔스 지질은 PEG2k-DMG일 수 있다.

[0485] 일부 구현예에서, PEG 지질은 글리세롤 기를 포함한다. 일부 구현예에서, PEG 지질은 디미리스토일글리세롤(DMG) 기를 포함한다. 일부 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k를 포함한다. 일부 구현예에서, PEG 지질은 PEG-DMG이다. 일부 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-DMG이다. 일부 구현예에서, PEG 지질은 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000이다. 일부 구현예에서, PEG2k-DMG는 1,2-디미리스토일-rac-글리세로-3-메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000이다.

[0486] LNP는 상이한 각각의 몰비의 성분 지질을 제형에 포함할 수 있다. CCD 지질의 몰%는 예를 들어, 약 30몰% 내지 약 60몰%, 약 35몰% 내지 약 55몰%, 약 40몰% 내지 약 50몰%, 약 42몰% 내지 약 47몰%, 또는 약 45%일 수 있다. 헬퍼 지질의 몰%는 예를 들어, 약 30몰% 내지 약 60몰%, 약 35몰% 내지 약 55몰%, 약 40몰% 내지 약 50몰%, 약 41몰% 내지 약 46몰%, 또는 약 44몰%일 수 있다. 중성 지질의 몰%는 예를 들어, 약 1몰% 내지 약 20몰%, 약 5몰% 내지 약 15몰%, 약 7몰% 내지 약 12몰%, 또는 약 9몰%일 수 있다. 스텔스 지질의 몰%는 예를 들어, 약 1몰% 내지 약 10몰%, 약 1몰% 내지 약 5몰%, 약 1몰% 내지 약 3몰%, 약 2몰%, 또는 약 1몰%일 수 있다.

[0487] LNP는, 캡슐화되는 생분해성 지질의 양으로 하전된 아민기(N)와 핵산의 음으로 하전된 포스페이트기(P) 사이에서 상이한 비를 가질 수 있다. 이것은 식 N/P로 수학적으로 표현될 수 있다. 예를 들어, N/P 비는 약 0.5 내지 약 100, 약 1 내지 약 50, 약 1 내지 약 25, 약 1 내지 약 10, 약 1 내지 약 7, 약 3 내지 약 5, 약 4 내지 약 5, 약 4, 약 4.5, 또는 약 5일 수 있다. N/P 비는 또한, 약 4 내지 약 7, 또는 약 4.5 내지 약 6일 수 있다. 구체적인 예에서, N/P 비는 4.5일 수 있거나 6일 수 있다.

[0488] 일부 LNP에서, 카고는 Cas mRNA(예를 들어, Cas9 mRNA) 및 gRNA를 포함할 수 있다. Cas mRNA 및 gRNA는 상이한 비로 존재할 수 있다. 예를 들어, LNP 제형은 약 25:1 내지 약 1:25 범위, 약 10:1 내지 약 1:10 범위, 약 5:1 내지 약 1:5 범위, 또는 약 1:1의 Cas mRNA 대 gRNA 핵산의 비를 포함할 수 있다. 대안적으로, LNP 제형은 약 1:1 내지 약 1:5, 또는 약 10:1의 Cas mRNA 대 gRNA 핵산의 비를 포함할 수 있다. 대안적으로, LNP 제형은 약 1:10, 25:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:10, 또는 1:25의 Cas mRNA 대 gRNA 핵산의 비를 포함할 수 있다. 대안적으로, LNP 제형은 약 2:1 내지 약 1:2의 Cas mRNA 대 gRNA 핵산의 비를 포함할 수 있다. 대안적으로, LNP 제형은 약 1:1 내지 약 1:2의 Cas mRNA 대 gRNA 핵산의 비를 포함할 수 있다. 구체적인 예에서, Cas mRNA 대 gRNA의 비는 약 1:1일 수 있다. 구체적인 예에서, Cas mRNA 대 gRNA의 비는 약 1:2일 수 있다. 구체적인 예에서, Cas mRNA 대 gRNA의 비는 약 2:1일 수 있다.

[0489] sLNP의 예시적인 투여량은 총 RNA(Cas9 mRNA 및 gRNA) 카고 함량을 기준으로, 약 0.1, 약 0.25, 약 0.3, 약 0.5, 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 8, 또는 약 10mg/kg 체중(mpk) 또는 약 0.1 내지 약 10, 약 0.25 내지 약 10, 약 0.3 내지 약 10, 약 0.5 내지 약 10, 약 1 내지 약 10, 약 2 내지 약 10, 약 3 내지 약 10, 약 4 내지 약 10, 약 5 내지 약 10, 약 6 내지 약 10, 약 8 내지 약 10, 약 0.1 내지 약 8, 약 0.1 내지 약 6, 약 0.1 내지 약 5, 약 0.1 내지 약 4, 약 0.1 내지 약 3, 약 0.1 내지 약 2, 약 0.1 내지 약 1, 약 0.1 내지 약 0.5, 약 0.1 내지 약 0.3, 약 0.1 내지 약 0.25, 약 0.25 내지 약 8, 약 0.3 내지 약 6, 약 0.5 내지 약 5, 약 1 내지 약 5, 또는 약 2 내지 약 3mg/kg 체중을 포함한다. 이러한 LNP는 예를 들어, 정맥내로 투여될 수 있다. 일례에서, 약 0.01mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 0.1mg/kg 내지 약 10mg/kg, 또는 약 0.01mg/kg 내지 약 0.3mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다. 예를 들어, 약 0.01, 약 0.03, 약 0.1, 약 0.3, 약 1, 약 3, 또는 약 10mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다. LNP의 추가의 예시적인 투여량은 총 RNA(Cas9 mRNA 및 gRNA) 카고 함량을 기준으로, 약 0.1, 약 0.25, 약 0.3, 약 0.5, 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 8, 또는 약 10mg/kg(mpk) 체중 또는 약 0.1 내지 약 10, 약 0.25 내지 약 10, 약 0.3 내지 약 10, 약 0.5 내지 약 10, 약 1 내지 약 10, 약 2 내지 약 10, 약 3 내지 약 10, 약 4 내지 약 10, 약 5 내지 약 10, 약 6 내지 약 10, 약 8 내지 약 10, 약 0.1 내지 약 8, 약 0.1 내지 약 6, 약 0.1 내지 약 5, 약 0.1 내지 약 4, 약 0.1 내지 약 3, 약 0.1 내지 약 2, 약 0.1 내지 약 1, 약 0.1 내지 약 0.5, 약 0.1 내지 약 0.3, 약 0.1 내지 약 0.25, 약 0.25 내지 약 8, 약 0.3 내지 약 6, 약 0.5 내지 약 5, 약 1 내지 약 5, 또는 약 2 내지 약 3mg/kg 체중을 포

함한다. 이러한 LNP는 예를 들어, 정맥내로 투여될 수 있다. 일례에서, 약 0.01mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 0.1mg/kg 내지 약 10mg/kg, 또는 약 0.01mg/kg 내지 약 0.3mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다. 예를 들어, 약 0.01, 약 0.03, 약 0.1, 약 0.3, 약 0.5, 약 1, 약 2, 약 3, 또는 약 10mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 약 0.5 내지 약 10, 약 0.5 내지 약 5, 약 0.5 내지 약 3, 약 1 내지 약 10, 약 1 내지 약 5, 약 1 내지 약 3, 또는 약 1 내지 약 2mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 약 0.5 내지 약 3, 약 0.5 내지 약 2.5, 약 0.5 내지 약 2, 약 0.5 내지 약 1.5, 약 0.5 내지 약 1, 약 1 내지 약 3, 약1 내지 약 2.5, 약 1 내지 약 2, 또는 약 1 내지 약 1.5mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 약 1mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다.

[0490] 일부 LNP에서, 카고는 *F9* 핵산 구조체 및 gRNA를 포함할 수 있다. *F9* 핵산 구조체 및 gRNA는 상이한 비로 존재할 수 있다. 예를 들어, LNP 제형은 약 25:1 내지 약 1:25 범위, 약 10:1 내지 약 1:10 범위, 약 5:1 내지 약 1:5 범위, 또는 약 1:1의 *F9* 핵산 구조체 대 gRNA 핵산의 비를 포함할 수 있다. 대안적으로, LNP 제형은 약 1:1 내지 약 1:5, 약 5:1 내지 약 1:1, 약 10:1, 또는 약 1:10의 *F9* 핵산 구조체 대 gRNA 핵산의 비를 포함할 수 있다. 대안적으로, LNP 제형은 약 1:10, 약 25:1, 약 10:1, 약 5:1, 약 3:1, 약 1:1, 약 1:3, 약 1:5, 약 1:10, 또는 약 1:25의 *F9* 핵산 구조체 대 gRNA 핵산의 비를 포함할 수 있다.

[0491] 적합한 LNP의 구체적인 예는 약 4.5의 질소-대-포스페이트(N/P) 비를 가지고, 생분해성 양이온성 지질, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG를 약 45:44:9:2 몰비(약 45:약 44:약 9:약 2)로 함유한다. 생분해성 양이온성 지질은 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트라고도 하는 (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트일 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22(9):2227-2235]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. Cas9 mRNA는 약 1:1(약 1:약 1)의 중량비로 존재할 수 있다. 적합한 LNP의 또 다른 구체적인 예는 Dlin-MC3-DMA(MC3), 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG-DMG를 50:38.5:10:1.5 몰비(약 50:약 38.5:약 10:약 1.5)로 함유한다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:2(약 1:약 2) 중량비로 존재할 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:1(약 1:약 1) 중량비로 존재할 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 2:1(약 2:약 1) 중량비로 존재할 수 있다.

[0492] 적합한 LNP의 또 다른 구체적인 예는 약 6의 질소-대-포스페이트(N/P) 비를 가지고, 생분해성 양이온성 지질, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG를 약 50:38:9:3 몰비(약 50:약 38:약 9:약 3)로 함유한다. 생분해성 양이온성 지질은 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트)라고도 하는 지질 A ((9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트일 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:2(약 1:약 2) 중량비로 존재할 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:1(약 1:약 1) 중량비로 존재할 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 2:1(약 2:약 1)의 중량비로 존재할 수 있다.

[0493] 적합한 LNP의 또 다른 구체적인 예는 약 3의 질소-대-포스페이트(N/P) 비를 가지며, 양이온성 지질, 구조적 지질, 콜레스테롤(예를 들어, 콜레스테롤(양)(Avanti 700000)), 및 PEG2k-DMG(예를 들어, PEG-DMG 2000(NOF America-SUNBRIGHT® GM-020(DMG-PEG))를 약 50:10:38.5:1.5 비(약 50:약 10:약 38.5:약 1.5) 또는 약 47:10:42:1 비(약 47:약 10:약 42:약 1)로 함유한다. 구조적 지질은 예를 들어, DSPC(예를 들어, DSPC(Avanti 850365)), SOPC, DOPC, 또는 DOPE일 수 있다. 양이온성/이온화 가능한 지질은 예를 들어, Dlin-MC3-DMA(예를 들어, Dlin-MC3-DMA (Biofine International))일 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:2(약 1:약 2) 중량비로 존재할 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:1(약 1:약 1) 중량비로 존재할 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 2:1(약 2:약 1) 중량비로 존재할 수 있다.

[0494] 적합한 LNP의 또 다른 구체적인 예는 Dlin-MC3-DMA, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG 지질을 약 45:9:44:2 비(약 45:약 9:약 44:약 2)로 함유한다. 적합한 LNP의 또 다른 구체적인 예는 Dlin-MC3-DMA, DOPE, 콜레스테롤, 및 PEG 지질 또는 PEG DMG를 약 50:10:39:1 비(약 50:약 10:약 39:약 1)로 함유한다. 적합한 LNP의 또 다른 구체적인 예는 Dlin-MC3-DMA, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 약 55:10:32:2.5 비(약 55:약 10:약 32.5:약 2.5)에서 갖는다. 적합한 LNP의 또 다른 구체적인 예는 Dlin-MC3-DMA, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG-DMG를 약 50:10:38.5:1.5 비(약 50:약 10:약 38.5:약 1.5)에서 갖는다. 적합한 LNP의 또 다른 구체적인 예는 Dlin-MC3-DMA, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG-DMG를 약 50:10:38.5:1.5 비(약 50:약 10:약 38.5:약 1.5)에서 갖는다. Cas9

mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:2(약 1:약 2) 중량비로 존재할 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:1(약 1:약 1) 중량비로 존재할 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 2:1(약 2:약 1) 중량비로 존재할 수 있다.

[0495] 적합한 LNP의 다른 예는 예를 들어, WO 2019/067992호, WO 2020/082042호, US 2020/0270617호, WO 2020/082041호, US 2020/0268906호, WO 2020/082046호(예를 들어, pp. 85-86 참조), 및 US 2020/0289628호에서 찾을 수 있으며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0496] ***(6) 뉴클레아제 작용제를 포함하는 벡터***

[0497] 본원에 개시된 뉴클레아제 작용제(예를 들어, ZFN, TALEN, 또는 CRISPR/Cas)는 발현을 위한 벡터에 제공될 수 있다. 벡터는 예를 들어, 복제 원점, 프로모터, 및 항생제 내성을 인코딩하는 유전자와 같은 추가 서열을 포함할 수 있다.

[0498] 일부 벡터는 원형일 수 있다. 대안적으로, 벡터는 선형일 수 있다. 벡터는 지질 나노입자, 리포솜, 비지질 나노입자, 또는 바이러스 캡시드를 통해 전달되기 위해 포장에 존재할 수 있다. 비제한적인 예시적 벡터는 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 인공 염색체, 미니염색체, 트랜스포존, 바이러스 벡터, 및 발현 벡터를 포함한다.

[0499] 핵산의 도입은 또한, 바이러스-매개 전달, 예컨대, AAV-매개 전달 또는 렌티바이러스-매개 전달에 의해 달성될 수 있다. 벡터는 예를 들어, 바이러스 벡터, 예컨대 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터일 수 있다. AAV는 임의의 적합한 혈청형일 수 있고, 단일 가닥 AAV(ssAAV) 또는 자기-상보적 AAV(scAAV)일 수 있다. 다른 예시적인 바이러스/바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 폭스바이러스, 및 단순 포진 바이러스를 포함한다. 바이러스는 분열 세포, 비-분열 세포, 또는 분열 세포와 비-분열 세포 둘 다 감염시킬 수 있다. 바이러스는 숙주 게놈 내로 통합할 수 있거나 대안적으로는 숙주 게놈 내로 통합하지 않는다. 이러한 바이러스는 또한, 감소된 면역력을 갖도록 조작될 수 있다. 바이러스는 복제-가능일 수 있거나 복제-결함(예를 들어, 추가 라운드의 비리온 복제 및/또는 포장에 필요한 하나 이상의 유전자가 결함됨)일 수 있다. 바이러스는 일시적 발현, 장기-지속적 발현(예를 들어, 적어도 1주, 2주, 1개월, 2개월, 또는 3개월), 또는 영구적 발현(예를 들어, Cas 및/또는 gRNA의)을 야기할 수 있다. 바이러스 벡터는 그의 야생형 대응물로부터 유전자 변형될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 클로닝을 용이하게 하거나 벡터의 하나 이상의 특성이 변경되도록 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 이러한 특성은 포장 수용력, 형질도입 효율, 면역원성, 게놈 통합, 복제, 전사 및 번역을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 바이러스가 더 큰 크기를 갖는 외인성 서열을 포장할 수 있도록 바이러스 게놈의 일부가 결실될 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 벡터는 향상된 형질도입 효율을 가질 수 있다. 일부 예에서, 숙주에서 바이러스에 의해 유도된 면역 반응이 감소될 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 서열의 숙주 게놈으로의 통합을 촉진하는 바이러스 유전자(예컨대 인테그라제)는 바이러스가 비통합되도록 돌연변이될 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 벡터는 복제 결함일 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 벡터는 벡터 상의 코딩 서열의 발현을 유도하기 위해 외인성 전사 또는 번역 제어 서열을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 바이러스는 헬퍼-의존적일 수 있다. 예를 들어, 바이러스는 벡터를 바이러스 입자 내로 증폭 및 포장하는 데 필요한 바이러스 성분(예컨대 바이러스 단백질)을 공급하기 위해 하나 이상의 헬퍼 바이러스를 필요로 할 수 있다. 이러한 경우에, 바이러스 성분을 인코딩하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 하나 이상의 헬퍼 성분이 본원에 기재된 벡터 시스템과 함께 숙주 세포 또는 숙주 세포의 집단에 도입될 수 있다. 다른 예에서, 바이러스는 헬퍼-무함유일 수 있다. 예를 들어, 바이러스는 헬퍼 바이러스 없이 벡터를 증폭 및 포장할 수 있다. 일부 예에서, 본원에 기재된 벡터 시스템은 또한 바이러스 증폭 및 포장에 필요한 바이러스 성분을 인코딩할 수 있다.

[0500] 예시적인 바이러스 역가(예를 들어, AAV 역가)는 약 10^{12}, 약 10^{13}, 약 10^{14}, 약 10^{15}, 및 약 10^{16}벡터 게놈(vg)/mL, 또는 약 10^{12} 내지 약 10^{16}, 약 10^{12} 내지 약 10^{15}, 약 10^{12} 내지 약 10^{14}, 약 10^{12} 내지 약 10^{13}, 약 10^{13} 내지 약 10^{16}, 약 10^{14} 내지 약 10^{16}, 약 10^{15} 내지 약 10^{16}, 또는 약 10^{13} 내지 약 10^{15}vg/mL을 포함한다. 다른 예시적인 바이러스 역가(예를 들어, AAV 역가)는 약 10^{12}, 약 10^{13}, 약 10^{14}, 약 10^{15}, 및 약 10^{16}벡터 게놈(vg)/kg 체중, 또는 약 10^{12} 내지 약 10^{16}, 약 10^{12} 내지 약 10^{15}, 약 10^{12} 내지 약 10^{14}, 약 10^{12} 내지 약 10^{13}, 약 10^{13} 내지 약 10^{16}, 약 10^{14} 내지 약 10^{16}, 약 10^{15} 내지 약 10^{16}, 또는 약 10^{13} 내지 약 10^{15}vg/kg 체중을 포함한다. 일례에서, 바이러스 역가는 약 10^{13} 내지 약 10^{14}vg/mL 또는 vg/kg이다. 또 다른 예에서, 바이러스

역가는 약 10^{12} 내지 약 10^{13}vg/mL 또는 vg/kg(예를 들어, 약 10^{12} 내지 약 10^{13}vg/kg)이다. 또 다른 예에서, 바이러스 역가는 약 10^{12} 내지 약 10^{14}vg/mL 또는 vg/kg(예를 들어, 약 10^{12} 내지 약 10^{14}vg/kg)이다. 예를 들어, 바이러스 역가는 약 1.5E12 내지 약 1.5E13vg/kg일 수 있거나, 약 1.5E12vg/kg일 수 있거나, 약 1.5E13vg/kg일 수 있다. 또 다른 예에서, 바이러스 역가는 약 2E13vg/mL 또는 vg/kg이다.

[0501] 아데노-관련 바이러스(AAV)는 인간 및 비-인간 영장류(NHP)를 포함하는 다수의 종에서 토착화된다. 현재까지 적어도 12개의 자연 혈청형 및 수백 개의 자연 변이체가 단리되고 특성화되었다. 예를 들어, 문헌[Li et al. (2020) *Nat. Rev. Genet.* 21:255-272]를 참조하며, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. AAV 입자는 단일 가닥 DNA(ssDNA) 게놈을 함유하는 비-외피 이십면체 단백질 캡시드로 자연적으로 구성된다. DNA 게놈은 복제 및 포장 신호의 바이러스 기점으로서 역할을 하는 2개의 역위 말단 반복(ITR)에 의해 플랭킹된다. *rep* 유전자는 바이러스 복제 및 포장에 필요한 4개의 단백질을 인코딩하는 반면, *cap* 유전자는 AAV 혈청형을 지시하는 3개의 구조적 캡시드 서브유닛, 및 일부 혈청형에서 비리온 조립을 촉진하는 조립 활성화 단백질(AAP: Assembly Activating Protein)을 인코딩한다.

[0502] 재조합 AAV(rAAV)는 치료적 이식유전자를 생체내 표적 세포에 전달함으로써 인간 질환을 치료하기 위해 유전자 요법에 사용되는 현재 가장 일반적으로 사용되는 바이러스 벡터 중 하나이다. 실제로, rAAV 벡터는 자연 AAV와 유사한 이십면체 캡시드로 구성되지만, rAAV 비리온은 AAV 단백질-코딩 또는 AAV 복제 서열을 캡슐화하지 않는다. 이러한 바이러스 벡터는 비복제이다. rAAV 벡터에 필요한 유일한 바이러스 서열은 rAAV 벡터의 제조 동안 게놈 복제 및 포장을 안내하는 데 필요한 2개의 ITR이다. rAAV 게놈은 AAV *rep* 및 *cap* 유전자가 없어서, 이들을 생체내 비복제하는 것이 렌더링된다. rAAV 벡터는 AAV ITR에 의해 플랭킹된 이식유전자 카세트와 조합하여, 트랜스 내 추가적인 바이러스 헬퍼 단백질과 함께 *rep* 및 *cap* 유전자를 발현함으로써 생성된다.

[0503] 치료적 rAAV 게놈에서, 유전자 발현 카세트는 ITR 서열 사이에 배치된다. 전형적으로, rAAV 게놈 카세트는 치료적 이식유전자의 발현을 유도하는 프로모터를 포함하고, 이어서 폴리아데닐화 서열을 포함한다. rAAV 발현 카세트에 플랭킹하는 ITR은 보통 AAV2로부터 유래되며, 제1 혈청형은 단리되고 재조합 바이러스 벡터로 전환된다. 이후, 대부분의 rAAV 생성 방법은 AAV2 *Rep*-기반 포장 시스템에 의존한다. 예를 들어, 문헌[Colella et al. (2017) *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 8:87-104]을 참조하고, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0504] 사용될 수 있는 ITR의 일부 비제한적인 예는 서열번호 196, 서열번호 197, 또는 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 ITR을 포함한다. ITR의 다른 예는 서열번호 196, 서열번호 197, 또는 서열번호 198에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하고, 서열번호 196, 서열번호 197, 또는 서열번호 198과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일할 수 있다. 본원에 개시된 일부 rAAV 게놈에서, 뉴클레아제 작용제(또는 이의 성분)를 인코딩하는 핵산은 동일한 ITR(즉, 5' 단부 상 ITR, 및 3' 단부 상 ITR의 역보체)에 의해 양면 상에 플랭킹된다. 일례에서, 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어질 수 있거나, 이로 이루어질 수 있다. 또 다른 예에서, 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 197을 포함할 수 있거나, 이로 본질적으로 이루어질 수 있거나, 이로 이루어질 수 있다. 일례에서, 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 5' 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 3' 단부 상의 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어질 수 있거나, 이로 이루어질 수 있다. 일례에서, 적어도 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 5' 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 3' 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 각각의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어질 수 있거나, 이로 이루어질 수 있다. 본원에 개시된 다른 rAAV 게놈에서, 뉴클레아제 작용제(또는 이의 성분)를 인코딩하는 핵산은 각각의 단부 상 상이한 ITR에 의해 플랭킹된다. 일례에서, 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 다른 단부 상 ITR은 서열번호 197을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 또 다른 예에서, 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 196을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 다른 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일례에서, 하나의 단부 상 ITR은 서열번호 197을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이

로 이루어지고, 다른 단부 상 ITR은 서열번호 198을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

[0505] 재조합 AAV 벡터의 특정 혈청형은 특정 조직에 대한 이의 생체내 향성에 영향을 미친다. AAV 캡시드 단백질은 표적 세포 내로의 부착 및 진입을 매개하고, 이어서 엔도솜 탈출 및 핵으로의 트래피킹을 담당한다. 따라서, rAAV 벡터가 발생할 때 혈청형의 선택은 벡터가 생체내 주입될 때 어떤 세포 유형 및 조직에 결합하고 형질도입될 가능성이 가장 높은지에 영향을 미칠 것이다. rAAV8을 포함하는 rAAV의 몇몇 혈청형은 마우스, NHP 및 인간에서 전신적으로 전달될 때 간을 형질도입할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Li et al. (2020) *Nat. Rev. Genet.* 21:255-272]를 참조하며, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0506] 일단 핵 내에서, ssDNA 게놈은 비리온으로부터 방출되고, 상보적 DNA 가닥은 이중 가닥 DNA(dsDNA) 분자를 생성하도록 합성된다. 이중 가닥 AAV 게놈은 이들의 ITR을 통해 자연적으로 원형화되고, 핵에서 염색체외 지속될 에피솜이 된다. 따라서, 에피솜 유전자 요법 프로그램의 경우, rAAV-전달 rAAV 에피솜은 비-분열 세포에서 장기간 프로모터-유도 유전자 발현을 제공한다. 그러나, 이러한 rAAV-전달 에피솜 DNA는 세포 분할로서 희석된다. 대조적으로, 본원에 기재된 유전자 요법은 장기간 유전자 발현을 허용하기 위한 유전자 삽입에 기초한다.

[0507] 특정 서열을 포함하는 특정 rAAV(예를 들어, 특정 양방향 구조체 서열 또는 특정 일방향 구조체 서열)가 본원에 개시되는 경우, 이들은 개시된 서열 또는 서열의 역방향 보체를 포괄하도록 의도된다. 예를 들어, 본원에 개시된 양방향 또는 일방향 구조체가 가상 서열 5'-CTGGACCGA-3'로 이루어지는 경우, 이는 또한 그 서열(5'-TCGGTCCAG-3')의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 마찬가지로, 특정 5'에서 3' 순서로 양방향 또는 일방향 구조체 요소를 포함하는 rAAV가 본원에 개시되는 경우, 이들은 또한 이러한 요소의 순서의 역보체를 포괄하도록 의도된다. 예를 들어, 5'부터 3'까지 제1 스플라이스 수용체, 제1 코딩 서열, 제1 종결자, 제2 종결자의 역보체, 제2 코딩 서열의 역보체, 및 제2 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하는 양방향 구조체를 포함하는 rAAV가 본원에 개시되는 경우, 이는 또한 5'부터 3'까지 제2 스플라이스 수용체, 제2 코딩 서열, 제2 종결자, 제1 종결자의 역보체, 제1 코딩 서열의 역보체, 및 제1 스플라이스 수용체의 역보체를 포함하는 구조체를 포괄하도록 의도된다. 단일 가닥 AAV 게놈은 센스(플러스-가닥) 또는 안티-센스(마이너스-가닥 게놈)로 포장되고, + 및 - 극성의 단일 가닥 AAV 게놈은 동일한 빈도로 성숙 rAAV 비리온으로 포장된다. 예를 들어, 문헌[LING et al. (2015) *J. Mol. Genet. Med.* 9(3):175, Zhou et al. (2008) *Mol. Ther.* 16(3):494-499, and Samulski et al. (1987) *J. Virol.* 61:3096-3101]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0508] ssDNA AAV 게놈은 상보적 DNA 가닥의 합성을 가능하게 하는 2개의 역위 말단 반복에 의해 플랭킹되는 2개의 개방형 리딩 프레임인 Rep 및 Cap으로 이루어진다. AAV 전달 플라스미드를 구축할 때, 이식유전자는 2개의 ITR 사이에 놓이고, Rep 및 Cap는 인트랜스로 공급될 수 있다. Rep 및 Cap 외에도, AAV는 아데노바이러스로부터의 유전자를 함유하는 헬퍼 플라스미드를 필요로 할 수 있다. 이들 유전자(E4, E2a, 및 VA)는 AAV 복제를 매개한다. 예를 들어, 전달 플라스미드인 Rep/Cap 및 헬퍼 플라스미드는 아데노바이러스 유전자 E1+를 함유하는 HEK293 세포 내로 형질주입되어, 감염성 AAV 입자를 생성할 수 있다. 대안적으로, Rep, Cap, 및 아데노바이러스 헬퍼 유전자는 단일 플라스미드 내로 조합될 수 있다. 유사한 포장 세포 및 방법이 다른 바이러스, 예컨대 레트로바이러스에 사용될 수 있다.

[0509] AAV의 다수의 혈청형이 식별되었다. 이들 혈청형은, 이들이 감염시키는 세포의 유형이 상이하여(즉, 이의 향성), 특정 세포 유형의 선호적인 형질도입을 가능하게 한다. 용어 AAV는 예를 들어, 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, 및 이들의 하이브리드, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비영장류 AAV, 및 양 AAV를 포함한다. AAV의 다양한 혈청형의 게놈 서열뿐만 아니라 자연 말단 반복(TR), Rep 단백질, 및 캡시드 서브유닛의 서열은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 서열은 문헌 또는 GenBank와 같은 공개 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이 "AAV 벡터"는 전형적으로 관심 이종성 폴리펩티드를 인코딩하는 서열을 포함하는, AAV 기원이 아닌 이종성 서열(즉, AAV에 대한 이종성 핵산 서열)을 포함하는 AAV 벡터를 지칭한다. 구조체는AAV1, 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, 및 이들의 하이브리드, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비영장류 AAV, 및 양 AAV 캡시드 서열을 포함한다. 일반적으로, 이종성 핵산 서열(이식유전자)은 적어도 하나에 의해, 그리고 일반적으로 2개의 AAV 역위 말단 반복 서열(ITR)에 의해 플랭킹된다. AAV 벡터는 단일 가닥(ssAAV) 또는 자기-상보적(scAAV)일 수 있다. 간 조직을 위한 혈청형의 예에는 AAV3B, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.74,

및 AAVhu.37, 및 특히 AAV8이 포함된다. 구체적인 예에서, 핵산 구조체를 포함하는 AAV 벡터는 재조합 AAV8(rAAV8)일 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 rAAV8 벡터는 캡시드가 AAV8 유래인 것이다. 예를 들어, AAV2로부터의 ITR을 사용하는 AAV 벡터 및 AAV8의 캡시드는 본원에서 rAAV8 벡터인 것으로 간주된다.

[0510] 향성은 위형화을 통해 추가로 정제될 수 있으며, 이는 상이한 바이러스 혈청형으로부터의 캡시드 및 게놈의 혼합이다. 예를 들어 AAV2/5는 혈청형 5로부터의 캡시드에 포장된 혈청형 2의 게놈을 함유하는 바이러스를 나타낸다. 위형화된 바이러스의 사용은 형질도입 효율을 향상시킬 뿐만 아니라, 향성을 변경시킬 수 있다. 상이한 혈청형으로부터 유래된 하이브리드 캡시드가 또한, 바이러스 향성을 변경시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, AAV-DJ는 8개의 혈청형으로부터의 하이브리드 캡시드를 함유하고, 생체내에서 광범위한 세포 유형에 걸쳐 높은 감염성을 나타낸다. AAV-DJ8은 AAV-DJ의 특성을 나타내지만 증강된 뇌 흡수를 갖는 또 다른 예이다. AAV 혈청형은 또한, 돌연변이를 통해 변형될 수 있다. AAV2의 돌연변이적 변형의 예는 Y444F, Y500F, Y730F, 및 S662V를 포함한다. AAV3의 돌연변이적 변형의 예는 Y705F, Y731F, 및 T492V를 포함한다. AAV6의 돌연변이적 변형의 예는 S663V 및 T492V를 포함한다. 다른 위형화된/변형된 AAV 변이체는 AAV2/1, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/8, AAV2/9, AAV2.5, AAV8.2, 및 AAV/SASTG를 포함한다.

[0511] 이식유전자 발현을 가속화하기 위해, 자기-상보적 AAV(scAAV) 변이체가 사용될 수 있다. AAV는 AAV의 단일-가닥 DNA 게놈의 상보적 가닥을 합성하기 위해 세포의 DNA 복제 머시너리에 의존하기 때문에, 이식유전자 발현이 지연될 수 있다. 이러한 지연을 해결하기 위해, 감염 시 자발적으로 어닐링할 수 있는 상보적 서열을 함유하는 scAAV가 사용되어, 숙주 세포 DNA 합성을 위한 요건을 배제할 수 있다. 그러나, 단일 가닥 AAV(ssAAV) 벡터가 또한 사용될 수 있다.

[0512] 포장 수용력을 증가시키기 위해, 더 긴 이식유전자는 2개의 AAV 전달 플라스미드 사이에서 분할될 수 있으며, 제1 AAV는 3' 스플라이스 공여체이고 제2 AAV는 5' 스플라이스 수용체이다. 세포의 공동-감염 시, 이들 바이러스는 콘카티머를 형성하며, 함께 스플라이싱되고, 전장 이식유전자가 발현될 수 있다. 이는 더 장기적인 이식유전자 발현을 가능하게 하지만, 발현은 덜 효율적이다. 수용력을 증가시키기 위한 유사한 방법은 상동성 재조합을 이용한다. 예를 들어, 이식유전자는, 공동-발현이 전장 이식유전자의 상동성 재조합 및 발현을 유도하도록 2개의 전달 플라스미드 사이에서 그러나 실질적인 서열 중첩을 갖고 나눠질 수 있다.

[0513] 벡터(예를 들어, 재조합 AAV8과 같은 AAV)는 pH 7.3에서, 예를 들어, 10mM의 인산나트륨, 180mM의 염화나트륨, 및 0.005%의 폴록사머 188 중 제형화될 수 있다.

[0514] 소정의 AAV에서, 카고는 1개 이상의 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산(예를 들어, 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA, 또는 2개 이상의 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA)을 포함할 수 있다. 소정의 AAV에서, 카고는 Cas9과 같은 Cas 뉴클레아제를 인코딩하는 핵산(예를 들어, DNA), 또는 1개 이상의 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA(예를 들어, 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA 또는 2개 이상의 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA)를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 소정의 AAV에서, 카고는 *F9* 핵산 구조체를 포함할 수 있다. 소정의 AAV에서, 카고는 Cas9과 같은 Cas 뉴클레아제를 인코딩하는 핵산(예를 들어, DNA), 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA(또는 다중 가이드 RNA), 및 *F9* 핵산 구조체를 포함할 수 있다.

[0515] 예를 들어, Cas 또는 Cas9 및 하나 이상의 gRNA(예를 들어, 1개의 gRNA 또는 2개의 gRNA 또는 3개의 gRNA 또는 4개의 gRNA)는 LNP-매개 전달(예를 들어, RNA의 형태) 또는 아데노-관련 바이러스(AAV)-매개 전달(예를 들어, rAAV8-매개 전달)을 통해 전달될 수 있다. 예를 들어, Cas9 mRNA 및 gRNA는 LNP-매개 전달을 통해 전달될 수 있거나, Cas9을 인코딩하는 DNA 및 gRNA를 인코딩하는 DNA가 AAV-매개 전달을 통해 전달될 수 있다. Cas 또는 Cas9 및 gRNA(들)는 단일 AAV에서 또는 2개의 별개의 AAV를 통해 전달될 수 있다. 예를 들어, 제1 AAV는 Cas 또는 Cas9 발현 카세트를 운반할 수 있고, 제2 AAV는 gRNA 발현 카세트를 운반할 수 있다. 유사하게는, 제1 AAV는 Cas 또는 Cas9 발현 카세트를 운반할 수 있고, 제2 AAV는 2개 이상의 gRNA 발현 카세트를 운반할 수 있다. 대안적으로, 단일 AAV는 Cas 또는 Cas9 발현 카세트(예를 들어, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 Cas 또는 Cas9 코딩 서열) 및 gRNA 발현 카세트(예를 들어, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 gRNA 코딩 서열)를 운반할 수 있다. 유사하게는, 단일 AAV는 Cas 또는 Cas9 발현 카세트(예를 들어, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 Cas 또는 Cas9 코딩 서열) 및 2개 이상의 gRNA 발현 카세트(예를 들어, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 gRNA 코딩 서열)를 운반할 수 있다. 상이한 프로모터는 gRNA, 예컨대 U6 프로모터 또는 작은 tRNA Gln의 발현을 구동하는 데 사용될 수 있다. 마찬가지로, 상이한 프로모터가 Cas9 발현을 구동하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 작은 프로모터가 사용되어, Cas9 코딩 서열은 AAV 구조체 내로 적합화될 수 있다. 유사하게는, 작은 Cas9 단백질(예를 들어, SaCas9 또는 CjCas9)은 AAV 포장 수용력을 최대화하는 데 사용된다.

[0516] **C. 세포 또는 동물 또는 게놈**

[0517] 상기 조성물 중 임의의 것(예를 들어, *F9* 핵산 구조체, 뉴클레아제 작용제, 벡터, 지질 나노입자, 또는 이들의 임의의 조합)을 포함하는 세포 또는 동물(예를 들어, 대상체)이 또한 본원에 제공된다. 이러한 세포 또는 동물(또는 게놈)은 본원에 개시된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 세포 또는 동물은 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체 중 임의의 것, 본원에 개시된 뉴클레아제 작용제 중 임의의 것, 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 이러한 세포 또는 동물(또는 게놈)은 신생아 세포 또는 동물(또는 게놈)일 수 있다. 대안적으로, 이러한 세포 또는 동물(또는 게놈)은 비-신생아 세포 또는 동물(또는 게놈)일 수 있다.

[0518] 신생아 대상체(예를 들어, 동물)는 최대 1년(52주) 또는 그 이하의 연령, 바람직하게는 최대 24주 또는 그 이하의 연령, 더 바람직하게는 최대 12주 또는 그 이하의 연령, 더욱 바람직하게는 최대 8주 또는 그 이하의 연령, 보다 더 바람직하게는 최대 4주 또는 그 이하의 연령의 인간 대상체일 수 있다. 특정 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 최대 4주령이다. 특정 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 최대 8주령이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 3주 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 2주 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 1주 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 7일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 6일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 5일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 4일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 3일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 2일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 1일 이내이다. 상기 개시된 시간 범위는 인간 대상체에 대한 것이며, 또한 다른 동물에 대한 대응하는 발달 시간 범위를 포괄하도록 의도된다. 본원에 사용되는 바와 같이, "신생아 세포"는 신생아 대상체의 세포이고, 신생아 세포의 집단은 신생아 대상체의 세포의 집단이다.

[0519] 신생아 세포는 임의의 신생아 대상체의 것일 수 있다. 예를 들어, 이들은 최대 1년(52주) 또는 그 이하의 연령, 바람직하게는 최대 24주 또는 그 이하의 연령, 더 바람직하게는 최대 12주 또는 그 이하의 연령, 더욱 바람직하게는 최대 8주 또는 그 이하의 연령, 보다 더 바람직하게는 최대 4주 또는 그 이하의 연령의 인간 대상체로부터 유래될 수 있다. 특정 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 최대 4주령이다. 특정 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 최대 8주령이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 3주 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 2주 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 1주 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 7일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 6일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 5일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 4일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 3일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 2일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 1일 이내이다. 상기 개시된 시간 범위는 인간 대상체에 대한 것이며, 또한 다른 동물에 대한 대응하는 발달 시간 범위를 포괄하도록 의도된다. 본원에 사용되는 바와 같이, "신생아 세포"는 신생아 대상체의 세포이고, 신생아 세포의 집단은 신생아 대상체의 세포의 집단이다.

[0520] 일부 이러한 세포 또는 동물 또는 게놈에서, *F9* 핵산 구조체는 안전 항만 유전자좌(예를 들어,*ALB* 유전자좌 또는 인간 *ALB* 유전자좌, 예컨대, *ALB* 유전자좌 또는 인간 *ALB* 유전자좌의 인트론 1)와 같은 표적 게놈 유전자좌에 게놈적으로 통합될 수 있다. 일부 이러한 세포, 동물, 또는 게놈에서, *F9* 핵산 구조체는 세포, 동물 또는 게놈에서 발현된다. 예를 들어, *F9* 핵산 구조체가 *ALB* 유전자좌(예를 들어, 인간 *ALB* 유전자좌의 인트론 1) 내로 통합되는 경우, FIX 단백질은 *ALB* 유전자좌로부터 발현될 수 있다. FIX 코딩 서열은 표적 게놈 유전자좌 내로의 통합 시 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있거나, 이는 핵산 구조체에 존재하는 외인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 핵산 구조체가 본원에 개시된 양방향 핵산 구조체라면, 게놈, 세포, 또는 동물은 제1 FIX 단백질을 발현할 수 있거나 제2 FIX 단백질을 발현할 수 있다. 일부 게놈, 세포, 또는 동물에서, 표적 게놈 유전자좌는 *ALB* 유전자좌이다. 예를 들어, 핵산 구조체는 내인성 *ALB* 유전자좌의 인트론 1에서 게놈적으로 통합될 수 있다. 그 후에, 내인성 *ALB* 엑손 1은 핵산 구조체 내 FIX 단백질에 대한 코딩 서열 내로 스플라이스될 수 있다.

[0521] 핵산 구조체가 안정하게 통합되는 표적 게놈 유전자좌는 핵산 구조체로부터의 FIX 코딩 서열에 대해 이형접합성이거나, 핵산 구조체로부터의 FIX 코딩 서열에 대해 동형접합성일 수 있다. 이배체 유기체는 각각의 유전자좌에 2개의 대립유전자를 갖는다. 대립유전자의 각각의 쌍은 특정 유전자좌의 유전자형을 나타낸다. 유전자형은, 특정 유전자좌에 2개의 동일한 대립유전자가 존재한다면 동형접합성으로서 기재되고, 2개의 대립유

전자가 상이하다면 이형접합성으로서 기재된다.

[0522] 세포, 동물 또는 게놈은 진핵 세포 또는 진핵생물, 또는 포유류 세포 또는 포유류(예를 들어, 비인간 포유류 세포 또는 비인간 포유류, 또는 인간 세포 또는 인간)와 같은 임의의 적합한 종으로부터 유래될 수 있다. 포유류는 예를 들어, 비인간 포유류, 인간, 설치류, 래트, 마우스, 또는 햄스터일 수 있다. 다른 비인간 포유류는 예를 들어 비인간 영장류, 원숭이, 유인원, 고양이, 개, 토끼, 말, 황소(bull), 사슴, 들소, 가축(예를 들어, 소, 황소(steer) 등과 같은 소 종; 양, 염소 등과 같은 양 종; 및 돼지 및 야생돼지와 같은 돼지 종)이 포함된다. 조류는 예를 들어, 닭, 칠면조, 타조, 거위, 오리 등을 포함한다. 사육 동물 및 농장 동물 또한 포함된다. 용어 "비인간"은 인간을 배제한다. 예는 인간 세포/인간, 설치류 세포/설치류, 마우스 세포/마우스, 래트 세포/래트, 및 비인간 영장류 세포/비인간 영장류를 포함하지만, 이로 한정되지 않는다. 구체적인 예에서, 세포는 인간 세포이거나 동물은 인간이다. 마찬가지로, 세포는 임의의 적합한 유형의 세포일 수 있다. 구체적인 예에서, 세포는 간세포와 같은 간 세포(예를 들어, 인간 간 세포 또는 인간 간세포)이다.

[0523] 세포는 단리된 세포(예를 들어, 시험관내)일 수 있거나, 생체내에서 동물 내에(즉, 대상체 내에) 존재할 수 있다. 세포는 유사분열적으로(mitotically) 적격인(competent) 세포 또는 유사분열적으로-불활성 세포, 감수분열적으로(meiotically) 적격인 세포 또는 감수분열적으로-불활성 세포일 수 있다. 유사하게는, 세포는 또한 1차 체세포, 또는 1차 체세포가 아닌 세포일 수 있다. 체세포는 배우자(gamete), 생식 세포, 생식모세포(gametocyte), 또는 미분화된 줄기세포가 아닌 임의의 세포를 포함한다. 예를 들어, 세포는 간세포와 같은 간세포(예를 들어, 마우스, 비인간 영장류, 또는 인간 간세포)일 수 있다.

[0524] 본원에 제공된 세포는 정상적인 건강한 세포일 수 있거나, 유병(diseased) 또는 돌연변이체-보유 세포일 수 있다. 예를 들어, 세포는 FIX 결핍을 가질 수 있거나, FIX 결핍 또는 혈우병을 갖는 대상체로부터 유래될 수 있다(예를 들어, B형 혈우병).

[0525] 본원에 제공된 세포는 비-분열 세포일 수 있다. 비-분열 세포는 말단 분화되고 분열하지 않는 세포뿐만 아니라 분열하지 않지만 세포 분열 및 증식을 재진입하는 능력을 유지하는 휴지 세포를 지칭한다. 예를 들어, 간 세포는 분열하는 능력을 유지하지만(예를 들어, 손상되거나 절제될 때), 전형적으로 분열하지 않는다. 유사분열 세포 분열 동안, 상동 재조합은 게놈이 보호되고 이중 가닥 절단부가 수리되는 메커니즘이다. 비-분열 세포는 상동 재조합(HR)이 세포에서 이중 가닥 DNA 절단부가 수리되는 1차 메커니즘이 아닌 세포를 지칭할 수 있다(예를 들어, 대조군 분열 세포와 비교하여). 비-분열 세포는 비-상동 단부 결합(NHEJ)이 세포에서 이중 가닥 DNA 절단부가 수리되는 1차 메커니즘인 세포를 지칭할 수 있다(예를 들어, 대조군 분열 세포와 비교하여). 비-분열 세포 유형은 예를 들어, 활성 NHEJ 이중 가닥 DNA 절단부 수선 메커니즘에 의해 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌[DNA Repair (Amst.) 2013, 12(8): 620-636]을 참조한다.

[0526] ***III. F9 핵산을 도입, 통합, 또는 발현하는 방법, 또는 혈우병 B 또는 FIX 결핍의 치료를 위한 방법***

[0527] 본원에 개시된 핵산 구조체 및 조성물은 *F9* 핵산을 세포 내로 도입하는 방법, *F9* 핵산을 표적 게놈 유전자좌에 통합하는 방법, 세포 내 FIX의 발현 방법 및 대상체에서 B형 혈우병 또는 FIX 결핍을 치료하는 방법에 사용될 수 있다. 본원에 개시된 핵산 구조체 및 조성물은 *F9* 핵산을 세포 또는 세포의 집단 또는 대상체 내로 도입하는 방법, *F9* 핵산을 표적 게놈 유전자좌에 삽입하거나 통합하는 방법, 세포 또는 세포의 집단 또는 대상체에서 FIX 단백질의 발현 방법, 및 대상체에서 B형 혈우병 또는 FIX 결핍을 치료하는 방법에 사용될 수 있다.

[0528] **A. B형 혈우병**

[0529] 본원에 개시된 조성물(예를 들어, *F9* 핵산 구조체, 또는 뉴클레아제 작용제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템) 와 조합된 *F9* 핵산 구조체는 FIX 결핍 또는 B형 혈우병의 치료에 유용하고/하거나 FIX 결핍 또는 B형 혈우병과 관련된 적어도 하나의 증상을 개선하는 데 유용하다. 마찬가지로, 본원에 개시된 조성물은 FIX 결핍 또는 B형 혈우병을 갖는 대상체를 치료하기 위한 약제학적 조성물 또는 약제의 제조에 사용될 수 있다.

[0530] ***증상 및 원인***. 지혈은 정상적인 조건에서 혈액을 유동적인 상태로 유지하고 혈관 손상 시 신속하게 혈전을 형성하기 위한 전응고와 항응고 활성 사이의 균형이다. 응고는 혈소판을 콜라겐 및 혈관외 조직 인자에 노출시키는 내피의 파괴에 의해 시작된다. 이는 FIX를 포함하는 응고 인자의 활성화 캐스케이드를 초래하고, 피브린 단량체의 활성화 및 중합이 플러그를 형성하여 혈류를 차단하고 지혈을 달성할 때까지 응고 반응을 증폭시킨다(**도 1**). 응고 과정은 응고 억제, 상처 치유, 응고 용해, 조직 재생 및 리모델링을 수반한다.

[0531] B형 혈우병은 X 염색체에 존재하는 *F9* 유전자의 유전적 또는 자발적 열성 돌연변이에 의해 발생하는 희귀 선천성 장애로, FIX 단백질이 오작동하거나 결핍된 상태로 발현된다. 기능성 FIX 단백질의 부재는 응고 캐스케이드

를 방해하고 혈전의 정상적인 형성을 크게 제한하여 비정상적인 출혈을 초래한다. 변이체의 열성 특성으로 인해, 혈우병은 보통 남성에게만 영향을 미치지만, 여성 보균자는 경증에서 중등도의 증상을 경험할 수 있으며 치료가 필요할 수 있다.

[0532] 혈우병은 보통 모체 X 염색체에서 유전되지만, 중증 B형 혈우병으로 새로 진단받은 사람의 43%가 혈우병의 이전 가족력이 없다는 전향적 연구 결과가 보고되고 있다. 예를 들어, 문헌[Srivastava et al. (2020) *Haemophilia* 26.6:1-158] 및 문헌[Kasper et al. (2007) *Haemophilia* 13:90-92]을 참조하며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 세계혈우병연맹이 2019년에 실시한 연간 글로벌 설문조사(Annual Global Survey) 보고서에 따르면 전 세계에서 31,997명의 환자가 B형 혈우병과 함께 살고 있으며, 4,093명의 환자가 미국에 살고 있다. 예를 들어, 세계혈우병연맹, "Report on the Annual Global Survey 2019" World Federation of Hemophilia (2020)을 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 전 세계적으로 B형 혈우병의 추정 발병률(출생 시 유병률)은 남성 100,000명당 5.0명, 중증 B형 혈우병은 남성 100,000명당 1.5명이다. 혈우병이 있는 사람들의 사망률이 더 높은 까닭에, 연령대별 추정 유병률은 남성 100,000명당 1.1명을 포함해 남성 100,000명당 3.8명으로 더 낮다. 예를 들어, 세계혈우병연맹, "Report on the Annual Global Survey 2019" World Federation of Hemophilia (2020)을 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0533] 혈우병 및 출혈 징후의 중증도는 응고 인자의 활성 수준의 정도와 상관관계가 있다(**표 8**). 예를 들어, 문헌[Srivastava et al. (2020) *Haemophilia* 26.6:1-158]을 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 고소득 시장의 경우, B형 혈우병 환자의 34%가 경증 혈우병, 약 31%가 중등도 혈우병, 33%가 중증 혈우병인 것으로 추정된다. 예를 들어, 세계혈우병연맹, "Report on the Annual Global Survey 2019" World Federation of Hemophilia (2020)을 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0534] [표 8]

응고 인자 활성 수준에 기초한 B형 혈우병의 중증도 분류.

중증도	FIX 활동 레벨	임상 증상
경증	정상의 6% 내지 49%, 0.06IU/mL 내지 0.40IU/mL	심각한 부상, 외상, 또는 수술 후에만 전형적으로 출혈을 경험함 성인이 될 때까지 잘 진단될 수 없음. 자연적 출혈은 희귀하지만, 정상 FIX 활성 수준의 약 15% 내지 30% 미만인 환자에서 발생할 수 있다.
중등도	정상의 1% 내지 5%, 0.01IU/mL 내지 0.05IU/mL	출혈은 드물게 일어나고, 경미한 수술 또는 손상 후에 장기간 출혈을 경험한다. 자연적 출혈은 일반적으로 한 달에 1 회 미만으로 발생할 수 있다.
중증	정상의 1% 미만, 0.01IU/mL 미만	손상 후 출혈을 경험하고, 그들의 관절 및 근육을 포함하여 한 달에 여러 번 자연적 출혈이 빈번하게 발생할 수 있다.

[0535]

[0536] B형 혈우병의 임상 증상은 쉽게 멍이 들거나 관절, 근육 및 연조직에서의 "자연적" 출혈, 통증, 외상 또는 수술에 따른 과다 출혈, 생명을 위협하는 두개내 출혈의 관찰을 포함한다.

[0537] 자연성 출혈은 관절에서 가장 흔하게 발생하며 무릎(전체 출혈 사건의 50% 이상), 팔꿈치, 발목, 어깨 및 손목이 가장 큰 영향을 받는다. 관절 내 출혈의 재발은 관절의 부종을 동반한 염증, 연골의 퇴화, 혈우병성관절증이라는 관절 공간의 점진적인 파괴를 초래한다. 관절병증이 관절에서 발생함에 따라, 정상적인 체중 부하와 같은 최소한의 관절 스트레스가 가해져도 출혈이 점점 잦아져 만성 활막염, 통증, 섬유증 및 진행성 관절강직으로 이어진다. 혈우병성관절증의 마지막 단계에서, 연골의 진행성 및 미란성 파괴는 관절 공간을 좁게 만들어 관절의 붕괴 또는 경화로 이어진다.

[0538] 근육내 출혈은 출혈 사건의 30%를 나타낸다. 근막 근육과 같은 한정된 공간에 국한될 때, 이는 허혈, 괴저, 수축 및 신경병증을 동반한 중요 구조의 상당한 압축으로 이어질 수 있다. 골반 공간에서의 출혈은 신경병증이 발생하는 경우 잠재적인 영구 장애로 이어지는 대퇴 신경 압박으로 이어질 수 있다. 예를 들어, 문헌[Napolitano et al., "Chapter 3 - Hemophilia A and Hemophilia B," Consultative Hemostasis and Thrombosis, Elsevier 4(2019):39-58]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0539] 기침이나 구토와 같은 경미한 외상 후에도 코피, 경구 및 위장 출혈이 발생할 수 있다. 복벽에서 또는 장벽에서 출혈이 발생하여 예를 들어 맹장염으로 종종 오진되는 심한 통증을 일으킬 수도 있다. 예를 들어, 문헌[Hoots et al., "Clinical manifestations and diagnosis of hemophilia" UptoDate (2019)]을 참조하며, 이는

그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 혈뇨는 중증 혈우병의 빈번한 징후이지만, 보통 양성이고 신장 기능의 점진적인 손실과 관련이 없다. 예를 들어, 문헌[Hoots et al., "Clinical manifestations and diagnosis of hemophilia" UptoDate (2019)]을 참조하며, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0540] 두개내 출혈은 혈우병이 있는 개체의 대략 2.7%에서 발생하는 것으로 추정되고, 영향을 받는 성인의 50%에서 자연적이다. 낮은 발생률에도 불구하고, 두개내 출혈은 혈우병 환자의 출혈로 인한 사망의 가장 흔한 원인이다. 예를 들어, 문헌[Napolitano et al., "Chapter 3 - Hemophilia A and Hemophilia B," Consultative Hemostasis and Thrombosis, Elsevier 4(2019):39-58]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0541] B형 혈우병 환자의 전체 기대 수명은 환자가 적절한 치료를 받는지 여부에 따라 다르다. 미국에서 사용 가능한 것과 같은 예방 및 주문형 치료를 통해, 2018년 네덜란드에서 수행된 연구에서 평균 기대 수명은 건강한 남성(77세 대 83세)보다 6년 적은 것으로 나타났다. 예를 들어, 문헌[Hassan et al. (2021) *J. Thromb. Haemost.* 19:645− 653]을 참조하고, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0542] ***진단.*** 중증 B형 혈우병이 있는 환자는 보통 임상 특징에 기초하여 2세 이전에 진단되는 반면, 경증 혈우병이 있는 환자는 출혈 증상이 손상 또는 수술 시에 나타나면 더 나이든 연령에서 진단될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Berntorp et al. (2021) *Nat. Rev. Dis. Primers* 7.45]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0543] 일반적인 혈우병의 진단은 먼저 임상적 특징에 기초하며, 이어서 정상 혈소판 수, 정상 프로트롬빈 시간(PT) 검정 그러나 장기간 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(APTT)으로 시험 결과를 스크리닝함으로써 확인된다. 예를 들어, 문헌[Srivastava et al. (2020) *Haemophilia* 26.6:1-158 and Hoots et al., "Clinical manifestations and diagnosis of hemophilia" UptoDate (2019)]을 참조하며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. B형 혈우병의 최종 진단은 정상의 40% 미만의 FIX 활성 수준을 측정하는 1단계 FIX 검정의 결과에 기초한다. 예를 들어, 문헌[Srivastava et al. (2020) *Haemophilia* 26.6:1-158]을 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 드문 환경에서, 혈우병 B 환자의 FIX 활성 수준은 40% 이상일 수 있고, 병원성 FIX 수준이 조사될 수 있다.

[0544] 질환 생물학을 정의하고, 어려운 경우에 진단을 확립하고, 억제제 개발의 위험을 예측하고, 여성 보균자를 식별하고, 원하는 경우 산전 진단을 제공하기 위해 유전자 진단이 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Srivastava et al. (2020) *Haemophilia* 26.6:1-158]을 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 유전자 시험이 항상 정확한 돌연변이를 확인할 수 있는 것은 아니지만, 98%의 경우 *F9* 유전자에서 B형 혈우병을 담당하는 돌연변이가 확인되는 것으로 추정된다. 예를 들어, 문헌[Carcao et al., "Hemophilia A and B" Hematology, Elsevier 7(2018):2001-2022]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 신생아는 인자 IX 수준을 측정하기 위해 혈액 시험을 통해 B형 혈우병에 대해 시험될 수 있다. 예를 들어, 혈액은 탯줄로부터 흡인될 수 있다.

[0545] ***치료 및 미충족된 의료적 필요성.*** 혈우병 B 치료의 주요 목적은 급성 출혈의 예방 또는 치료를 위해 결손된 혈액 응고 인자를 지혈적으로 적절한 혈장 수준으로 대체함으로써 출혈을 방지하거나 치료하는 것이다. 예를 들어, 문헌[Napolitano et al., "Chapter 3 - Hemophilia A and Hemophilia B," Consultative Hemostasis and Thrombosis, Elsevier 4(2019):39-58]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0546] 현재의 치료 기준은 혈우병 B의 예방 또는 치료를 위해 혈장 유래 또는 재조합 FIX 응고 인자 농축물(CFC)을 사용하는 것이다. 예를 들어, 문헌[Srivastava et al. (2020) *Haemophilia* 26.6:1-158]을 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. FIX 수준을 1% 넘게 유지하기 위해 중등도에서 중증의 B형 혈우병 환자에서 자연적 출혈을 예방하기 위해 CFC를 정기적으로 투여하여 예방하는 것이 추천된다. 경미하거나 중등도의 출혈을 조절하거나 재발성 자연적 출혈을 예방하기 위해서는 정상의 30% 내지 50% 수준의 FIX 활성 수준이 필요하며(문헌[Srivastava et al. (2020) *Haemophilia* 26.6:1-158]), 이는 혈우병 치료 전문 의사의 관리 하에 이루어지는 주당 2회 내지 3회의 표준 FIX CFC 정맥 주입을 나타낸다. 예를 들어, 문헌[Srivastava et al. (2020) *Haemophilia* 26.6:1-158] 및 문헌[*Powell et al. (2013) N. Engl. J. Med.* 369.24:2313-2323]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 연장된 반감기 CFC는 매주 또는 2주마다로 투여 빈도를 감소시키기 위해 개발되었다. 예를 들어, 문헌[Powell et al. (2013) *N. Engl.*

J. Med. 369.24:2313-2323]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 예방의 시작은 가능한 한 빨리, 그리고 바람직하게는 3세 이전에 권장되는데, 이는 시작 시 연령이 장기간 임상 결과의 강력한 예측 변수인 것으로 입증되었기 때문이다. 예를 들어, 문헌[Srivastava et al. (2020) *Haemophilia* 26.6:1-158]을 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 신생아기 및 유아기 동안의 환자에 대한 유전자 요법은 혈우병성관절증 및 두개내 출혈과 같은 비가역적 증상 및 생명을 위협하는 사건을 방지할 수 있다.

[0547] 일시적, 또는 주문형 요법은 정상 FIX 활성의 50% 내지 100%의 경우 수준이 달성되어야 하고 최소 7일 내지 10일 동안 유지되어야 하는 출혈 또는 외과 시술의 경우에 예방에 추가될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Carcao et al., "Hemophilia A and B" Hematology, Elsevier 7(2018):2001-2022], 및 문헌[Napolitano et al., "Chapter 3 - Hemophilia A and Hemophilia B," Consultative Hemostasis and Thrombosis, Elsevier 4(2019):39-58]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 주문형 요법은 자연적 출혈을 겪지 않는 B형 혈우병의 중등도 형태를 갖는 환자에 대한 유일한 치료일 수 있다. 예를 들어, 문헌[Srivastava et al. (2020) *Haemophilia* 26.6:1-158]을 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0548] 예방 처리에 대한 높은 순응도를 갖는 환자는 더 낮은 수준의 연간 출혈률(ABR)을 갖는 것으로 관찰되었다. rCFC의 효능에 대한 최근 연구는 연구 전반에 걸쳐 평균 ABR이 0 내지 4의 범위임을 관찰하였다. 예를 들어, 문헌[Davis et al. (2019) *J. Med. Econ.* 22.10:1014-1021] 및 문헌[Chhabra (2020) *Blood Coagul. Fibrinolysis* 31.3:186-192]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0549] 약리학적 치료 외에도 혈우병과 관련된 환자의 치료 및 교육을 지원하는 다학제적 팀이 설치되며, 일반적으로 적어도 혈액학자, 간호사, 물리치료사로 구성된다.

[0550] 미국에서 CFC의 사용은질병의 전반적인 경과를 변화시켰지만, B형 혈우병 환자에 대한 충족되지 않은 의학적 필요성이 남아 있다. 첫 번째로, CFC로부터 투여되는 외인성 FIX에 대한 중화 항체의 개발은 출혈을 치료하는 능력을 크게 방해할 수 있는 중증 FIX 결핍을 갖는 개체의 대략 10% 서 일어나는 것으로 보고되었다. 예를 들어, 문헌[Male et al. (2021) *Hemophilia* 106.1:123-129]을 참조하며, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 두 번째로, 전담 센터에서 매주 여러 번의 주사 또는 2주마다 주사를 맞아야 하는 예방 치료는 환자에게 상당한 치료 부담을 주고 의료 시스템과 사회에 현저한 경제적 부담을 준다. 예를 들어, 문헌[Burke et al. (2021) *Orphanet. J. Rare Dis.* 16:143]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 예방이 자연적 관절 출혈의 위험을 낮추지만, 이는 완전히 제거되지 않고 남아있는 만성 통증 및 장애를 초래한다. 예를 들어, 문헌[Burke et al. (2021) *Orphanet. J. Rare Dis.* 16:143]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 따라서, 장기적으로 기능성 FIX 단백질의 지속적인 혈장 수준을 유도하는 치료가 여전히 필요하다.

[0551] 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터 유전자 요법은 B형 혈우병에 대해 조사되어 있다. 임상 시험 데이터는 일부 환자에서 FIX의 지속적인 내인성 생성을 입증하며, 이는 대체 FIX의 주입에 대한 필요성의 제거를 초래한다. 예를 들어, 문헌[Von Drygalski (2020) *Blood* 136(supp 1):13]을 참조하며, 이의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 그러나, FIX의 AAV 발현은 에피솜이므로, 효능에 대한 추가 장기간 데이터가 생성될 때까지 발현의 내구성이 알려져 있지 않다.

[0552] 몇몇 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터 에피솜 유전자 요법은 B형 혈우병에 대한 3상 조사 하에 있다. 이러한 rAAV 벡터는 염색체외 원형 에피솜으로서 유지될 간세포의 핵에 대해 간 특이적 프로모터와 연관된 코돈-최적화된 파두아(Padua) 변이체 인간 *F9* 유전자를 전달한다. 생성된 발현된 파두아 FIX 단백질은 야생형 FIX와 비교하여 FIX 특이적 활성에서 8배 증가를 갖는 것으로 추정된 야생형 FIX 단백질의 변이체이다. 예를 들어, 문헌[VandenDriessche et al. (2018) *Mol. Ther.* 26.1:14-16]을 참조하고, 이는 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 그러나, FIX의 AAV 발현은 에피솜이므로, 효능에 대한 추가 장기간 데이터가 생성될 때까지 발현의 내구성이 알려져 있지 않다.

[0553] **B. 방법**

[0554] *F9* 핵산을 세포 내로 도입하는 방법, *F9* 핵산을 표적 게놈 유전자좌에 통합하는 방법, 세포 내 FIX의 발현 방법 및 대상체에서 B형 혈우병 또는 FIX 결핍을 치료하는 방법이 제공된다. *F9* 핵산을 세포 또는 세포의 집단 내로 (또는 대상체에서 세포 또는 세포의 집단 내) 도입하는 방법, *F9* 핵산을 세포 또는 세포의 집단 내(또는 대상체

에서 세포 또는 세포의 집단 내) 표적 게놈 유전자좌에 삽입하는 방법, 세포 또는 세포의 집단 내(또는 대상체에서 세포 또는 세포의 집단 내) FIX 단백질의 발현 방법, 대상체에서 B형 혈우병 또는 FIX 결핍을 치료하는 방법이 제공된다.

[0555] 세포 또는 세포의 집단은 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단일 수 있고, 대상체는 일부 방법에서 신생아 대상체일 수 있다. 신생아 대상체는 최대 1년(52주) 또는 그 이하의 연령, 바람직하게는 최대 24주 또는 그 이하의 연령, 더 바람직하게는 최대 12주 또는 그 이하의 연령, 더욱 바람직하게는 최대 8주 또는 그 이하의 연령, 보다 더 바람직하게는 최대 4주 또는 그 이하의 연령의 인간 대상체일 수 있다. 특정 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 최대 4주령이다. 특정 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 최대 8주령이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 3주 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 2주 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 1주 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 7일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 6일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 5일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 4일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 3일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 2일 이내이다. 또 다른 구현예에서, 신생아 인간 대상체는 출생 후 1일 이내이다. 상기 개시된 시간 범위는 인간 대상체에 대한 것이며, 또한 다른 동물에 대한 대응하는 발달 시간 범위를 포괄하도록 의도된다. 본원에 사용되는 바와 같이, "신생아 세포"는 신생아 대상체의 세포이고, 신생아 세포의 집단은 신생아 대상체의 세포의 집단이다.

[0556] 세포 또는 세포의 집단은 청소년 세포 또는 청소년 세포의 집단일 수 있고, 대상체는 일부 방법에서 청소년 대상체일 수 있다. 인간의 맥락에서 청소년 대상체는 18세 이하의 인간 대상체를 포괄한다. 일 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 17년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 16년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 15년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 14년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 13년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 12년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 11년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 10년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 9년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 8년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 7년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 6년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 5년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 4년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 3년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 2년 이내인 대상체이다. 또 다른 구현예에서, 인간 청소년 대상체는 출생 후 1년 이내인 대상체이다. 상기 개시된 시간 범위는 인간 대상체에 대한 것이며, 또한 다른 동물에 대한 대응하는 발달 시간 범위를 포괄하도록 의도된다. 본원에 사용되는 바와 같이, 청소년 세포는 청소년 대상체의 세포이고, 청소년 세포의 집단은 청소년 대상체의 세포 집단이다.

[0557] 일부 방법에서, 대상체는 활발하게 성장하는 간을 갖거나, 세포 또는 세포의 집단은 활발하게 성장하는 간으로부터 유래된다. 다른 방법에서, 대상체는 활발하게 성장하는 간을 갖지 않거나, 세포 또는 세포의 집단은 활발하게 성장하는 간으로부터 유래되지 않는다.

[0558] 일례에서, *F9* 핵산을 세포 또는 이를 필요로 하는 대상체 내로 도입하는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법은 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체 중 임의의 것(또는 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체를 포함하는, 예를 들어 벡터 또는 지질 나노입자를 포함하는 조성물 중 임의의 것)을 세포에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. *F9* 핵산 구조체는 본원에 기재된 뉴클레아제 작용제와 함께 투여될 수 있거나, 단독으로 투여될 수 있다. 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체는 본원에 기재된 뉴클레아제 작용제와 함께 투여될 수 있다. 뉴클레아제 작용제는 표적 유전자 내의 뉴클레아제 표적 서열을 절단하여 절단 부위를 생성할 수 있고, *F9* 핵산 구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 표적 유전자를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 표적 유전자로부터 발현될 수 있다. FIX 코딩 서열은 표적 게놈 유전자좌 내로의 통합 시 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있거나, 이는 핵산 구조체에 존재하는 외인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일례에서, 뉴클레아제 작용제는 CRISPR/Cas 시스템이고, 표적 유전자는 *ALB*(예를 들어, *ALB*의 인트론 1)이다. 이러한 방법에서, 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합할 수 있고, Cas 단백질을 *ALB* 유전자의 인트론 1에서 가이드 RNA 표적 서열로 표적화할 수 있고, Cas 단백질은 가이드 RNA 표적 서열을 절단하여 절단 부위를 생성할 수 있고, 핵산

구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 *ALB* 유전자를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 *ALB* 유전자로부터 발현될 수 있다.

[0559] 일례에서, *F9* 핵산을 세포 또는 세포의 집단 또는 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 대상체에서 세포 또는 세포의 집단 내)에 도입하는 방법이 본원에 제공된다. 세포 또는 세포의 집단은 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단일 수 있고, 대상체는 일부 방법에서 신생아 대상체일 수 있다. 다른 방법에서, 세포 또는 세포의 집단은 신생아 세포가 아니고, 신생아 세포의 집단이 아니고, 대상체는 신생아 대상체가 아니다. 세포 또는 세포의 집단은 청소년 세포 또는 청소년 세포의 집단일 수 있고, 대상체는 일부 방법에서 청소년 대상체일 수 있다. 다른 방법에서, 세포 또는 세포의 집단은 청소년 세포가 아니고, 청소년 세포의 집단이 아니고, 대상체는 청소년 대상체가 아니다. 이러한 방법은 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체 중 임의의 것(또는 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체를 포함하는, 예를 들어 벡터 또는 지질 나노입자를 포함하는 조성물 중 임의의 것)을 세포에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. *F9* 핵산 구조체는 본원에 기재된 뉴클레아제 작용제와 함께 투여될 수 있거나, 단독으로 투여될 수 있다. 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체는 본원에 기재된 뉴클레아제 작용제와 함께(예를 들어, 임의의 순서로 동시에 또는 순차적으로) 투여될 수 있다. 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌(예를 들어, 표적 유전자) 내의 뉴클레아제 표적 서열을 절단할 수 있고, *F9* 핵산 구조체를 표적 게놈 유전자좌에 삽입하여 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현될 수 있다. *F9* 코딩 서열은 표적 게놈 유전자좌 내로의 통합 시 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있거나, 이는 핵산 구조체에 존재하는 외인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일례에서, 뉴클레아제 작용제는 CRISPR/Cas 시스템이고, 표적 유전자는 *ALB*(예를 들어, *ALB*의 인트론 1)이다. 이러한 방법에서, 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합할 수 있고, Cas 단백질을 *ALB* 유전자의 인트론 1에서 가이드 RNA 표적 서열로 표적화할 수 있고, Cas 단백질은 가이드 RNA 표적 서열을 절단할 수 있고, 핵산 구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 *ALB* 유전자를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 *ALB* 유전자로부터 발현될 수 있다.

[0560] 다른 예에서, 세포에서 FIX를 발현하는 방법 또는 이를 필요로 하는 대상체가 본원에 제공된다. 이러한 방법은 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체 중 임의의 것(또는 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체를 포함하는, 예를 들어 벡터 또는 지질 나노입자를 포함하는 조성물 중 임의의 것)을 세포에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체 또는 *F9* 핵산 구조체를 포함하는 조성물은 뉴클레아제 작용제 없이 투여될 수 있다(예를 들어, *F9* 핵산 구조체가 표적 게놈 유전자좌로의 통합 없이 FIX의 발현에 필요한 요소를 포함하는 경우). 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체는 본원에 기재된 뉴클레아제 작용제와 함께 투여될 수 있다. 뉴클레아제 작용제는 표적 유전자 내의 뉴클레아제 표적 서열을 절단하여 절단 부위를 생성할 수 있고, *F9* 핵산 구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 표적 유전자를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 표적 유전자로부터 발현될 수 있다. FIX 코딩 서열은 표적 게놈 유전자좌 내로의 통합 시 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있거나, 이는 핵산 구조체에 존재하는 외인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일례에서, 뉴클레아제 작용제는 CRISPR/Cas 시스템이고, 표적 유전자는 *ALB*(예를 들어, *ALB*의 인트론 1)이다. 이러한 방법에서, 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합할 수 있고, Cas 단백질을 *ALB* 유전자의 인트론 1에서 가이드 RNA 표적 서열로 표적화할 수 있고, Cas 단백질은 가이드 RNA 표적 서열을 절단하여 절단 부위를 생성할 수 있고, 핵산 구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 *ALB* 유전자를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 *ALB* 유전자로부터 발현될 수 있다.

[0561] 또 다른 예에서, 세포 또는 세포의 집단 또는 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 대상체에서 세포 또는 세포의 집단)에서 FIX 단백질을 발현하는 방법이 본원에 제공된다. 세포 또는 세포의 집단은 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단일 수 있고, 대상체는 일부 방법에서 신생아 대상체일 수 있다. 다른 방법에서, 세포 또는 세포의 집단은 신생아 세포가 아니고, 신생아 세포의 집단이 아니고, 대상체는 신생아 대상체가 아니다. 세포 또는 세포의 집단은 청소년 세포 또는 청소년 세포의 집단일 수 있고, 대상체는 일부 방법에서 청소년 대상체일 수 있다. 다른 방법에서, 세포 또는 세포의 집단은 청소년 세포가 아니고, 청소년 세포의 집단이 아니고, 대상체는 청소년 대상체가 아니다. 이러한 방법은 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체 중 임의의 것(또는 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체를 포함하는, 예를 들어 벡터 또는 지질 나노입자를 포함하는 조성물 중 임의의 것)을 세포에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체 또는 *F9* 핵산 구조체를 포함하는 조성물은 뉴클레아제 작용제 없이 투여될 수 있다(예를 들어, *F9* 핵산 구조체가 표적 게놈 유전자좌로의 통합 없이 FIX 단백질의 발현에 필요한 요소를 포함하는 경우). 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체는 본원에 기재된 뉴클레아제 작용제와 함께(예를 들어, 임의의 순서로 동시에 또는 순차적으로) 투여될 수 있다. 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌(예를 들어, 표적 유전자) 내의 뉴클레아제 표적 서열을 절단할 수 있고, *F9* 핵산 구조체를 표적 게놈 유전자좌에 삽입하여 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 표적 게놈 유전

자좌로부터 발현될 수 있다. *F9* 코딩 서열은 표적 게놈 유전자좌 내로의 통합 시 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있거나, 이는 핵산 구조체에 존재하는 외인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일례에서, 뉴클레아제 작용제는 CRISPR/Cas 시스템이고, 표적 유전자는 *ALB*(예를 들어, *ALB*의 인트론 1)이다. 이러한 방법에서, 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합할 수 있고, Cas 단백질을 *ALB* 유전자의 인트론 1에서 가이드 RNA 표적 서열로 표적화할 수 있고, Cas 단백질은 가이드 RNA 표적 서열을 절단할 수 있고, 핵산 구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 *ALB* 유전자를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 *ALB* 유전자로부터 발현될 수 있다.

[0562] 또 다른 예에서, 세포 내 표적 게놈 유전자좌 또는 이를 필요로 하는 대상체로의 *F9* 핵산 구조체를 통합하는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법은 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체 중 임의의 것(또는 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체를 포함하는, 예를 들어 벡터 또는 지질 나노입자를 포함하는 조성물 중 임의의 것)을 세포에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체 또는 *F9* 핵산 구조체를 포함하는 조성물은 본원에 기재된 뉴클레아제 작용제와 함께 투여될 수 있다. 뉴클레아제 작용제는 표적 유전자 내의 뉴클레아제 표적 서열을 절단하여 절단 부위를 생성할 수 있고, *F9* 핵산 구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 표적 유전자를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 표적 유전자로부터 발현될 수 있다. FIX 코딩 서열은 표적 게놈 유전자좌 내로의 통합 시 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있거나, 이는 핵산 구조체에 존재하는 외인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일례에서, 뉴클레아제 작용제는 CRISPR/Cas 시스템이고, 표적 유전자는 *ALB*(예를 들어, *ALB*의 인트론 1)이다. 이러한 방법에서, 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합할 수 있고, Cas 단백질을 *ALB* 유전자의 인트론 1에서 가이드 RNA 표적 서열로 표적화할 수 있고, Cas 단백질은 가이드 RNA 표적 서열을 절단하여 절단 부위를 생성할 수 있고, 핵산 구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 *ALB* 유전자를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 *ALB* 유전자로부터 발현될 수 있다.

[0563] 또 다른 예에서, *F9* 핵산 구조체를 세포 또는 세포의 집단 또는 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 대상체에서 세포 또는 세포의 집단 내) 내 표적 세포 유전자좌 내로 삽입하거나 통합하는 방법이 본원에 제공된다. 세포 또는 세포의 집단은 신생아 세포 또는 신생아 세포의 집단일 수 있고, 대상체는 일부 방법에서 신생아 대상체일 수 있다. 다른 방법에서, 세포 또는 세포의 집단은 신생아 세포가 아니고, 신생아 세포의 집단이 아니고, 대상체는 신생아 대상체가 아니다. 세포 또는 세포의 집단은 청소년 세포 또는 청소년 세포의 집단일 수 있고, 대상체는 일부 방법에서 청소년 대상체일 수 있다. 다른 방법에서, 세포 또는 세포의 집단은 청소년 세포가 아니고, 청소년 세포의 집단이 아니고, 대상체는 청소년 대상체가 아니다. 이러한 방법은 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체 중 임의의 것(또는 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체를 포함하는, 예를 들어 벡터 또는 지질 나노입자를 포함하는 조성물 중 임의의 것)을 세포에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체 또는 *F9* 핵산 구조체를 포함하는 조성물은 본원에 기재된 뉴클레아제 작용제와 함께(예를 들어, 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로) 투여될 수 있다. 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌(예를 들어, 표적 유전자) 내의 뉴클레아제 표적 서열을 절단할 수 있고, *F9* 핵산 구조체를 표적 게놈 유전자좌에 삽입하여 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현될 수 있다. *F9* 코딩 서열은 표적 게놈 유전자좌 내로의 통합 시 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있거나, 이는 핵산 구조체에 존재하는 외인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일례에서, 뉴클레아제 작용제는 CRISPR/Cas 시스템이고, 표적 유전자는 *ALB*(예를 들어, *ALB*의 인트론 1)이다. 이러한 방법에서, 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합할 수 있고, Cas 단백질을 *ALB* 유전자의 인트론 1에서 가이드 RNA 표적 서열로 표적화할 수 있고, Cas 단백질은 가이드 RNA 표적 서열을 절단할 수 있고, 핵산 구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 *ALB* 유전자를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 *ALB* 유전자로부터 발현될 수 있다.

[0564] 임의의 상기 방법에서, 세포는 진핵 세포 또는 포유류 세포(예를 들어, 비인간 포유류 세포 또는 인간 세포)와 같은 임의의 적합한 화학종으로부터 유래될 수 있다. 포유류는 예를 들어, 비인간 포유류, 인간, 설치류, 래트, 마우스, 또는 햄스터일 수 있다. 다른 비인간 포유류는 예를 들어 비인간 영장류, 원숭이, 유인원, 고양이, 개, 토끼, 말, 황소(bull), 사슴, 들소, 가축(예를 들어, 소, 황소(steer) 등과 같은 소 종; 양, 염소 등과 같은 양 종; 및 돼지 및 야생돼지와 같은 돼지 종)이 포함된다. 조류는 예를 들어, 닭, 칠면조, 타조, 거위, 오리 등을 포함한다. 사육 동물 및 농장 동물 또한 포함된다. 용어 "비인간"은 인간을 배제한다. 구체적인 예는 인간 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 및 비인간 영장류 세포를 포함하지만, 이로 한정되지 않는다. 구체적인 예에서, 세포는 인간 세포이다. 마찬가지로, 세포는 임의의 적합한 유형의 세포일 수 있다. 구체적인 예에서, 세포는 간세포와 같은 간 세포(예를 들어, 인간 간 세포 또는 인간 간세포)이다.

[0565] 세포는 단리된 세포(예를 들어, 시험관내)일 수 있거나, 생체내에서 동물 내에(즉, 대상체 내에) 존재할 수 있

다. 구체적인 예에서, 세포는 생체내(예를 들어, FIX 결핍 또는 혈우병(예를 들어, B형 혈우병)이 있는 대상체내)에 존재한다. 세포는 유사분열적으로(mitotically) 적격인(competent) 세포 또는 유사분열적으로-불활성 세포, 감수분열적으로(meiotically) 적격인 세포 또는 감수분열적으로-불활성 세포일 수 있다. 유사하게는, 세포는 또한 1차 체세포, 또는 1차 체세포가 아닌 세포일 수 있다. 체세포는 배우자(gamete), 생식 세포, 생식모세포(gametocyte), 또는 미분화된 줄기세포가 아닌 임의의 세포를 포함한다. 예를 들어, 세포는 간세포와 같은 간 세포(예를 들어, 마우스, 비인간 영장류, 또는 인간 간세포)일 수 있다.

[0566] 본원에 제공된 세포는 정상적인 건강한 세포일 수 있거나, 유병(diseased) 또는 돌연변이체-보유 세포일 수 있다. 예를 들어, 세포는 FIX 결핍을 가질 수 있거나, FIX 결핍 또는 혈우병을 갖는 대상체로부터 유래될 수 있다(예를 들어, B형 혈우병).

[0567] 세포는 분열 세포일 수 있다(예를 들어, 활발하게 분열하는 세포). 세포는 또한 비-분열 세포일 수 있다. 비-분열 세포는 말단 분화되고 분열하지 않는 세포뿐만 아니라 분열하지 않지만 세포 분열 및 증식을 재진입하는 능력을 유지하는 휴지 세포를 지칭한다. 예를 들어, 간 세포는 분열하는 능력을 유지하지만(예를 들어, 손상되거나 절제될 때), 전형적으로 분열하지 않는다. 유사분열 세포 분열 동안, 상동 재조합은 게놈이 보호되고 이중 가닥 절단부가 수리되는 메커니즘이다. 비-분열 세포는 상동 재조합(HR)이 세포에서 이중 가닥 DNA 절단부가 수리되는 1차 메커니즘이 아닌 세포를 지칭할 수 있다(예를 들어, 대조군 분열 세포와 비교하여). 비-분열 세포는 비-상동 단부 결합(NHEJ)이 세포에서 이중 가닥 DNA 절단부가 수리되는 1차 메커니즘인 세포를 지칭할 수 있다(예를 들어, 대조군 분열 세포와 비교하여). 비-분열 세포 유형은 예를 들어, 활성 NHEJ 이중 가닥 DNA 절단부 수선 메커니즘에 의해 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌[DNA Repair (Amst.) 2013, 12(8): 620-636]을 참조한다

[0568] 대상체에서 FIX 결핍을 치료하는 방법 및 대상체에서 B형 혈우병을 치료하는 방법 및 B형 혈우병을 갖는 대상체에서 자연적 출혈을 예방 또는 억제하는 방법이 또한 제공된다. B형 혈우병은 임의의 유형의 B형 혈우병(예를 들어, 경증 B형 혈우병, 중등도 B형 혈우병, 또는 중증 B형 혈우병)일 수 있다. B형 혈우병은 본원 어디에서나 더 상세히 기재되어 있다. 이러한 방법은 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체 중 임의의 것(또는 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체를 포함하는, 예를 들어 벡터 또는 지질 나노입자를 포함하는 조성물 중 임의의 것)을 대상체에 투여하여 대상체에서 치료적 유효 수준의 FIX 발현이 달성되도록 하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체 또는 *F9* 핵산 구조체를 포함하는 조성물은 뉴클레아제 작용제 없이 투여될 수 있다(예를 들어, *F9* 핵산 구조체가 표적 게놈 유전자좌로의 통합 없이 FIX의 발현에 필요한 요소를 포함하는 경우). 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체는 본원에 기재된 뉴클레아제 작용제와 함께 투여될 수 있다. 뉴클레아제 작용제는 표적 유전자 내의 뉴클레아제 표적 서열을 절단하여 절단 부위를 생성할 수 있고, *F9* 핵산 구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 표적 유전자를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 표적 유전자로부터 발현되어 대상체에서 치료적 유효 수준의 FIX 발현이 달성되도록 할 수 있다. FIX 코딩 서열은 표적 게놈 유전자좌 내로의 통합 시 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있거나, 이는 핵산 구조체에 존재하는 외인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일례에서, 뉴클레아제 작용제는 CRISPR/Cas 시스템이고, 표적 유전자는 *ALB*(예를 들어, *ALB*의 인트론 1)이다. 이러한 방법에서, 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합할 수 있고, Cas 단백질을 *ALB* 유전자의 인트론 1에서 가이드 RNA 표적 서열로 표적화할 수 있고, Cas 단백질은 가이드 RNA 표적 서열을 절단하여 절단 부위를 생성할 수 있고, 핵산 구조체는 절단 부위에 삽입되어 변형된 *ALB* 유전자를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 *ALB* 유전자로부터 발현되어 대상체에서 치료적 유효 수준의 FIX 발현이 달성되도록 할 수 있다.

[0569] 대상체에서 FIX 결핍을 치료하는 방법 및 대상체에서 B형 혈우병을 치료하는 방법 및 B형 혈우병을 갖는 대상체에서 자연적 출혈을 예방 또는 억제하는 방법이 또한 제공된다. 대상체는 일부 방법에서 신생아 대상체일 수 있다. 다른 방법에서, 대상체는 신생아 대상체가 아니다. 대상체는 일부 방법에서 청소년 대상체일 수 있다. 다른 방법에서, 대상체는 청소년 대상체가 아니다. B형 혈우병은 임의의 유형의 B형 혈우병(예를 들어, 경증 B형 혈우병, 중등도 B형 혈우병, 또는 중증 B형 혈우병)일 수 있다. B형 혈우병은 본원 어디에서나 더 상세히 기재되어 있다. 이러한 방법은 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체 중 임의의 것(또는 본원에 기재된 *F9* 핵산 구조체를 포함하는, 예를 들어 벡터 또는 지질 나노입자를 포함하는 조성물 중 임의의 것)을 대상체에 투여하여 대상체에서 치료적 유효 수준의 FIX 단백질 발현 또는 치료적 유효 수준의 순환 FIX 단백질이 달성되도록 하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체 또는 *F9* 핵산 구조체를 포함하는 조성물은 뉴클레아제 작용제 없이 투여될 수 있다(예를 들어, *F9* 핵산 구조체가 표적 게놈 유전자좌로의 통합 없이 FIX 단백질의 발현에 필요한 요소를 포함하는 경우). 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체는 본원에 기재된 뉴클레아제 작용제와 함

께(예를 들어, 임의의 순서로 동시에 또는 순차적으로) 투여될 수 있다. 뉴클레아제 작용제는 표적 게놈 유전자좌(예를 들어, 표적 유전자) 내의 뉴클레아제 표적 서열을 절단할 수 있고, *F9* 핵산 구조체는 표적 게놈 유전자좌에 삽입되어 변형된 표적 게놈 유전자좌를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 표적 게놈 유전자좌로부터 발현될 수 있다(예를 들어, 대상체에서 치료적 유효 수준의 FIX 단백질 발현 또는 치료적 유효 수준의 순환 FIX 단백질이 달성됨). *F9* 코딩 서열은 표적 게놈 유전자좌 내로의 통합 시 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있거나, 이는 핵산 구조체에 존재하는 외인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일례에서, 뉴클레아제 작용제는 CRISPR/Cas 시스템이고, 표적 유전자는 *ALB*(예를 들어, *ALB*의 인트론 1)이다. 이러한 방법에서, 가이드 RNA는 Cas 단백질에 결합할 수 있고, Cas 단백질을 *ALB* 유전자의 인트론 1에서 가이드 RNA 표적 서열로 표적화할 수 있고, Cas 단백질은 가이드 RNA 표적을 절단할 수 있고, 핵산 구조체는 *ALB* 유전자에 삽입되어 변형된 *ALB* 유전자를 생성할 수 있고, FIX 단백질은 변형된 *ALB* 유전자로부터 발현될 수 있다(예를 들어, 대상체에서 치료적 유효 수준의 FIX 단백질 발현 또는 치료적 유효 수준의 순환 FIX 단백질이 달성됨).

[0570] 치료는 대상체에서 질환 또는 장애를 위한 치료제의 임의의 투여 또는 적용을 지칭하며, 질환을 억제하거나, 그의 발생을 억제하거나, 질환의 하나 이상의 증상을 완화시키거나, 질환의 치료, 또는 질환의 하나 이상의 증상의 발생을 방지하는 것을 포함한다. 예를 들어, B형 혈우병의 치료는 B형 혈우병의 증상을 완화시키는 것을 포함할 수 있다. 하나의 구체적인 예에서, B형 혈우병을 갖는 대상에서 자연적 출혈을 예방 또는 억제하는 방법이 제공된다. B형 혈우병은 상기에 상세히 기재되어 있으며, *F9* 유전자 또는 FIX 폴리펩티드의 결손 또는 결함으로 인한 장애를 지칭한다. 장애는 유전적 그리고/또는 후천적(예를 들어, 유전자에서 자연적 돌연변이에 의해 야기됨) 조건을 포함한다. 결함 *F9* 유전자 또는 FIX 폴리펩티드는 혈장 내 FIX 수준의 감소 및/또는 FIX의 응고 활성의 감소를 초래할 수 있다. B형 혈우병은 경증, 중등도, 및 중증 B형 혈우병을 포함한다. 예를 들어, 약 1% 미만의 활성 인자를 갖는 개체는 중증 혈우병을 갖는 것으로 분류되고, 약 1% 내지 5% 활성 인자를 갖는 개체는 중등도 혈우병을 갖는 것으로 분류되고, 경증 혈우병을 갖는 것들은 약 5% 내지 40% 의 활성 응고 인자의 정상 수준을 갖는다. 본원에 사용되는 바와 같이, "정상" 또는 "건강한" 개체는 FIX 활성 및 항원 수준의 정상 풀링된 혈장 수준의 50% 내지 160%를 갖는 것들을 포함한다. 일례에서, 정상 혈장 FIX 수준은 약 3 내지 5 μg/mL이다. 구체적인 예에서, 정상 FIX 활성은 FIX 활성의 정상 풀링된 혈장 수준의 약 100%인 것으로 간주되거나, FIX 활성의 정상 풀링된 혈장 수준의 100%인 것으로 간주된다. 구체적인 예에서, 정상 혈장 FIX 수준은 약 5 μg/mL인 것으로 간주되거나, 5 μg/mL인 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, FIX(예를 들어, 순환 FIX)의 수준은 응고 및/또는 면역학적 검정에 의해 측정될 수 있다. FIX는 FIX-결핍 혈장의 응고 시간을 교정하는 환자의 혈장의 능력에 의해 결정될 수 있다.

[0571] 일부 방법에서, 치료적 유효량의 *F9* 핵산 구조체 또는 *F9* 핵산 구조체를 포함하는 조성물 또는 또는 *F9* 핵산 구조체 및 뉴클레아제 작용제의 조합(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)가 대상체에게 투여된다. 치료적 유효량은 그것이 투여되는 원하는 효과를 생성하는 양이다. 정확한 양은 치료의 목적에 따라 좌우될 것이며, 공지된 기술을 사용하여 당업자에 의해 확인될 수 있을 것이다. 예를 들어, 문헌[Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding]을 참조한다.

[0572] 본원에 개시된 조성물을 포함하는 치료적 또는 약제학적 조성물은 개선된 이전, 전달, 내성 등을 제공하기 위해 제형에 혼입된 적합한 담체, 부형제, 및 다른 작용제와 함께 투여될 수 있다. 다수의 적절한 제형은 모든 약제학적 화학에 공지된 공식으로 발견될 수 있다: 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA]. 또한 문헌[Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J. Pharm. Sci. Technol.* 52:238-311]을 참조한다.

[0573] 본원에 개시된 조성물은 FIX 결핍 또는 B형 혈우병의 증상 중 하나 이상의 중증도를 완화시키거나 예방하거나 감소시키기 위해 투여될 수 있다. 이러한 증상은 본원 어디에서나 더 상세히 기재된다.

[0574] 상기 방법 중 임의의 것에서 대상체는 FIX 결핍 또는 B형 혈우병의 개선 또는 치료를 필요로 할 수 있다. 상기 방법 중 임의의 것에서 대상체는 임의의 적합한 종, 예컨대 진핵생물 또는 포유류로부터 유래될 수 있다. 포유류는 예를 들어, 비인간 포유류, 인간, 설치류, 래트, 마우스, 또는 햄스터일 수 있다. 다른 비인간 포유류는 예를 들어 비인간 영장류, 원숭이, 유인원, 고양이, 개, 토끼, 말, 황소(bull), 사슴, 들소, 가축(예를 들어, 소, 황소(steer) 등과 같은 소 종; 양, 염소 등과 같은 양 종; 및 돼지 및 야생돼지와 같은 돼지 종)이 포함된다. 조류는 예를 들어, 닭, 칠면조, 타조, 거위, 오리 등을 포함한다. 사육 동물 및 농장 동물 또한 포함된다. 용어 "비인간"은 인간을 배제한다. 적합한 종의 구체적인 예는 인간, 설치류, 마우스, 래트, 및 비

인간 영장류를 포함하지만, 이로 한정되지 않는다. 구체적인 예에서, 대상체는 인간이다.

[0575] *F9* 핵산 구조체가 유전적으로 통합되는 방법에서, 유전자를 발현할 수 있는 임의의 표적 게놈 유전자좌, 예컨대 안전 항만 유전자좌(안전 항만 유전자) 또는 내인성 *F9* 유전자좌가 사용될 수 있다. 이러한 유전자좌는 본원 어디에서나 더 상세히 기재되어 있다. 구체적인 예에서, 표적 게놈 유전자좌는 내인성 *ALB* 유전자좌, 예컨대 내인성 인간 *ALB* 유전자좌이다. 예를 들어, 핵산 구조체는 내인성 ALB 유전자좌의 인트론 1에서 게놈적으로 통합될 수 있다. 그 후에, 내인성 *ALB* 엑손 1은 핵산 구조체 내 FIX 단백질에 대한 코딩 서열 내로 스플라이스될 수 있다.

[0576] 표적 게놈 유전자좌, 특히 내인성 *ALB* 유전자좌 내로의 FIX 코딩 서열을 포함하는 *F9* 핵산 구조체의 표적화된 삽입은 다수의 이점을 부여한다. 이러한 방법은 FIX 코딩 서열의 안정한 장기간 발현을 가능하게 하는 안정한 변형을 이끈다. *ALB* 유전자좌와 관련하여, 이러한 방법은 치료적 유효 수준의 발현을 달성하기 위해 내인성 *ALB* 프로모터 및 조절 영역을 활용할 수 있다. 예를 들어, 핵산 구조체 내 FIX 코딩 서열은 프로모터가 없는 유전자를 포함할 수 있고, 삽입된 핵산 구조체는 표적 게놈 유전자좌(예를 들어, *ALB* 유전자좌) 내 내인성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 내인성 프로모터의 사용은, 이것이 핵산 구조체에서 프로모터의 포함에 대한 필요성을 배제하여, 통상(예를 들어, AAV에서) 효율적으로 포장할 수 없는 더 큰 이식유전자의 포장을 가능하게 하기 때문에 유리하다. 대안적으로, 핵산 구조체 내 FIX 코딩 서열은 핵산 구조체 내 외인성 공여체 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 사용될 수 있는 프로모터의 유형의 예는 본원 어디에서나 개시되어 있다.

[0577] 임의로, 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 유전자(예를 들어, 내인성 *ALB* 유전자) 중 일부 또는 모두는 핵산 구조체로부터의 FIX 코딩 서열의 삽입 시 발현될 수 있다. 대안적으로, 일부 방법에서, 표적 게놈 유전자좌에서의 내인성 유전자 중 어느 것도 발현되지 않는다. 일례로, 핵산 구조체의 통합 후 변형된 표적 게놈 유전자좌(예를 들어, 변형된 *ALB* 유전자좌)는 내인성 분비 신호(예를 들어, 알부민 분비 신호) 및 핵산 구조체에 의해 인코딩되는 FIX 단백질을 포함하는 키메라 단백질을 인코딩할 수 있다. 또 다른 예에서, *ALB* 유전자좌의 제1 인트론이 표적화될 수 있다. *ALB*의 분비 신호 펩티드는 *ALB* 유전자의 엑손 1에 의해 인코딩된다. 이러한 시나리오에서, 스플라이스 수용체 및 FIX 코딩 서열을 보유하는 프로모터가 없는 카세트는 FIX 단백질의 발현 및 분비를 뒷받침할 것이다. 내인성 *ALB* 엑손 1과 통합된 FIX 코딩 서열 사이의 스플라이싱은 통합된 핵산 구조체에 의해 인코딩되는 FIX 단백질 서열에 작동 가능하게 연결된 엑손 1에 의해 인코딩되는 내인성 ALB 서열을 포함하는 키메라 mRNA 및 단백질을 형성한다.

[0578] *F9* 핵산 구조체는 본원 어디에서나 기재된 바와 같이 상동성 재조합(HR) 및 비-상동성 말단 접합(NHEJ)을 포함한 임의의 수단에 의해 표적 게놈 유전자좌 내로 삽입될 수 있다. 구체적인 예에서, *F9* 핵산 구조체는 NHEJ에 의해 삽입된다(예를 들어, 상동성 아암을 포함하지 않고, NHEJ에 의해 삽입됨).

[0579] 또 다른 구체적인 예에서, 핵산 구조체는 상동성-독립적 표적화된 통합(예를 들어, 방향성 상동성-독립적 표적화된 통합)을 통해 삽입될 수 있다. 예를 들어, 핵산 구조체 내 FIX 코딩 서열은 각각의 측면 상에서 뉴클레아제 제제에 대한 표적 부위(예를 들어, 표적 게놈 유전자좌에서와 동일한 표적 부위, 및 표적 게놈 유전자좌 내 표적 부위를 절단하는 데 사용되는 동일한 뉴클레아제 제제)에 의해 플랭킹될 수 있다. 그 후에, 뉴클레아제 제제는 FIX 코딩 서열을 플랭킹하는 표적 부위를 절단할 수 있다. 구체적인 예에서, 핵산 구조체는 AAV-매개 전달에 의해 전달되고, FIX 코딩 서열을 플랭킹하는 표적 부위의 절단은 AAV의 역위 말단 반복(ITR)을 제거할 수 있다. IRT의 제거는 성공적인 표적화를 평가하는 것을 더 용이하게 할 수 있는데, ITR의 존재는 반복된 서열로 인해 시퀀싱 노력을 방해할 수 있기 때문이다. 일부 방법에서, 표적 게놈 유전자좌 내 표적 부위(예를 들어, 플랭킹 프로토스페이서 인접 모티프를 포함하는 gRNA 표적 서열)는 FIX 코딩 서열이 표적 게놈 유전자좌 내로 올바른 배향으로 삽입된다면 더 이상 존재하지 않지만, FIX 단백질 코딩 서열이 표적 게놈 유전자좌 내로 반대 배향으로 삽입된다면 재형성된다. 이는 FIX 코딩 서열이 발현을 위해 올바른 배향으로 삽입되는 것을 보장하도록 도울 수 있다.

[0580] 상기 방법 중 임의의 것에서, *F9* 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)와 동시에 투여되거나 동시에(예를 들어, 순차적으로 임의의 조합으로) 투여될 수 있다. 예를 들어, F9 핵산 구조체 및 뉴클레아제 작용제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에서, 이들은 별도로 투여될 수 있다. 예를 들어, *F9* 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제 전에, 뉴클레아제 작용제 후에, 또는 뉴클레아제 작용제와 동시에 투여될 수 있다. 핵산 구조체 및 뉴클레아제 작용제를 세포에 투여하는 임의의 적합한 방법, 특히 간에 투여하는 방법이 사용될 수 있고, 이러한 방법의 예는 본원 어디에서나 더 상세히 기재된다. 치료하는 방법 또는

대상체의 생체내 세포를 표적화하는 방법에서, 핵산 구조체는 대상체 내 특정 유형의 세포에 삽입될 수 있다. F9 핵산 구조체를 대상체 내로 도입하기 위한 방법 및 비히클은 대상체에서 어떤 유형의 세포가 표적화되는지에 영향을 미칠 수 있다. 일부 방법에서, 예를 들어, 핵산 구조체는 간 세포, 예컨대 간세포 내의 표적 게놈 유전자좌(예를 들어, 내인성 *ALB* 유전자좌) 내로 삽입된다. 이러한 구조체 및 뉴클레아제 작용제를 대상체(지질 나노입자-매개 전달 및 AAV-매개 전달(예를 들어, rAAV8-매개 전달) 및 정맥내 주사와 같은 간 또는 간세포를 표적화하는 방법 및 비히클을 포함함)에 도입하기 위한 방법 및 비히클이 본원 어디에서나 더 상세히 개시된다.

[0581] 핵산 구조체(또는 벡터 또는 LNP) 및 뉴클레아제 작용제를 포함하는 조성물이 투여되는 방법(즉, 핵산 구조체(또는 벡터 또는 LNP) 및 뉴클레아제 작용제가 둘 모두 투여되는 방법)에서, 핵산 구조체 및 뉴클레아제 작용제는 동시에 투여될 수 있다. 대안적으로, 핵산 구조체 및 뉴클레아제 작용제는 임의의 순서로 순차적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제 후에 투여될 수 있거나, 뉴클레아제 작용제는 핵산 구조체 후에 투여될 수 있다. 예를 들어, 뉴클레아제 작용제는 핵산 구조체의 투여 전 또는 투여 후 약 1시간 내지 약 48시간, 약 1시간 내지 약 24시간, 약 1시간 내지 약 12시간, 약 1시간 내지 약 6시간, 약 1시간 내지 약 2시간, 약 2시간 내지 약 48시간, 약 2시간 내지 약 24시간, 약 2시간 내지 약 12시간, 약 2시간 내지 약 6시간, 약 3시간 내지 약 48시간, 약 6시간 내지 약 48시간, 약 12시간 내지 약 48시간, 또는 약 24시간 내지 약 48시간째에 투여될 수 있다.

[0582] 일례에서, 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제를 투여하기 약 4시간, 약 8시간, 약 12시간, 약 18시간, 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 또는 약 1주 전에 투여된다. 또 다른 예에서, 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제를 투여하기 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 적어도 약 18시간, 적어도 약 1일, 적어도 2일, 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 또는 적어도 약 1주 전에 투여된다. 또 다른 예에서, 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제를 투여하기 약 4시간 내지 약 24시간, 약 4시간 내지 약 12시간, 약 4시간 내지 약 8시간, 약 8시간 내지 약 24시간, 약 12시간 내지 약 24시간, 약 1일 내지 약 7일, 약 1일 내지 약 6일, 약 1일 내지 약 5일, 약 1일 내지 약 4일, 약 1일 내지 약 3일, 약 1일 내지 약 2일, 약 2일 내지 약 7일, 약 3일 내지 약 7일, 약 4일 내지 약 7일, 약 5일 내지 약 7일, 약 6일 내지 약 7일, 또는 약 1일 내지 약 3일 전에 투여된다.

[0583] 일례에서, 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제를 투여하기 약 4시간, 약 8시간, 약 12시간, 약 18시간, 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 또는 약 1주 후에 투여된다. 또 다른 예에서, 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제를 투여하기 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 적어도 약 18시간, 적어도 약 1일, 적어도 2일, 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 또는 적어도 약 1주 후에 투여된다. 또 다른 예에서, 핵산 구조체는 뉴클레아제 작용제를 투여하기 약 4시간 내지 약 24시간, 약 4시간 내지 약 12시간, 약 4시간 내지 약 8시간, 약 8시간 내지 약 24시간, 약 12시간 내지 약 24시간, 약 1일 내지 약 7일, 약 1일 내지 약 6일, 약 1일 내지 약 5일, 약 1일 내지 약 4일, 약 1일 내지 약 3일, 약 1일 내지 약 2일, 약 2일 내지 약 7일, 약 3일 내지 약 7일, 약 4일 내지 약 7일, 약 5일 내지 약 7일, 약 6일 내지 약 7일, 또는 약 1일 내지 약 3일 후에 투여된다.

[0584] 상기 방법 중 임의의 것에서, *F9* 핵산 구조체 및 뉴클레아제 작용제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)는 임의의 적합한 전달 시스템 및 공지된 방법을 사용하여 투여될 수 있다. 뉴클레아제 작용제 성분 및 *F9* 핵산 구조체(예를 들어, 가이드 RNA, Cas 단백질, 및*F9* 핵산 구조체)는 적절한 것과 동일하거나 상이한 전달 방법을 사용하여 개별적으로 또는 함께 임의의 조합으로 전달될 수 있다.

[0585] CRISPR/Cas 시스템이 사용되는 방법에서, 가이드 RNA는 예를 들어, RNA의 형태(예를 들어, 시험관내 전사된 RNA, 예컨대 본원에 개시된 변형된 가이드 RNA) 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA의 형태로 대상체 또는 세포에 도입되거나 투여될 수 있다. DNA의 형태로 도입될 때, 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA는 세포에서 또는 대상체 내 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA는 AAV를 통해 전달되고 U6 프로모터 하에 생체내에서 발현될 수 있다. 이러한 DNA는 하나 이상의 발현 구조체에 존재할 수 있다. 예를 들어, 이러한 발현 구조체는 단일 핵산 분자의 성분일 수 있다. 대안적으로, 이들은 2개 이상의 핵산 분자 중에서 임의의 조합으로 분리될 수 있다(즉, 하나 이상의 CRISPR RNA를 인코딩하는 DNA 및 하나 이상의 tracrRNA를 인코딩하는 DNA는 별개의 핵산 분자의 성분일 수 있음).

[0586] 마찬가지로, Cas 단백질은 임의의 형태로 대상체 또는 세포에 도입될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 단백질, 예컨대, gRNA와 복합체화된 Cas 단백질의 형태로 제공될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산, 예컨대, RNA(예를 들어, 메신저 RNA(mRNA)), 예컨대 본원에 개시된 바와 같은 변형된 mRNA,

또는 DNA)의 형태로 제공될 수 있다. 임의로, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 특정 세포 또는 유기체에서 단백질로의 효율적인 번역을 위해 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 자연 발생 폴리뉴클레오티드 서열과 비교하여, 포유류 세포, 인간 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 또는 임의의 다른 관심 숙주 세포에서 더 높은 사용 빈도를 갖는 코돈을 치환하도록 변형될 수 있다. Cas 단백질을 인코딩하는 핵산이 세포 또는 대상체 내로 도입될 때, Cas 단백질은 세포에서 또는 대상체 내 세포에서 일시적으로, 조건적으로, 또는 구성적으로 발현될 수 있다.

[0587] 일례에서, Cas 단백질은 mRNA(예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 변형된 mRNA)의 형태로 도입되고, 가이드 RNA는 본원에 개시된 바와 같은 변형된 gRNA와 같은 RNA의 형태로 도입된다(예를 들어, 동일한 지질 나노입자 내에서 함께). 가이드 RNA는 본원 어디에서나 개시된 바와 같이 변형될 수 있다. 마찬가지로, Cas mRNA는 본원 어디에서나 개시된 바와 같이 변형될 수 있다.

[0588] *F9* 핵산 구조체는 유전자 편집 시스템(예를 들어, Cas 단백질)에 의한 절단 후에 삽입되는 방법에서, 유전자 편집 시스템(예를 들어, Cas 단백질)은 표적 게놈 유전자좌를 절단하여 단일 가닥 절단부(닉) 또는 이중 가닥 절단부를 생성할 수 있으며, 절단된 또는 닉킹된 유전자좌는 비-상동 단부 결합(NHEJ)-매개 삽입 또는 상동성-지향 수선을 통한 *F9* 핵산 구조체의 삽입에 의해 수선될 수 있다. 임의로, *F9* 핵산 구조체를 이용한 수선은 가이드 RNA 표적 서열(들)을 제거하거나 방해하여, 표적화되었던 대립유전자는 CRISPR/Cas 시약에 의해 재-표적화될 수 없다.

[0589] 본원 어디에서나 더 상세히 설명된 바대로, *F9* 핵산 구조체는 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA)을 포함할 수 있고, 이들은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 이들은 선형 또는 원형 형태일 수 있다. *F9* 핵산 구조체는 나상 핵산일 수 있거나 바이러스, 예컨대 AAV에 의해 전달될 수 있다. 구체적인 예에서, *F9* 핵산 구조체는 AAV를 통해 전달될 수 있고, 표적 게놈 유전자좌(예를 들어, 안전 항만 유전자, *ALB* 유전자, 또는 *ALB* 유전자의 인트론 1)내로 비-상동성 단부 결합(예를 들어, *F9* 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는 것일 수 있음)에 의해 삽입을 할 수 있다.

[0590] 일부 *F9* 핵산 구조체는 비-상동성 단부 결합에 의해 삽입될 수 있다. 일부 경우, 이러한 *F9* 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는다. 예를 들어, 이러한 *F9* 핵산 구조체는 Cas 단백질을 이용한 절단 후 평활 단부 이중 가닥 절단부 내로 삽입될 수 있다. 구체적인 예에서, *F9* 핵산 구조체는 AAV를 통해 전달될 수 있고, 비-상동성 단부 접합(예를 들어, *F9* 핵산 구조체는 상동성 아암을 포함하지 않는 것일 수 있음)에 의해 삽입을 할 수 있다.

[0591] 또 다른 예에서, *F9* 핵산 구조체는 상동성-독립적 표적화된 통합을 통해 삽입될 수 있다. 예를 들어, *F9* 핵산 구조체는 각각의 측면 상에서 가이드 RNA 표적 서열(예를 들어, 표적 게놈 유전자좌에서와 동일한 표적 부위, 및 표적 게놈 유전자좌 내 표적 부위를 절단하는 데 사용되는 CRISPR/Cas 시약(Cas 단백질 및 가이드 RNA)에 의해 플랭킹될 수 있다. 그 후에, Cas 단백질은 핵산 삽입물을 플랭킹하는 표적 부위를 절단할 수 있다. 구체적인 예에서, *F9* 핵산 구조체는 AAV-매개 전달에 의해 전달되고, 핵산 인서트를 플랭킹하는 표적 부위의 절단은 AAV의 역위 말단 반복(ITR)을 제거할 수 있다. 일부 방법에서, 표적 게놈 유전자좌 내 표적 부위(예를 들어, 플랭킹 프로토스페이서 인접 모티프를 포함하는 가이드 RNA 표적 서열)는, 핵산 인서트가 표적 게놈 유전자좌 내로 올바른 배향으로 삽입된다면 더 이상 존재하지 않지만, 상기 표적 부위는, 핵산 인서트가 표적 게놈 유전자좌 내로 반대 배향으로 삽입된다면 개질된다.

[0592] 본원에 개시된 방법은 대상체(예를 들어, 동물 또는 포유류, 예컨대 인간) 또는 세포에 *F9* 핵산 구조체, 그리고 임의로 핵산(예를 들어, DNA 또는 RNA), 단백질, 또는 핵산-단백질 복합체의 형태를 포함하는 CRISPR/Cas 시약과 같은 뉴클레아제 작용제를 도입 또는 투여하는 단계를 포함할 수 있다. "도입" 또는 "투여"는 세포 또는 대상체 분자(들)(예를 들어, 핵산(들) 또는 단백질(들))를 세포 내부로의 또는 대상체 내 세포의 내부로의 접근을 획득하는 방식으로 세포 또는 대상체에 제시하는 것을 포함한다. 도입은 임의의 수단에 의해 달성될 수 있으며, 2개 이상의 성분(예를 들어, 성분 중 2개, 또는 모든 성분)은 임의의 조합으로 동시에 또는 순차적으로 세포 또는 동물 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 가이드 RNA의 도입 전에 세포 또는 대상체 내로 도입될 수 있거나, Cas 단백질은 가이드 RNA의 도입 후에 도입될 수 있다. 또 다른 예로, *F9* 핵산 구조체는 Cas 단백질 및 가이드 RNA의 도입 전에 도입될 수 있거나, Cas 단백질 및 가이드 RNA의 도입 후에 도입될 수 있다(예를 들어, *F9* 핵산 구조체는 Cas 단백질 및 가이드 RNA의 도입 전 또는 도입 후 약 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 또는 72시간째에 투여될 수 있음). 예를 들어, *F9* 핵산 구조체는호 및 US 2015/0110762호를 참조하며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 게다가, 2개 이상의 성분은 동일

한 전달 방법 또는 상이한 전달 방법에 의해 세포 또는 대상체 내로 도입될 수 있다. 유사하게는, 2개 이상의 성분은 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로에 의해 대상체 내로 도입될 수 있다.

[0593] 가이드 RNA는 예를 들어, RNA(예를 들어, 시험관내 전사된 RNA) 형태로 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA 형태로 대상체 또는 세포 내로 도입될 수 있다. 가이드 RNA는 본원 어디에서나 개시된 바와 같이 변형될 수 있다. DNA의 형태로 도입될 때, 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA는 세포에서 또는 대상체 내 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA는 AAV를 통해 전달되고 U6 프로모터 하에 생체내에서 발현될 수 있다. 이러한 DNA는 하나 이상의 발현 구조체에 존재할 수 있다. 예를 들어, 이러한 발현 구조체는 단일 핵산 분자의 성분일 수 있다. 대안적으로, 이들은 2개 이상의 핵산 분자 중에서 임의의 조합으로 분리될 수 있다(즉, 하나 이상의 CRISPR RNA를 인코딩하는 DNA 및 하나 이상의 tracrRNA를 인코딩하는 DNA는 별개의 핵산 분자의 성분일 수 있음).

[0594] 마찬가지로, Cas 단백질은 임의의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 단백질, 예컨대, gRNA와 복합체화된 Cas 단백질의 형태로 제공될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산, 예컨대, RNA(예를 들어, 메신저 RNA(mRNA)) 또는 DNA의 형태로 제공될 수 있다. Cas RNA는 본원 어디에서나 개시된 바와 같이 변형될 수 있다. 임의로, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 특정 세포 또는 유기체에서 단백질로의 효율적인 번역을 위해 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 자연 발생 폴리뉴클레오티드 서열과 비교하여, 포유류 세포, 인간 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 또는 임의의 다른 관심 숙주 세포에서 더 높은 사용 빈도를 갖는 코돈을 치환하도록 변형될 수 있다. Cas 단백질을 인코딩하는 핵산이 세포 또는 대상체 내로 도입될 때, Cas 단백질은 세포에서 또는 대상체 내 세포에서 일시적으로, 조건적으로, 또는 구성적으로 발현될 수 있다.

[0595] Cas 단백질 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산은 발현 구조체에서 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 발현 구조체는 관심 유전자 또는 다른 핵산 서열(예를 들어, Cas 유전자)의 발현을 지시할 수 있는 임의의 핵산 구조체를 포함하고, 이는 이러한 관심 핵산 서열을 표적 세포로 이전시킬 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 하나 이상의 gRNA를 인코딩하는 DNA를 포함하는 벡터에 존재할 수 있다. 대안적으로, 이는, 하나 이상의 gRNA를 인코딩하는 DNA를 포함하는 벡터로부터 별개인 벡터 또는 플라스미드에 존재할 수 있다. 발현 구조체에 사용될 수 있는 적합한 프로모터는 예를 들어, 진핵 세포, 인간 세포, 비인간 세포, 포유류 세포, 비인간 포유류 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 햄스터 세포, 토끼 세포, 만능성 세포, 배아 줄기(ES) 세포, 성인 줄기세포, 발달 제약 전구 세포, 유도 만능 줄기(iPS) 세포, 또는 단세포 단계 배아 중 하나 이상에서 활성인 프로모터를 포함한다. 예를 들어, 적합한 프로모터는 간세포와 같은 간 세포에서 활성일 수 있다. 이러한 프로모터는 예를 들어, 조건적 프로모터, 유도적 프로모터, 구성적 프로모터, 또는 조직-특이적 프로모터일 수 있다. 임의로, 프로모터는 하나의 방향에서 Cas 단백질과 다른 방향에서 가이드 RNA 둘 다의 발현을 구동하는 양방향 프로모터일 수 있다. 이러한 양방향 프로모터는 (1) 3개의 외부 제어 요소인 원위부 서열 요소(DSE), 근위부 서열 요소(PSE), 및 TATA 박스를 함유하는 완전한 종래의 일방향적 Pol III 프로모터; 및 (2) 역배향에서 DSE의 5' 말단에 융합된 TATA 박스 및 PSE를 포함하는 제2 기본(basic) Pol III 프로모터로 구성될 수 있다. 예를 들어, H1 프로모터에서, DSE는 PSE 및 TATA 박스에 인접하고, 프로모터는, U6 프로모터로부터 유래된 TATA 박스 및 PSE를 부착함으로써 역방향에서의 전사가 제어되는 하이브리드 프로모터를 생성함으로써 양방향성으로 될 수 있다. 예를 들어, US 2016/0074535호를 참조하며, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. Cas 단백질을 인코딩하는 유전자 및 가이드 RNA를 발현하기 위한 양방향 프로모터의 사용은 동시에, 전달을 용이하게 하기 위해 컴팩트 발현 카세트의 발생을 가능하게 한다.

[0596] 대상체 또는 세포 내로 도입되는 분자(예를 들어, Cas 단백질 또는 가이드 RNA 또는 핵산 인코딩)는 도입되는 분자의 안정성을 증가시키는(예를 들어, 주어진 저장 조건(예를 들어, -20℃, 4℃ 또는 주위 온도) 하에서 분해 생성물이 역치 미만에, 예컨대, 출발 핵산 또는 단백질의 0.5 중량% 미만에서 유지되는 기간을 연장시키거나; 생체내 안정성을 증가시키는) 담체를 포함하는 조성물에 제공될 수 있다. 이러한 담체의 비제한적인 예는 폴리(락트산)(PLA) 미소구체, 폴리(D,L-락틱-코글리콜-산)(PLGA) 미소구체, 리포솜, 미셀, 인버스 미셀, 지질 코킬레에이트, 및 지질 미세소관을 포함한다.

[0597] 다양한 방법 및 조성물은 세포 또는 대상체 내로의 분자(예를 들어, 핵산 또는 단백질)의 도입을 가능하게 하기 위해 본원에 제공된다. 분자를 다양한 세포 유형 내로 도입하는 방법은 알려져 있고, 예를 들어, 안정한 형질주입 방법, 일시적인 형질주입 방법, 및 바이러스-매개 방법을 포함한다.

[0598] 형질주입 프로토콜, 뿐만 아니라 분자를 세포 내로 도입하는 프로토콜은 다양할 수 있다. 비제한적인 형질주입

방법은 리포좀을 사용하는 화학적 기반 형질주입 방법; 나노입자; 인산칼슘(문헌[Graham et al. (1973) *Virology* 52 (2): 456-67, Bacchetti et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (4):1590-4], 및 문헌[Kriegler, M (1991). Transfer and Expression: A Laboratory Manual. New York: W. H. Freeman and Company. pp. 96-97]); 덴드리머; 또는 DEAE-덱스트란 또는 폴리에틸렌이민과 같은 양이온성 중합체를 포함한다. 비-화학적 방법은 전기천공, 초음파-천공(sonoporation), 및 광학 형질주입을 포함한다. 입자-기반 형질주입은 유전자 총(gene gun), 또는 자기-보조 형질주입(magnet-assisted transfection)의 사용을 포함한다(문헌[Bertram (2006) *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7, 277-28]). 바이러스 방법이 또한 형질주입에 사용될 수 있다.

[0599] 세포 내로의 핵산 또는 단백질의 도입 또한, 전기천공에 의해, 세포질내 주사에 의해, 바이러스 감염에 의해, 아데노바이러스에 의해, 아데노-관련 바이러스에 의해, 렌티바이러스에 의해, 레트로바이러스에 의해, 형질주입에 의해, 지질-매개 형질주입에 의해, 또는 뉴클레오펙션(nucleofection)에 의해 매개될 수 있다. 뉴클레오펙션은, 핵산 기질이 세포질로 전달될 뿐만 아니라 핵막을 통해 핵 내로도 전달되게 할 수 있는 향상된 전기천공 기술이다. 게다가, 본원에 개시된 방법에서 뉴클레오펙션의 사용은 전형적으로, 일반적인 전기천공보다 훨씬 더 적은 세포를 필요로 한다(예를 들어, 일반적인 전기천공에 의한 7백만개와 비교하여 단지 약 2백만개). 일례에서, 뉴클레오펙션은 LONZA® NUCLEOFECTOR™ 시스템을 사용하여 수행된다.

[0600] 세포(예를 들어, 접합체) 내로의 분자(예를 들어, 핵산 또는 단백질)의 도입은 또한 현미주사(microinjection)에 의해 달성될 수 있다. 접합체(즉, 단세포 단계 배아)에서, 현미주사는 모체(maternal) 및/또는 부체(paternal) 전핵 내로 또는 세포질 내로 수행될 수 있다. 현미주사가 단지 하나의 전핵 내로 수행된다면, 부체 전핵이 이의 더 큰 크기로 인해 바람직하다. mRNA의 현미주사는 바람직하게는 세포질 내로 수행되며(예를 들어, mRNA를 번역 머시너리에 직접 전달하기 위해), 한편 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하거나 RNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 현미주사는 바람직하게는 핵/전핵 내로 수행된다. 대안적으로, 현미주사는 핵/전핵(pronucleus)과 세포질 둘 다 내로 주사에 의해 수행될 수 있으며: 우선 바늘이 핵/전핵 내로 도입되고 제1 양이 주사될 수 있으며, 한편 상기 바늘을 단세포 단계 배아로부터 제거하면서 제2 양이 세포질 내로 주사될 수 있다. Cas 단백질이 세포질 내로 주사된다면, Cas 단백질은 바람직하게는 핵/전핵으로의 전달을 보장하기 위해 핵 위치 신호를 포함한다. 현미주사를 수행하는 방법은 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[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)]을 참조한다; 또한 문헌[Meyer et al. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:15022-15026] 및 문헌[Meyer et al. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:9354-9359]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0601] 분자(예를 들어, 핵산 또는 단백질)을 세포 또는 대상체 내로 도입하기 위한 다른 방법은 예를 들어, 벡터 전달, 입자-매개 전달, 엑소좀-매개 전달, 지질-나노입자-매개 전달, 세포-투과-펩티드-매개 전달, 또는 이식가능-장치-매개 전달을 포함할 수 있다. 구체적인 예로, 핵산 또는 단백질은 담체, 예컨대 폴리(락트산)(PLA), 미소구체, 폴리(D,L-락틱-코글리콜-산)(PLGA) 미소구체, 리포솜, 미셀, 인버스 미셀, 지질 코클레이트(cochelate), 또는 지질 미세소관과 같은 담체에서 세포 또는 대상체 내로 도입될 수 있다. 대상체로의 전달의 일부 구체적인 예는 유체역학적 전달, 바이러스-매개 전달(예를 들어, 아데노-관련 바이러스(AAV)-매개 전달), 및 지질-나노입자-매개 전달을 포함한다.

[0602] 세포 또는 대상체 내로의 핵산 및 단백질의 도입은 유체역학적 전달(hydrodynamic delivery)에 의해 달성될 수 있다. 실질 세포로의 유전자 전달을 위해, 필수적인 DNA 서열만 선택된 혈관을 통해 주사될 필요가 있으며, 현재의 바이러스 및 합성 벡터와 관련된 안전성 염려를 해소할 수 있다. 혈류 내로 주사될 때, DNA는 혈액에 접근 가능한 상이한 조직 내의 세포에 도달할 수 있다. 유체역학적 전달은 큰 부피의 용액을 순환중인 비압축성(incompressible) 혈액 내로 신속하게 주사함으로써 발생되는 힘을 이용하여, 크고 막-불투과성인 화합물이 실질 세포에 진입하는 것을 방지하는 내피 및 세포막의 물리적 장벽을 극복한다. DNA의 전달 외에도, 이 방법은 생체내에서 RNA, 단백질, 및 다른 작은 화합물의 효율적인 세포내 전달에 유용하다. 예를 들어, 문헌[Bonamassa et al. (2011) *Pharm. Res.* 28(4):694-701]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0603] 핵산의 도입은 또한, 바이러스-매개 전달, 예컨대, AAV-매개 전달 또는 렌티바이러스-매개 전달에 의해 달성될 수 있다. 다른 예시적인 바이러스/바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 폭스바이러스, 및 단순 포진 바이러스를 포함한다. 바이러스는 분열 세포, 비-분열 세포, 또는 분열 세포와 비-분

열 세포 둘 다 감염시킬 수 있다. 바이러스는 숙주 게놈 내로 통합할 수 있거나 대안적으로는 숙주 게놈 내로 통합하지 않는다. 이러한 바이러스는 또한, 감소된 면역력을 갖도록 조작될 수 있다. 바이러스는 복제-가능일 수 있거나 복제-결함(예를 들어, 추가 라운드의 비리온 복제 및/또는 포장에 필요한 하나 이상의 유전자가 결함됨)일 수 있다. 바이러스는 일시적 발현, 장기-지속적 발현(예를 들어, 적어도 1주, 2주, 1개월, 2개월, 또는 3개월), 또는 영구적 발현(예를 들어, Cas9 및/또는 gRNA의)을 야기할 수 있다. 바이러스 벡터는 그의 야생형 대응물로부터 유전자 변형될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 클로닝을 용이하게 하거나 벡터의 하나 이상의 특성이 변경되도록 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 이러한 특성은 포장 수용력, 형질도입 효율, 면역원성, 게놈 통합, 복제, 전사 및 번역을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 바이러스가 더 큰 크기를 갖는 외인성 서열을 포장할 수 있도록 바이러스 게놈의 일부가 결실될 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 벡터는 향상된 형질도입 효율을 가질 수 있다. 일부 예에서, 숙주에서 바이러스에 의해 유도된 면역 반응이 감소될 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 서열의 숙주 게놈으로의 통합을 촉진하는 바이러스 유전자(예컨대 인테그라제)는 바이러스가 비통합되도록 돌연변이될 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 벡터는 복제 결함일 수 있다. 일부 예에서, 바이러스 벡터는 벡터 상의 코딩 서열의 발현을 유도하기 위해 외인성 전사 또는 번역 제어 서열을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 바이러스는 헬퍼-의존적일 수 있다. 예를 들어, 바이러스는 벡터를 바이러스 입자 내로 증폭 및 포장하는 데 필요한 바이러스 성분(예컨대 바이러스 단백질)을 공급하기 위해 하나 이상의 헬퍼 바이러스를 필요로 할 수 있다. 이러한 경우에, 바이러스 성분을 인코딩하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 하나 이상의 헬퍼 성분이 본원에 기재된 벡터 시스템과 함께 숙주 세포 또는 숙주 세포의 집단에 도입될 수 있다. 다른 예에서, 바이러스는 헬퍼-무함유일 수 있다. 예를 들어, 바이러스는 헬퍼 바이러스 없이 벡터를 증폭 및 포장할 수 있다. 일부 예에서, 본원에 기재된 벡터 시스템은 또한 바이러스 증폭 및 포장에 필요한 바이러스 성분을 인코딩할 수 있다.

[0604] 예시적인 바이러스 역가(예를 들어, AAV 역가)는 약 10^{12}, 약 10^{13}, 약 10^{14}, 약 10^{15}, 및 약 10^{16}벡터 게놈(vg)/mL, 또는 약 10^{12} 내지 약 10^{16}, 약 10^{12} 내지 약 10^{15}, 약 10^{12} 내지 약 10^{14}, 약 10^{12} 내지 약 10^{13}, 약 10^{13} 내지 약 10^{16}, 약 10^{14} 내지 약 10^{16}, 약 10^{15} 내지 약 10^{16}, 또는 약 10^{13} 내지 약 10^{15}vg/mL을 포함한다. 다른 예시적인 바이러스 역가(예를 들어, AAV 역가)는 약 10^{12}, 약 10^{13}, 약 10^{14}, 약 10^{15}, 및 약 10^{16}벡터 게놈(vg)/kg 체중, 또는 약 10^{12} 내지 약 10^{16}, 약 10^{12} 내지 약 10^{15}, 약 10^{12} 내지 약 10^{14}, 약 10^{12} 내지 약 10^{13}, 약 10^{13} 내지 약 10^{16}, 약 10^{14} 내지 약 10^{16}, 약 10^{15} 내지 약 10^{16}, 또는 약 10^{13} 내지 약 10^{15}vg/kg 체중을 포함한다. 일례에서, 바이러스 역가는 약 10^{13} 내지 약 10^{14}vg/mL 또는 vg/kg이다. 또 다른 예에서, 바이러스 역가는 약 10^{12} 내지 약 10^{13}vg/mL 또는 vg/kg(예를 들어, 약 10^{12} 내지 약 10^{13}vg/kg)이다. 또 다른 예에서, 바이러스 역가는 약 10^{12} 내지 약 10^{14}vg/mL 또는 vg/kg(예를 들어, 약 10^{12} 내지 약 10^{14}vg/kg)이다. 예를 들어, 바이러스 역가는 약 1.5E12 내지 약 1.5E13vg/kg일 수 있거나, 약 1.5E12vg/kg일 수 있거나, 약 1.5E13vg/kg일 수 있다. 방법에 사용하기 위한 AAV는 본원 어디에서나 더 상세히 논의된다.

[0605] 핵산 및 단백질의 도입은 또한, 지질 나노입자(LNP)-매개 전달에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, LNP-매개 전달은 Cas mRNA와 가이드 RNA의 조합 또는 Cas 단백질과 가이드 RNA의 조합을 전달하는 데 사용될 수 있다. LNP-매개 전달은 RNA 형태의 가이드 RNA를 전달하는 데 사용될 수 있다. 구체적인 예에서, 가이드 RNA 및 Cas 단백질은 각각 동일한 LNP에서 LNP-매개 전달을 통해 RNA 형태로 도입된다. 본원 어디에서나 더 상세히 논의되는 바와 같이, RNA 중 하나 이상이 변형될 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA는 5' 단부 및/또는 3' 단부에서 하나 이상의 안정화 단부 변형을 포함하도록 변형될 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 5' 단부 및/또는 3' 단부에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결부 또는 5' 단부 및/또는 3' 단부에서 하나 이상의 2'-O-메틸 변형을 포함할 수 있다. 또 다른 예로, Cas mRNA 변형은 슈도우리딘으로 치환(예를 들어, 슈도우리딘으로 완전히 치환됨), 5' 캡, 및 폴리아데닐화를 포함할 수 있다. 또 다른 예로, Cas mRNA 변형은 N1-메틸-슈도우리딘으로 치환(예를 들어, N1-메틸-슈도우리딘으로 완전히 치환됨), 5' 캡, 및 폴리아데닐화를 포함할 수 있다. 다른 변형이 또한 본원의 다른 곳에 개시된 바와 같이 고려된다. 이러한 방법을 통한 전달은 일시적인 Cas 발현 및/또는 가이드 RNA의 일시적인 존재를 초래할 수 있고, 생분해성 지질은 청소율(clearance)을 향상시키며, 내약성(tolerability)을 향상시키고, 면역원성을 저하시킨다. 지질 제형은 생물학적 분자의 세포 흡수를 향상시키는 한편, 이들 분자를 분해로부터 보호할 수 있다. 지질 나노입자는 분자간 힘에 의해 서로 물리적으로 관련되어 있는 복수의 지질 분자를 포함하는 입자이다. 이들은 미소구체(유니라멜라(unilamellar) 및 멀티라멜라(multilamella) 소낭, 예를 들어, 리포솜을 포함함), 에멀젼 중 분산상, 미셀, 또는 현탁액 중 내부상(internal

pahse)을 포함한다. 이러한 지질 나노입자는 전달을 위해 하나 이상의 핵산 또는 단백질을 캡슐화하는 데 사용될 수 있다. 양이온성 지질을 함유하는 제형은 다가음이온(polyanion), 예컨대, 핵산을 전달하는 데 유용하다. 포함될 수 있는 다른 지질은 중성 지질(즉, 비하전된 또는 쌍성이온성(zwitterionic) 지질), 음이온성 지질, 형질주입을 증강시키는 헬퍼 지질, 및 나노입자가 생체내에서 존재할 수 있는 시간의 길이를 증가시키는 스텔스 지질이다. 적합한 양이온성 지질, 중성 지질, 음이온성 지질, 헬퍼 지질, 및 스텔스 지질의 예는 예를 들어, WO 2016/010840 A1호 및 WO 2017/173054 A1호에서 찾을 수 있으며, 이들 각각의 전체내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다. 예시적인 지질 나노입자는 양이온성 지질 및 하나 이상의 다른 성분을 포함할 수 있다. 일례에서, 다른 성분은 헬퍼 지질, 예컨대, 콜레스테롤을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 다른 성분은 헬퍼 지질, 예컨대, 콜레스테롤 및 중성 지질, 예컨대, DSPC를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 다른 성분은 헬퍼 지질, 예컨대, 콜레스테롤, 선택적인 중성 지질, 예컨대, DSPC, 및 스텔스 지질, 예컨대, S010, S024, S027, S031, 또는 S033을 포함할 수 있다.

[0606] LNP는 하기 중 하나 이상 또는 전부를 함유할 수 있다: (i) 캡슐화 및 엔도좀 탈출을 위한 지질; (ii) 안정화를 위한 중성 지질; (iii) 안정화를 위한 헬퍼 지질; 및 (iv) 스텔스 지질. 예를 들어, 문헌[Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22(9):2227-2235] 및 WO 2017/173054 A1호를 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 소정의 LNP에서, 카고는 가이드 RNA, 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 소정의 LNP에서, 카고는 Cas 뉴클레아제, 예컨대, Cas9를 인코딩하는 mRNA, 및 가이드 RNA, 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 소정의 LNP에서, 카고는 *F9* 핵산 구조체를 포함할 수 있다. 소정의 LNP에서, 카고는 Cas 뉴클레아제, 예컨대 Cas9를 인코딩하는 mRNA, 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산, 및 *F9* 핵산 구조체를 포함할 수 있다. 방법에 사용하기 위한 LNP는 본원 어디에서나 더 상세히 기재된다.

[0607] sLNP의 예시적인 투여량은 총 RNA(Cas9 mRNA 및 gRNA) 카고 함량을 기준으로, 약 0.1, 약 0.25, 약 0.3, 약 0.5, 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 8, 또는 약 10mg/kg 체중(mpk) 또는 약 0.1 내지 약 10, 약 0.25 내지 약 10, 약 0.3 내지 약 10, 약 0.5 내지 약 10, 약 1 내지 약 10, 약 2 내지 약 10, 약 3 내지 약 10, 약 4 내지 약 10, 약 5 내지 약 10, 약 6 내지 약 10, 약 8 내지 약 10, 약 0.1 내지 약 8, 약 0.1 내지 약 6, 약 0.1 내지 약 5, 약 0.1 내지 약 4, 약 0.1 내지 약 3, 약 0.1 내지 약 2, 약 0.1 내지 약 1, 약 0.1 내지 약 0.5, 약 0.1 내지 약 0.3, 약 0.1 내지 약 0.25, 약 0.25 내지 약 8, 약 0.3 내지 약 6, 약 0.5 내지 약 5, 약 1 내지 약 5, 또는 약 2 내지 약 3mg/kg 체중을 포함한다. 이러한 LNP는 예를 들어, 정맥내로 투여될 수 있다. 일례에서, 약 0.01mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 0.1mg/kg 내지 약 10mg/kg, 또는 약 0.01mg/kg 내지 약 0.3mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다. 예를 들어, 약 0.01, 약 0.03, 약 0.1, 약 0.3, 약 1, 약 3, 또는 약 10 mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다. LNP의 추가의 예시적인 투여량은 총 RNA(Cas9 mRNA 및 gRNA) 카고 함량을 기준으로, 약 0.1, 약 0.25, 약 0.3, 약 0.5, 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 8, 또는 약 10 mg/kg(mpk) 체중 또는 약 0.1 내지 약 10, 약 0.25 내지 약 10, 약 0.3 내지 약 10, 약 0.5 내지 약 10, 약 1 내지 약 10, 약 2 내지 약 10, 약 3 내지 약 10, 약 4 내지 약 10, 약 5 내지 약 10, 약 6 내지 약 10, 약 8 내지 약 10, 약 0.1 내지 약 8, 약 0.1 내지 약 6, 약 0.1 내지 약 5, 약 0.1 내지 약 4, 약 0.1 내지 약 3, 약 0.1 내지 약 2, 약 0.1 내지 약 1, 약 0.1 내지 약 0.5, 약 0.1 내지 약 0.3, 약 0.1 내지 약 0.25, 약 0.25 내지 약 8, 약 0.3 내지 약 6, 약 0.5 내지 약 5, 약 1 내지 약 5, 또는 약 2 내지 약 3 mg/kg 체중을 포함한다. 이러한 LNP는 예를 들어, 정맥내로 투여될 수 있다. 일례에서, 약 0.01mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 0.1mg/kg 내지 약 10mg/kg, 또는 약 0.01mg/kg 내지 약 0.3mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다. 예를 들어, 약 0.01, 약 0.03, 약 0.1, 약 0.3, 약 0.5, 약 1, 약 2, 약 3, 또는 약 10 mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 약 0.5 내지 약 10, 약 0.5 내지 약 5, 약 0.5 내지 약 3, 약 1 내지 약 10, 약 1 내지 약 5, 약 1 내지 약 3, 또는 약 1 내지 약 2 mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 약 0.5 내지 약 3, 약 0.5 내지 약 2.5, 약 0.5 내지 약 2, 약 0.5 내지 약 1.5, 약 0.5 내지 약 1, 약 1 내지 약 3, 약 1 내지 약 2.5, 약 1 내지 약 2, 또는 약 1 내지 약 1.5mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 약 1mg/kg의 LNP 용량이 사용될 수 있다.

[0608] 전달 모드는 면역원성을 저하시키도록 선택될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질 및 gRNA는 상이한 모드에 의해 전달될 수 있다(예를 들어, 쌍봉형(bi-modal) 전달). 이들 상이한 모드는 대상체에게 전달되는 분자(예를 들어, Cas 또는 핵산 인코딩, gRNA 또는 핵산 인코딩, 또는 *F9* 핵산 구조체)에게 상이한 약물역학적 또는 약물동력학적 특성을 부여할 수 있다. 예를 들어, 상이한 모드는 상이한 조직 분포, 상이한 반감기, 또는 상이한 시간적(temporal) 분포를 초래할 수 있다. 일부 전달 모드(예를 들어, 세포에서 자율 복제(autonomous replication) 또는 게놈 통합에 의해 지속되는 핵산 벡터의 전달)는 분자의 더욱 지속적인 발현 및 존재를 초래

하는 반면, 다른 모드의 전달은 일시적이고 덜 지속적이다(예를 들어, RNA 또는 단백질의 전달). 예를 들어, Cas 단백질의 더욱 일시적인 방식, 예를 들어 mRNA 또는 단백질로서의 전달은, Cas/gRNA 복합체가 단지 단기간 동안 존재하고 활성임을 보장할 수 있고, MHC 분자에 의해 세포의 표면 상에 제시되는 박테리아-유래 Cas 효소로부터의 펩티드에 의해 야기되는 면역원성을 감소시킬 수 있다. 이러한 일시적인 전달은 또한, 표적-외 변형의 가능성을 감소시킬 수 있다.

[0609] 생체내 투여는 예를 들어, 비경구, 정맥내, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 수막공간내, 복강내, 국소, 두개내, 또는 근육내를 포함하여 임의의 적합한 경로에 의한 것일 수 있다. 전신 투여 모드는 예를 들어, 경구 및 비경구 경로를 포함한다. 비경구 경로의 예는 정맥내, 동맥내, 골내(intraosseous), 근육내, 피내, 피하, 비내, 및 복강내 경로를 포함한다. 구체적인 예는 정맥내 주입이다. 비내 점적 및 유리체내 주사가 다른 구체적인 예이다. 국소 투여 모드는 예를 들어, 수막공간내, 뇌실내(intracerebroventricular), 뇌실질내(예를 들어, 선조체(striatum)로의 뇌실질내 전달(예를 들어, 미상핵(caudate) 내로 또는 조가비핵(putamen) 내로), 대뇌 피질(cerebral cortex), 중심전회(precentral gyrus), 해마(hippocampus)(예를 들어, 치상회(dentate gyrus) 또는 CA3 영역 내로), 측두 피질(temporal cortex), 편도체(amygdala), 전두 피질(frontal cortex), 시상(thalamus), 소뇌(cerebellum), 수질(medulla), 시상하부(hypothalamus), 덮개(tectum), 중뇌피개(tegmentum), 또는 흑색질), 안내(intraocular), 안와내(intraorbital), 결막하(subconjuctival), 유리체내(유리체내(intravitreal)), 망막하(subretinal), 및 경공막(transscleral) 경로를 포함한다. 유의하게 더 소량의 성분(전신 접근법과 비교하여)은 전신적으로(예를 들어, 정맥내로) 전달될 때와 비교하여 국소로(예를 들어, 뇌실질내 또는 유리체내) 투여될 때 효과를 발휘할 수 있다. 국소 투여 모드는 또한, 치료적 유효량의 성분이 전신 투여될 때 발생할 수 있는 잠재적으로 독성 부작용의 발생을 감소시키거나 해소시킬 수 있다. 구체적인 예에서, 생체내 투여는 정맥내 투여이다.

[0610] 생체내 투여는 예를 들어, 비경구, 정맥내, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 수막공간내, 복강내, 국소, 두개내, 또는 근육내를 포함하여 임의의 적합한 경로에 의한 것일 수 있다. 구체적인 예는 정맥내 주입이다. 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질을 포함하는 조성물(또는 가이드 RNA 및/또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산)은 하나 이상의 생리학적으로 그리고 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 선택된 투여 경로에 의존할 수 있다. 약학적으로 허용 가능하다는 것은 담체, 희석제, 부형제, 또는 보조제가 제형의 다른 성분과 양립성이고 이의 수혜자에게 실질적으로 유해하지 않음을 의미한다. 구체적인 예에서, 투여 및/또는 제형의 경로 또는 간(예를 들어, 간세포)으로의 전달을 위해 선택된다.

[0611] 투여 빈도 및 투여량의 수는 다수의 요인에 따라 좌우될 수 있다. 세포 또는 대상체 내로의 핵산 또는 단백질의 도입은 기간에 걸쳐 1회 또는 다수 회 수행될 수 있다. 예를 들어, 도입은 기간에 걸쳐 단지 1회, 기간에 걸쳐 적어도 2회, 기간에 걸쳐 적어도 3회, 기간에 걸쳐 적어도 4회, 기간에 걸쳐 적어도 5회, 기간에 걸쳐 적어도 6회, 기간에 걸쳐 적어도 7회, 기간에 걸쳐 적어도 8회, 기간에 걸쳐 적어도 9회, 기간에 걸쳐 적어도 10회, 적어도 11회, 기간에 걸쳐 적어도 12회, 기간에 걸쳐 적어도 13회, 기간에 걸쳐 적어도 14회, 기간에 걸쳐 적어도 15회, 기간에 걸쳐 적어도 16회, 기간에 걸쳐 적어도 17회, 기간에 걸쳐 적어도 18회, 기간에 걸쳐 적어도 19회, 또는 기간에 걸쳐 적어도 20회 수행될 수 있다. 일부 방법에서, *F9* 핵산 구조체(또는*F9* 핵산 구조체 및 뉴클레아제 작용제(예를 들어, Cas 단백질 및 가이드 RNA)의 단일 투여)는 바람직한 수준으로 FIX의 발현을 증가시키기에 충분하다. 다른 방법에서, 치료 효과를 최대화하는 데 하나 초과의 투여가 유익할 수 있다.

[0612] 본원에 개시된 방법은 세포 또는 대상체(예를 들어, 대상체에서 순환, 혈청, 또는 혈장 수준)에서 FIX 단백질 수준 및/또는 FIX 활성 수준을 증가시킬 수 있고, 세포 또는 대상체에서 FIX 단백질 수준 및/또는 활성 수준을 측정하는 것을 포함할 수 있다(예를 들어, 대상체에서 순환, 혈청, 또는 혈장 수준). 일례에서, 대상체에서 치료의 유효성은 혈청 또는 혈장 FIX 활성을 측정함으로써 평가될 수 있으며, 여기서 대상체의 혈장 수준의 증가 및/또는 FIX의 활성은 치료의 유효성을 나타낸다. 다른 예에서, TGA-EA 검정에서 aPTT 검정 및/또는 트롬빈 생성에서 응고 기능을 평가함으로써 처리의 유효성을 결정할 수 있다. 다른 예에서, 치료의 유효성은 응고 및/또는 면역학적 검정(예를 들어, 샌드위치 면역검정, ELISA, 또는 MSD)을 통해 인자 IX(예를 들어, 순환 FIX)의 수준 또는 활성을 평가함으로써 결정될 수 있다.

[0613] 정상적인 또는 건강한 개체에서, FIX 활성 및 항원 수준은 정상 풀링된 혈장의 약 50% 내지 160%에서 다양하며, 이는 성인 인간 혈장으로부터의 정제에 기초하여 약 3 내지 5 ㎍/mL이다. 예를 들어, 문헌[Amiral et al. (1984) *Clin. Chem.* 30(9):1512-1516]을 참조하고, 이는 그 전체 내용이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 구체적인 예에서, 정상 FIX 활성은 FIX 활성의 정상 풀링된 혈장 수준의 약 100%인 것으로 간주되거나, FIX 활성의 정상 풀링된 혈장 수준의 100%인 것으로 간주된다. 구체적인 예에서, 정상 혈장 FIX 수준은 약 5

㎍/mL인 것으로 간주되거나, 5 ㎍/mL인 것으로 간주된다. FIX 활성 및/또는 항원 수준의 정상 혈장 수준의 50% 미만을 갖는 개인은 혈우병을 갖는 것으로 분류된다. 특히, 약 1% 미만의 활성 FIX를 갖는 개체는 중증 혈우병을 갖는 것으로 분류되는 반면, 약 1% 내지 5% 활성 FIX를 갖는 것들은 중등도 혈우병을 갖는다. 경증 혈우병을 갖는 개인은 약 6% 내지 49%의 정상 수준의 활성 응고 인자를 갖는다. 일부 구현예에서, 순환 FIX의 수준은 널리 공지된 방법을 사용하여 응고 및/또는 면역학적 검정에 의해 측정될 수 있다.

[0614] 일부 방법에서, 혈우병을 갖는 대상체에서의 FIX 또는 FIX 활성 수준의 혈장 수준은 약 또는 적어도 약 2%, 약 또는 적어도 약 3%, 약 또는 적어도 약 4%, 약 또는 적어도 약 5%, 약 또는 적어도 약 6%, 약 또는 적어도 약 7%, 약 또는 적어도 약 8%, 약 또는 적어도 약 9%, 약 또는 적어도 약 10%, 약 또는 적어도 약 11%, 약 또는 적어도 약 12%, 약 또는 적어도 약 13%, 약 또는 적어도 약 14%, 약 또는 적어도 약 15%, 약 또는 적어도 약 16%, 약 또는 적어도 약 17%, 약 또는 적어도 약 18%, 약 또는 적어도 약 19%, 약 또는 적어도 약 20%, 약 또는 적어도 약 21%, 약 또는 적어도 약 22%, 약 또는 적어도 약 23%, 약 또는 적어도 약 24%, 약 또는 적어도 약 25%, 약 또는 적어도 약 26%, 약 또는 적어도 약 27%, 약 또는 적어도 약 28%, 약 또는 적어도 약 29%, 약 또는 적어도 약 30%, 약 또는 적어도 약 31%, 약 또는 적어도 약 32%, 약 또는 적어도 약 33%, 약 또는 적어도 약 34%, 약 또는 적어도 약 35%, 약 또는 적어도 약 36%, 약 또는 적어도 약 37%, 약 또는 적어도 약 38%, 약 또는 적어도 약 39%, 약 또는 적어도 약 40%, 약 또는 적어도 약 41%, 약 또는 적어도 약 42%, 약 또는 적어도 약 43%, 약 또는 적어도 약 44%, 약 또는 적어도 약 45%, 약 또는 적어도 약 46%, 약 또는 적어도 약 47%, 약 또는 적어도 약 48%, 약 또는 적어도 약 49%, 약 또는 적어도 약 50%, 또는 이상의 정상 수준으로 증가한다.

[0615] 일부 방법에서, 순환 FIX 단백질 수준은 약 또는 적어도 약 0.05, 약 또는 적어도 약 0.1, 약 또는 적어도 약 0.2, 약 또는 적어도 약 0.5, 약 또는 적어도 약 1, 약 또는 적어도 약 2, 약 또는 적어도 약 3, 또는 약 또는 적어도 약 4 ㎍/mL로 증가된다. FIX 단백질 수준은 약 150 ㎍/mL, 또는 이상에 도달할 수 있다. 일부 방법에서, FIX 단백질 수준은 적어도 약 4 ㎍/mL 또는 약 4 ㎍/mL로 증가된다. 일부 방법에서, FIX 단백질 수준은 약 4 ㎍/mL 내지 약 5 ㎍/mL, 약 4 ㎍/mL 내지 6 ㎍/mL, 약 4 ㎍/mL 내지 8 ㎍/mL, 약 4 ㎍/mL 내지 약 10 ㎍/mL, 또는 이상으로 증가된다. 일부 방법에서, FIX 단백질 수준은 약 0.1 ㎍/mL 내지 약 10 ㎍/mL, 약 1 ㎍/mL 내지 약 10 ㎍/mL, 약 0.1 ㎍/mL 내지 약 6 ㎍/mL, 약 1 ㎍/mL 내지 약 6 ㎍/mL, 약 2 ㎍/mL 내지 약 5 ㎍/mL, 또는 약 3 ㎍/mL 내지 약 5 ㎍/mL로 증가된다. 예를 들어, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 혈우병을 갖는 대상체에서 인자 IX의 혈장 레벨을 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 12, 약 14, 약 16, 약 18, 약 20, 약 22, 약 24, 약 26, 약 28, 약 30, 약 32, 약 34, 약 36, 약 38, 약 40, 약 42, 약 44, 약 46, 약 48, 약 50, 약 52, 약 54, 약 56, 약 58, 약 60, 약 62, 약 64, 약 66, 약 68, 약 70, 약 75, 약 80, 약 85, 약 90, 약 95, 약 100, 약 105, 약 110, 약 115, 약 120, 약 125, 약 130, 약 135, 약 140, 약 145, 약 150 ㎍/mL, 또는 이상으로 증가시키는 데 유용하다.

[0616] 일부 방법에서, 대상체(예를 들어, 혈우병을 가짐)에서 혈장 FIX 활성 및/또는 수준은 투여 전 대상체의 혈장 수준 및/또는 FIX의 활성에 비해 약 또는 적어도 약 1%, 약 또는 적어도 약 2%, 약 또는 적어도 약 3%, 약 또는 적어도 약 4%, 약 또는 적어도 약 5%, 약 또는 적어도 약 6%, 약 또는 적어도 약 7%, 약 또는 적어도 약 8%, 약 또는 적어도 약 9%, 약 또는 적어도 약 10%, 약 또는 적어도 약 11%, 약 또는 적어도 약 12%, 약 또는 적어도 약 13%, 약 또는 적어도 약 14%, 약 또는 적어도 약 15%, 약 또는 적어도 약 16%, 약 또는 적어도 약 17%, 약 또는 적어도 약 18%, 약 또는 적어도 약 19%, 약 또는 적어도 약 20%, 약 또는 적어도 약 21%, 약 또는 적어도 약 22%, 약 또는 적어도 약 23%, 약 또는 적어도 약 24%, 약 또는 적어도 약 25%, 약 또는 적어도 약 26%, 약 또는 적어도 약 27%, 약 또는 적어도 약 28%, 약 또는 적어도 약 29%, 약 또는 적어도 약 30%, 약 또는 적어도 약 31%, 약 또는 적어도 약 32%, 약 또는 적어도 약 33%, 약 또는 적어도 약 34%, 약 또는 적어도 약 35%, 약 또는 적어도 약 36%, 약 또는 적어도 약 37%, 약 또는 적어도 약 38%, 약 또는 적어도 약 39%, 약 또는 적어도 약 40%, 약 또는 적어도 약 41%, 약 또는 적어도 약 42%, 약 또는 적어도 약 43%, 약 또는 적어도 약 44%, 약 또는 적어도 약 45%, 약 또는 적어도 약 46%, 약 또는 적어도 약 47%, 약 또는 적어도 약 48%, 약 또는 적어도 약 49%, 약 또는 적어도 약 50%, 약 또는 적어도 약 55%, 약 또는 적어도 약 60%, 약 또는 적어도 약 65%, 약 또는 적어도 약 70%, 약 또는 적어도 약 75%, 약 또는 적어도 약 80%, 약 또는 적어도 약 85%, 약 또는 적어도 약 90%, 약 또는 적어도 약 95%, 약 또는 적어도 약 100%, 약 또는 적어도 약 110%, 약 또는 적어도 약 120%, 약 또는 적어도 약 130%, 약 또는 적어도 약 140%, 약 또는 적어도 약 150%, 약 또는 적어도 약 160%, 약 또는 적어도 약 170%, 약 또는 적어도 약 180%, 약 또는 적어도 약 190%, 약 또는 적어도 약 200%, 또는 이상으로 증가한다.

[0617] 일부 방법에서,세포 또는 세포의 집단(예를 들어, 간 세포, 또는 간세포)에서 FIX 활성 및/또는 단백질 수준은

투여 전 FIX 활성 및/또는 단백질 수준(예를 들어, 정상 수준)에 비해 약 또는 적어도 약 1%, 약 또는 적어도 약 2%, 약 또는 적어도 약 3%, 약 또는 적어도 약 4%, 약 또는 적어도 약 5%, 약 또는 적어도 약 6%, 약 또는 적어도 약 7%, 약 또는 적어도 약 8%, 약 또는 적어도 약 9%, 약 또는 적어도 약 10%, 약 또는 적어도 약 11%, 약 또는 적어도 약 12%, 약 또는 적어도 약 13%, 약 또는 적어도 약 14%, 약 또는 적어도 약 15%, 약 또는 적어도 약 16%, 약 또는 적어도 약 17%, 약 또는 적어도 약 18%, 약 또는 적어도 약 19%, 약 또는 적어도 약 20%, 약 또는 적어도 약 21%, 약 또는 적어도 약 22%, 약 또는 적어도 약 23%, 약 또는 적어도 약 24%, 약 또는 적어도 약 25%, 약 또는 적어도 약 26%, 약 또는 적어도 약 27%, 약 또는 적어도 약 28%, 약 또는 적어도 약 29%, 약 또는 적어도 약 30%, 약 또는 적어도 약 31%, 약 또는 적어도 약 32%, 약 또는 적어도 약 33%, 약 또는 적어도 약 34%, 약 또는 적어도 약 35%, 약 또는 적어도 약 36%, 약 또는 적어도 약 37%, 약 또는 적어도 약 38%, 약 또는 적어도 약 39%, 약 또는 적어도 약 40%, 약 또는 적어도 약 41%, 약 또는 적어도 약 42%, 약 또는 적어도 약 43%, 약 또는 적어도 약 44%, 약 또는 적어도 약 45%, 약 또는 적어도 약 46%, 약 또는 적어도 약 47%, 약 또는 적어도 약 48%, 약 또는 적어도 약 49%, 약 또는 적어도 약 50%, 약 또는 적어도 약 55%, 약 또는 적어도 약 60%, 약 또는 적어도 약 65%, 약 또는 적어도 약 70%, 약 또는 적어도 약 75%, 약 또는 적어도 약 80%, 약 또는 적어도 약 85%, 약 또는 적어도 약 90%, 약 또는 적어도 약 95%, 약 또는 적어도 약 100%, 약 또는 적어도 약 110%, 약 또는 적어도 약 120%, 약 또는 적어도 약 130%, 약 또는 적어도 약 140%, 약 또는 적어도 약 150%, 약 또는 적어도 약 160%, 약 또는 적어도 약 170%, 약 또는 적어도 약 180%, 약 또는 적어도 약 190%, 약 또는 적어도 약 200%, 또는 이상으로 증가한다.

[0618] 일부 방법은 치료적 유효량의 FIX 단백질을 발현하는(예를 들어, 개체에서 순환 FIX 응고 활성의 치료적 유효 수준을 달성하는) 단계를 포함한다. 일부 방법은 정상의 적어도 약 5% 내지 약 50% 또는 정상의 적어도 약 50% 내지 약 150% 의 FIX 활성 또는 발현 수준을 달성하는 단계를 포함한다. 일부 방법은, 정상 FIX 활성의 적어도 약 1% 내지 약 50%, 또는 정상 FIX 활성의 적어도 약 5% 내지 약 50%, 또는 정상 FIX 활성의 적어도 약 50% 내지 약 150% 의 환자의 기준 FIX 활성 또는 발현을 넘어서는 FIX 활성 또는 발현의 증가를 달성하는 단계를 포함한다. 일부 방법은 정상의 약 40% 내지 약 150%(즉, 정상의 40% 내지 150%)의 FIX 활성 또는 발현 수준을 달성하는 단계를 포함한다. 일부 방법은 정상의 약 40% 내지 약 100%(예를 들어, 정상의 40% 내지 100%)의 FIX 활성 또는 발현 수준을 달성하는 단계를 포함한다. 일부 방법은 정상의 약 40% 내지 약 150%(즉, 정상의 40% 내지 150%)의 FIX 활성 수준을 달성하는 단계를 포함한다. 일부 방법은 정상의 약 40% 내지 약 100%(예를 들어, 정상의 40% 내지 100%)의 FIX 활성 수준을 달성하는 단계를 포함한다. 일부 방법은 정상의 약 40% 내지 약 150%(즉, 정상의 40% 내지 150%)의 FIX 발현 수준을 달성하는 단계를 포함한다. 일부 방법은 정상의 약 40% 내지 약 100%(예를 들어, 정상의 40% 내지 100%)의 FIX 발현 수준을 달성하는 단계를 포함한다.

[0619] 구체적인 예에서, 대상체에서 FIX 활성 수준은 정상 FIX 활성 수준의 약 1% 내지 약 300%, 약 1% 내지 약 250%, 약 1% 내지 약 200%, 약 1% 내지 약 190%, 약 1% 내지 약 180%, 약 1% 내지 약 170%, 약 1% 내지 약 160%, 약 1% 내지 약 150%, 약 1% 내지 약 140%, 약 1% 내지 약 130%, 약 1% 내지 약 120%, 약 1% 내지 약 110%, 약 1% 내지 약 100%, 약 1% 내지 약 90%, 약 1% 내지 약 80%, 약 1% 내지 약 70%, 약 1% 내지 약 60%, 약 1% 내지 약 50%, 약 5% 내지 약 300%, 약 5% 내지 약 250%, 약 5% 내지 약 200%, 약 5% 내지 약 190%, 약 5% 내지 약 180%, 약 5% 내지 약 170%, 약 5% 내지 약 160%, 약 5% 내지 약 150%, 약 5% 내지 약 140%, 약 5% 내지 약 130%, 약 5% 내지 약 120%, 약 5% 내지 약 110%, 약 5% 내지 약 100%, 약 5% 내지 약 90%, 약 5% 내지 약 80%, 약 5% 내지 약 70%, 약 5% 내지 약 60%, 약 5% 내지 약 50%, 약 15% 내지 약 300%, 약 15% 내지 약 250%, 약 15% 내지 약 200%, 약 15% 내지 약 190%, 약 15% 내지 약 180%, 약 15% 내지 약 170%, 약 15% 내지 약 160%, 약 15% 내지 약 150%, 약 15% 내지 약 140%, 약 15% 내지 약 130%, 약 15% 내지 약 120%, 약 15% 내지 약 110%, 약 15% 내지 약 100%, 약 15% 내지 약 90%, 약 15% 내지 약 80%, 약 15% 내지 약 70%, 약 15% 내지 약 60%, 약 15% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 300%, 약 15% 내지 약 300%, 약 20% 내지 약 300%, 약 25% 내지 약 300%, 약 30% 내지 약 300%, 약 35% 내지 약 300%, 약 40% 내지 약 300%, 약 45% 내지 약 300%, 약 50% 내지 약 300%, 약 55% 내지 약 300%, 약 60% 내지 약 300%, 약 65% 내지 약 300%, 약 70% 내지 약 300%, 약 75% 내지 약 300%, 약 80% 내지 약 300%, 약 85% 내지 약 300%, 약 90% 내지 약 300%, 약 95% 내지 약 300%, 약 100% 내지 약 300%, 약 10% 내지 약 200%, 약 15% 내지 약 200%, 약 20% 내지 약 200%, 약 25% 내지 약 200%, 약 30% 내지 약 200%, 약 35% 내지 약 200%, 약 40% 내지 약 200%, 약 45% 내지 약 200%, 약 50% 내지 약 200%, 약 55% 내지 약 200%, 약 60% 내지 약 200%, 약 65% 내지 약 200%, 약 70% 내지 약 200%, 약 75% 내지 약 200%, 약 80% 내지 약 200%, 약 85% 내지 약 200%, 약 90% 내지 약 200%, 약 95% 내지 약 200%, 약 100% 내지 약 200%, 약 10% 내지 약 150%, 약 15% 내지 약 150%, 약 20% 내지 약 150%, 약 25% 내지 약 150%, 약 30% 내지 약 150%, 약 35% 내지 약 150%, 약 40% 내지 약 150%, 약 45% 내지 약 150%, 약 50% 내지 약 150%, 약 55%

내지 약 150%, 약 60% 내지 약 150%, 약 65% 내지 약 150%, 약 70% 내지 약 150%, 약 75% 내지 약 150%, 약 80% 내지 약 150%, 약 85% 내지 약 150%, 약 90% 내지 약 150%, 약 95% 내지 약 150%, 약 100% 내지 약 150%, 약 50% 내지 약 300%, 약 50% 내지 약 250%, 약 50% 내지 약 200%, 약 50% 내지 약 190%, 약 50% 내지 약 180%, 약 50% 내지 약 170%, 약 50% 내지 약 160%, 약 50% 내지 약 150%, 약 50% 내지 약 140%, 약 50% 내지 약 130%, 약 50% 내지 약 120%, 약 50% 내지 약 110%, 약 50% 내지 약 100%(예를 들어, 정상 FIX 활성 수준의 약 50% 내지 약 150%)로 증가된다.

[0620] 구체적인 예에서, 대상체에서 FIX 활성 수준은 정상 FIX 활성 수준의 약 5% 내지 약 200%, 약 10% 내지 약 190%, 약 20% 내지 약 180%, 약 30% 내지 약 170%, 약 40% 내지 약 160%, 약 50% 내지 약 150%, 약 60% 내지 약 140%, 약 70% 내지 약 130%, 약 80% 내지 약 120%, 또는 약 90% 내지 약 110%로(예를 들어, 또는 정상 FIX 활성 수준의 약 100%로) 증가된다.

[0621] 구체적인 예에서, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 정상 혈장 FIX 수준의 약 1% 내지 약 300%, 약 1% 내지 약 250%, 약 1% 내지 약 200%, 약 1% 내지 약 190%, 약 1% 내지 약 180%, 약 1% 내지 약 170%, 약 1% 내지 약 160%, 약 1% 내지 약 150%, 약 1% 내지 약 140%, 약 1% 내지 약 130%, 약 1% 내지 약 120%, 약 1% 내지 약 110%, 약 1% 내지 약 100%, 약 1% 내지 약 90%, 약 1% 내지 약 80%, 약 1% 내지 약 70%, 약 1% 내지 약 60%, 약 1% 내지 약 50%, 약 5% 내지 약 300%, 약 5% 내지 약 250%, 약 5% 내지 약 200%, 약 5% 내지 약 190%, 약 5% 내지 약 180%, 약 5% 내지 약 170%, 약 5% 내지 약 160%, 약 5% 내지 약 150%, 약 5% 내지 약 140%, 약 5% 내지 약 130%, 약 5% 내지 약 120%, 약 5% 내지 약 110%, 약 5% 내지 약 100%, 약 5% 내지 약 90%, 약 5% 내지 약 80%, 약 5% 내지 약 70%, 약 5% 내지 약 60%, 약 5% 내지 약 50%, 약 15% 내지 약 300%, 약 15% 내지 약 250%, 약 15% 내지 약 200%, 약 15% 내지 약 190%, 약 15% 내지 약 180%, 약 15% 내지 약 170%, 약 15% 내지 약 160%, 약 15% 내지 약 150%, 약 15% 내지 약 140%, 약 15% 내지 약 130%, 약 15% 내지 약 120%, 약 15% 내지 약 110%, 약 15% 내지 약 100%, 약 15% 내지 약 90%, 약 15% 내지 약 80%, 약 15% 내지 약 70%, 약 15% 내지 약 60%, 약 15% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 300%, 약 15% 내지 약 300%, 약 20% 내지 약 300%, 약 25% 내지 약 300%, 약 30% 내지 약 300%, 약 35% 내지 약 300%, 약 40% 내지 약 300%, 약 45% 내지 약 300%, 약 50% 내지 약 300%, 약 55% 내지 약 300%, 약 60% 내지 약 300%, 약 65% 내지 약 300%, 약 70% 내지 약 300%, 약 75% 내지 약 300%, 약 80% 내지 약 300%, 약 85% 내지 약 300%, 약 90% 내지 약 300%, 약 95% 내지 약 300%, 약 100% 내지 약 300%, 약 10% 내지 약 200%, 약 15% 내지 약 200%, 약 20% 내지 약 200%, 약 25% 내지 약 200%, 약 30% 내지 약 200%, 약 35% 내지 약 200%, 약 40% 내지 약 200%, 약 45% 내지 약 200%, 약 50% 내지 약 200%, 약 55% 내지 약 200%, 약 60% 내지 약 200%, 약 65% 내지 약 200%, 약 70% 내지 약 200%, 약 75% 내지 약 200%, 약 80% 내지 약 200%, 약 85% 내지 약 200%, 약 90% 내지 약 200%, 약 95% 내지 약 200%, 약 100% 내지 약 200%, 약 10% 내지 약 150%, 약 15% 내지 약 150%, 약 20% 내지 약 150%, 약 25% 내지 약 150%, 약 30% 내지 약 150%, 약 35% 내지 약 150%, 약 40% 내지 약 150%, 약 45% 내지 약 150%, 약 50% 내지 약 150%, 약 55% 내지 약 150%, 약 60% 내지 약 150%, 약 65% 내지 약 150%, 약 70% 내지 약 150%, 약 75% 내지 약 150%, 약 80% 내지 약 150%, 약 85% 내지 약 150%, 약 90% 내지 약 150%, 약 95% 내지 약 150%, 약 100% 내지 약 150%, 약 50% 내지 약 300%, 약 50% 내지 약 250%, 약 50% 내지 약 200%, 약 50% 내지 약 190%, 약 50% 내지 약 180%, 약 50% 내지 약 170%, 약 50% 내지 약 160%, 약 50% 내지 약 150%, 약 50% 내지 약 140%, 약 50% 내지 약 130%, 약 50% 내지 약 120%, 약 50% 내지 약 110%, 약 50% 내지 약 100%(예를 들어, 정상 혈장 FIX 수준의 약 50% 내지 약 150%)로 증가된다.

[0622] 구체적인 예에서, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 정상 혈장 FIX 수준의 약 5% 내지 약 200%, 약 10% 내지 약 190%, 약 20% 내지 약 180%, 약 30% 내지 약 170%, 약 40% 내지 약 160%, 약 50% 내지 약 150%, 약 60% 내지 약 140%, 약 70% 내지 약 130%, 약 80% 내지 약 120%, 또는 약 90% 내지 약 110%로(예를 들어, 또는 정상 혈장 FIX 수준의 약 100%로) 증가된다.

[0623] 구체적인 예에서, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 약 0.25 μg/mL 내지 약 15 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 14 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 13 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 12 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 11 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 9 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 8 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 7 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 6 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 5 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 4 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 3 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 2 μg/mL, 약 0.25 μg/mL 내지 약 1 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 15 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 14 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 13 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 12 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 11 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 9 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 8 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 7 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지

약 6 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 5 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 4 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 3 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 2 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 1 μg/mL, 약 0.5 μg/mL 내지 약 15 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 15 μg/mL, 약 1 μg/mL 내지 약 15 μg/mL, 약 2 μg/mL 내지 약 15 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 15 μg/mL, 약 4 μg/mL 내지 약 15 μg/mL, 약 5 μg/mL 내지 약 15 μg/mL, 약 0.5 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 1 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 2 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 4 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 5 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 0.5 μg/mL 내지 약 7.5 μg/mL, 약 0.75 μg/mL 내지 약 7.5 μg/mL, 약 1 μg/mL 내지 약 7.5 μg/mL, 약 2 μg/mL 내지 약 7.5 μg/mL, 약 2.5 μg/mL 내지 약 7.5 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 7.5 μg/mL, 약 4 μg/mL 내지 약 7.5 μg/mL, 약 5 μg/mL 내지 약 7.5 μg/mL, 약 2.5 μg/mL 내지 약 15 μg/mL, 약 2.5 μg/mL 내지 약 14 μg/mL, 약 2.5 μg/mL 내지 약 13 μg/mL, 약 2.5 μg/mL 내지 약 12 μg/mL, 약 2.5 μg/mL 내지 약 11 μg/mL, 약 2.5 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 2.5 μg/mL 내지 약 9 μg/mL, 약 2.5 μg/mL 내지 약 8 μg/mL, 약 2.5 μg/mL 내지 약 7 μg/mL, 약 2.5 μg/mL 내지 약 6 μg/mL, 약 2.5 μg/mL 내지 약 5 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 15 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 14 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 13 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 12 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 11 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 9 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 8 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 7 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 6 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 5 μg/mL(예를 들어,약 2.5 μg/mL 내지 약 7.5 μg/mL 또는 약 3 μg/mL 내지 약 5 μg/mL)로 증가된다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 1개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 2개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 3개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 4개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 5개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 6개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 9개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 12개월차이다.

[0624] 구체적인 예에서, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 약 0.5 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 1 μg/mL 내지 약 9 μg/mL, 약 2 μg/mL 내지 약 8 μg/mL, 약 3 μg/mL 내지 약 7 μg/mL, 또는 약 4 μg/mL 내지 약 6 μg/mL(예를 들어, 약 5 μg/mL)로 증가된다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 1개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 2개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 3개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 4개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 5개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 6개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 9개월차이다. 일부 구현예에서, 인용된 발현 수준은 투여 후 적어도 12개월차이다.

[0625] 구체적인 예에서, 대상체에서 FIX 활성 수준은 정상 FIX 활성 수준의 적어도 약 15%로 증가된다. 구체적인 예에서, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 정상 혈장 FIX 수준의 적어도 약 15%로 증가된다. 구체적인 예에서, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 적어도 약 0.75 μg/mL로 증가된다. 예를 들어, 방법은 B형 혈우병을 갖는 대상체에서 자연적 출혈을 예방 또는 억제하는 방법일 수 있고, 대상체에서 FIX 활성 수준은 정상 FIX 활성 수준의 적어도 약 15%로 증가되거나, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 정상 혈장 FIX 수준의 적어도 약 15%로 증가되거나, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 적어도 약 0.75 μg/mL로 증가된다.

[0626] 구체적인 예에서, 대상체에서 FIX 활성 수준은 정상 FIX 활성 수준의 약 300% 이하, 약 250% 이하, 약 200% 이하, 또는 약 150% 이하로 증가된다. 구체적인 예에서, 대상에서 혈장 FIX 수준은 정상 혈장 FIX 수준의 약 300% 이하, 약 250% 이하, 약 200% 이하, 또는 약 150% 이하로 증가된다.

[0627] 구체적인 예에서, 대상체는 중증 혈우병을 갖고, 대상체에서 FIX 활성 수준은 정상 FIX 활성 수준의 적어도 약 1%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100%로 증가된다.

[0628] 구체적인 예에서, 대상체는 중증 혈우병을 갖고, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 정상 혈장 FIX 수준의 적어도 약 1%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100%로 증가된다.

[0629] 구체적인 예에서, 대상체는 중증 혈우병을 갖고, 대상체에서 FIX 활성 수준은 정상 FIX 활성 수준의 약 1% 초과, 약 5% 초과, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40%

초과, 약 45% 초과, 약 50% 초과, 약 55% 초과, 약 60% 초과, 약 65% 초과, 약 70% 초과, 약 75% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 또는 약 100% 초과로 증가된다.

[0630] 구체적인 예에서, 대상체는 중증 혈우병을 갖고, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 정상 혈장 FIX 수준의 약 1% 초과, 약 5% 초과, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 약 50% 초과, 약 55% 초과, 약 60% 초과, 약 65% 초과, 약 70% 초과, 약 75% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 또는 약 100% 초과로 증가된다.

[0631] 구체적인 예에서, 대상체는 중등도 혈우병을 갖고, 대상체에서 FIX 활성 수준은 정상 FIX 활성 수준의 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100%로 증가된다.

[0632] 구체적인 예에서, 대상체는 중등도 혈우병을 갖고, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 정상 혈장 FIX 수준의 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100%로 증가된다.

[0633] 구체적인 예에서, 대상체는 중등도 혈우병을 갖고, 대상체에서 FIX 활성 수준은 정상 FIX 활성 수준의 약 5% 초과, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 약 50% 초과, 약 55% 초과, 약 60% 초과, 약 65% 초과, 약 70% 초과, 약 75% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 또는 약 100% 초과로 증가된다.

[0634] 구체적인 예에서, 대상체는 중등도 혈우병을 갖고, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 정상 혈장 FIX 수준의 약 5% 초과, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 약 50% 초과, 약 55% 초과, 약 60% 초과, 약 65% 초과, 약 70% 초과, 약 75% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 또는 약 100% 초과로 증가된다.

[0635] 구체적인 예에서, 대상체는 경증 혈우병을 갖고, 대상체에서 FIX 활성 수준은 정상 FIX 활성 수준의 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100%로 증가된다.

[0636] 구체적인 예에서, 대상체는 경증 혈우병을 갖고, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 정상 혈장 FIX 수준의 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100%로 증가된다.

[0637] 구체적인 예에서, 대상체는 경증 혈우병을 갖고, 대상체에서 FIX 활성 수준은 정상 FIX 활성 수준의 약 5% 초과, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 약 50% 초과, 약 55% 초과, 약 60% 초과, 약 65% 초과, 약 70% 초과, 약 75% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 또는 약 100% 초과로 증가된다.

[0638] 구체적인 예에서, 대상체는 경증 혈우병을 갖고, 대상체에서 혈장 FIX 수준은 정상 혈장 FIX 수준의 약 5% 초과, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 약 50% 초과, 약 55% 초과, 약 60% 초과, 약 65% 초과, 약 70% 초과, 약 75% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 또는 약 100% 초과로 증가된다.

[0639] 일부 방법은 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 6개월, 적어도 1년, 또는 적어도 2년 효과와 같은 영속적 효과를 달성하는 단계를 포함한다. 일부 방법은 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 6개월, 적어도 1년, 또는 적어도 2년 효과와 같은 영속적 그리고 지속적인 방식으로 치료 효과를 달성하는 단계를 포함한다. 일부 방법에서, 증가된 순환 FIX 활성 및/또는 발현 수준은 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 6개월, 적어도 1년, 또는 그 이상 동안 안정하다. 일부 방법에서, FIX 단백질의 정상 상태 활성 및/또는 수준은 적어도 7일, 적어도 14일, 또는 적어도 28일에 의해 달성된다. 추가의 방법에서, 방법은 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 4개월, 또는 적어도 6개월, 또는 적어도 1년, 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 또는 적어도 5년 동안 단일 용량 후에 FIX 활성 및/또는 수준을 유지하는 단계를 포함한다. 일부 방법은 적어도 8주, 적어도 24주, 예를 들어 적어도 1년(52주), 또는 임의로 적어도 2년 효과, 및 일부 구현예에서 적어도 3년, 적어도 4년, 또는 적어도

5년 효과와 같이 인간에서 영속적 또는 지속적인 효과를 달성하는 것을 포함한다. 일부 방법은 적어도 8주, 적어도 24주, 예를 들어 적어도 1년, 또는 임의로 적어도 2년 효과, 및 일부 구현예에서 적어도 3년, 적어도 4년, 또는 적어도 5년 효과와 같은 인간에서 영속적 그리고 지속적인 방식으로 치료 효과를 달성하는 단계를 포함한다. 일부 방법에서, 인간에서 증가된 FIX 활성 및/또는 발현 수준은 적어도 8주, 적어도 24주, 예를 들어, 적어도 1년, 임의로 적어도 2년, 및 일부 구현예에서, 적어도 3년, 적어도 4년, 또는 적어도 5년 동안 안정하다. 일부 방법에서, 인간에서 FIX의 정상 상태 활성 및/또는 수준은 적어도 7일, 적어도 14일, 또는 적어도 28일, 임의로 적어도 56일, 적어도 80일, 또는 적어도 96일에 의해 달성된다. 추가의 방법에서, 방법은 인간에서 단일 용량 후에 적어도 8주, 적어도 16주, 또는 적어도 24주, 또는 일부 구현예에서 적어도 1년, 또는 적어도 2년, 임의로 적어도 3년, 적어도 4년, 또는 적어도 5년 동안 FIX 활성 및/또는 수준을 유지하는 단계를 포함한다. 예를 들어, FIX의 발현은 적어도 약 8주, 적어도 약 12주, 적어도 약 24주, 소정의 구현예에서, 치료 후 적어도 약 1년, 또는 적어도 약 2년, 및 일부 구현예에서, 치료 후 적어도 3년, 적어도 4년, 또는 적어도 5년 동안 인간 대상체에서 지속될 수 있다. 마찬가지로, FIX의 활성은 적어도 약 8주, 적어도 약 12주, 적어도 약 24주, 소정의 구현예에서 치료 후 적어도 약 1년, 또는 적어도 약 2년 동안, 그리고 일부 구현예에서, 치료 후 적어도 3년, 적어도 4년, 또는 적어도 5년 동안 인간 대상체에서 지속될 수 있다. 일부 방법에서, FIX의 발현 또는 활성은 치료 전 FIX의 발현 또는 활성(즉, 대상체의 기준)보다 더 높은 수준으로 유지된다. 일부 방법에서, FIX의 발현 또는 활성은 치료적 유효 수준의 발현 또는 활성으로 유지되는 경우 지속된 것으로 간주된다. 다른 유기체에서, 상대적인 기간은, 예를 들어, 수명 및 발달 단계에 기초하여 이해되고, 상기 개시내용 내에서 다루어진다. 일부 방법에서, FIX의 발현 또는 활성은 투여 후 6개월에 인간에서 발현 또는 활성이 투여 후 6개월, 투여 후 1년, 또는 투여 후 2년에 그 대상체에 대해 측정된 발현 또는 활성의 피크 수준의 발현 또는 활성의 적어도 50%인 경우 "지속된" 것으로 간주된다. 소정의 구현예에서, 6개월, 예를 들어, 24주 내지 28주에서, 투여 후 발현 또는 활성은 그 대상체에 대해 측정된 발현 또는 활성의 피크 수준의 발현 또는 활성의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 80%이다. 소정의 구현예에서, 1년, 즉 약 12개월, 예를 들어 11개월 내지 13개월, 투여 후 발현 또는 활성은 그 대상체에 대해 측정된 발현 또는 활성의 피크 수준의 발현 또는 활성의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 80%이다. 소정의 구현예에서, 2년, 즉 약 24개월, 예를 들어 23개월 내지 25개월, 투여 후 발현 또는 활성은 그 대상체에 대해 측정된 발현 또는 활성의 피크 수준의 발현 또는 활성의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 80%이다. 소정의 구현예에서, 투여 후 6개월에 발현 또는 활성은 그 대상체에 대해 측정된 발현 또는 활성의 피크 수준의 발현 또는 활성의 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%이다. 소정의 구현예에서, 투여 후 1년에 발현 또는 활성은 그 대상체에 대해 측정된 발현 또는 활성의 피크 수준의 발현 또는 활성의 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%이다. 소정의 구현예에서, 투여 후 2년에 발현 또는 활성은 그 대상체에 대해 측정된 발현 또는 활성의 피크 수준의 발현 또는 활성의 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%이다. 바람직한 구현예에서, 대상체는 FIX의 발현 또는 활성 수준의 일상적인 모니터링, 예를 들어, 매주, 매월, 특히 투여 후 초기, 예를 들어, 처음 6개월 이내에 일상적인 모니터링을 갖는다. 주기적 측정은 발현 또는 활성에 미치는 효과가, 예를 들어 투여 후 6개월, 투여 후 1년, 또는 투여 후 2년 동안 지속되는 것을 확립할 수 있다. 일부 방법에서 신생아 대상체에서, FIX의 발현은 신생아 대상체가 성인이 되는 경우에 지속된다. 일부 방법에서, FIX의 발현은 대상체 또는 신생아 대상체의 생애에 대해 지속된다.

[0640] 일부 방법에서, FIX의 발현 또는 활성은 투여 후 24주에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 FIX의 발현 또는 활성의 적어도 50%이다. 일부 방법에서, FIX의 발현 또는 활성은 투여 후 1년에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 FIX의 발현 또는 활성의 적어도 50%이다. 일부 방법에서, FIX의 발현 또는 활성은 투여 후 24주에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 FIX의 발현 또는 활성의 적어도 60%이다. 일부 방법에서, FIX의 발현 또는 활성은 투여 후 2년에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 FIX의 발현 또는 활성의 적어도 50%이다. 일부 방법에서, FIX의 발현 또는 활성은 투여 후 2년에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 FIX의 발현 또는 활성의 적어도 60%이다. 일부 방법에서, FIX의 발현 또는 활성은 투여 후 24주에 인간 대상체에 대해 측정된 발현의 피크 수준에서 FIX의 발현 또는 활성의 적어도 60%이다.

[0641] *ALB* 유전자좌로의 삽입을 수반하는 일부 방법에서, 대상체의 순환 알부민 수준 또는 세포의 알부민 수준은 정상이다. 이러한 방법은 대상체의 순환 알부민 수준 또는 세포의 알부민 수준을 정상 순환 알부민 수준 또는 정상 알부민 수준의 ±5%, ±10%, ±15%, ±20% 또는 ±50% 이내로 유지하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 방법에서, 대상체 또는 세포의 알부민 수준은 적어도 4주, 적어도 8주, 적어도 12주, 또는 적어도 20주에 의해 미치료 개체의 알부민 수준과 비교하여 변하지 않는다. 일부 방법에서, 대상체의 또는 세포의 알부민 수준은 일시적으로 떨어지고, 이어서 정상 수준으로 복귀한다. 특히, 방법은 혈장 알부민의 수준에서 유의한 변경을

검출하지 않는 것을 포함할 수 있다.

[0642] 일부 방법에서, B형 혈우병 또는 FIX 결핍을 치료하기에 적합한 추가 요법과 함께 본원에 개시된 FIX를 발현하기 위한 임의의 조성물을 포함하는 조합 요법이 사용된다. 일례로, 본원에 기재된 방법은 다른 지혈제, 혈액 인자, 및 약물의 사용과 조합될 수 있다. 예를 들어, 대상체는 인자 XI, 인자 XII, 프리칼리크레인, 고분자량 키니노겐(HMWK), 인자 V, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 X, 인자 XIII, 인자 II, 인자 VIIa, 및 폰빌레브란트 인자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 인자의 치료적 유효량을 투여받을 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 치료는 인자 Xa, 인자 IXa, 인자 XIa, 인자 XIIa, 및 VIIIa, 프리칼레크레인, 및 고분자량 키니노겐을 포함하는, 내재성 응고 경로의 활성화제와 같은 응혈원을 투여하는 단계; 또는 조직 인자, 인자 VIIa, 인자 Va, 및 인자 Xa를 포함하는 외인성 응고 경로의 활성화제를 추가로 포함할 수 있다.

[0643] 일부 방법에서, 방법은 본원에 기재된 임의의 *F9* 핵산 구조체를 투여하기 전에 대상체에서 기존의 항-AAV(예를 들어, 항-AAV8) 면역력을 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, 이러한 방법은 총 항체(TAb) 면역 검정 또는 중화 항체(NAb) 검정을 사용하여 면역원성을 평가하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Manno et al. (2006) *Nat. Med.* 12(3):342-347], 문헌[Kruzik et al. (2019) *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 14:126-133], 및 문헌[Weber (2021) *Front. Immunol.* 12:658399]을 참고하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 일부 구현예에서, TAb 검정은 AAV 벡터에 결합하는 항체를 찾는 반면, Nab 검정은 존재하는 항체가 표적 세포를 형질도입하는 것으로부터 AAV 벡터를 정지하는지 여부를 평가한다. TAb 검정을 사용하여, 약물 생성물 또는 빈 캡시드를 사용하여 항체를 포획할 수 있고; NAb 검정은 리포터 벡터(예를 들어, 루시퍼라제를 인코딩하는 AAV 벡터의 버전)를 필요로 할 수 있다.

[0644] 상기 또는 아래에 인용된 모든 특허출원, 웹사이트, 기타 간행물, 수탁번호 등은 각 개별 항목이 구체적으로 및 개별적으로 참조로서 그렇게 포함되는 것으로 표시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다. 상이한 버전들의 서열이 다양한 시점에서 특정 수탁 번호와 연관되는 경우, 본원의 유효 출원일에서의 수탁 번호와 연관된 버전을 의미한다. 유효 출원일은, 해당되는 경우 수탁 번호를 언급하는 우선권 출원의 출원일 또는 실제 출원일 중 더 빠른 날짜를 의미한다. 마찬가지로 상이한 버전들의 간행물, 웹사이트 등이 다양한 시점에서 공개된 경우, 달리 지시되지 않는 한, 본원의 유효 출원일에서 가장 최근에 공개된 버전을 의미한다. 본 발명의 임의의 특징, 단계, 요소, 구현예, 또는 양태는 달리 구체적으로 표시되지 않는 한 임의의 다른 것과 조합하여 사용될 수 있다. 명확성과 이해의 목적을 위해 예시 및 실시예를 통해 본 발명은 어느 정도 상세하게 기재되었지만, 첨부된 청구범위의 범위 내에서 특정 변경 및 변형이 실시될 수 있다는 것이 명백할 것이다.

[0645] **서열의 간단한 설명**

[0646] 첨부된 서열 목록에서 나열된 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 뉴클레오티드 염기에 대해서는 표준 글자 약어, 및 아미노산에 대해서는 3-글자 코드를 사용하여 제시된다. 뉴클레오티드 서열은 서열의 5' 단부에서 시작하여 3' 단부까지 순방향으로(즉, 각각의 선(line)에서 좌측으로부터 우측으로) 진행되는 표준 관계를 따른다. 각각의 뉴클레오티드 서열의 단지 1개 가닥만 제시되지만, 상보적 가닥은 표시된 가닥에 대한 임의의 참조에 의해 포함되어 있는 것으로 이해된다. 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 제공될 때, 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 이의 코돈 축퇴(codon degenerate) 변이체가 또한 제공되는 것으로 이해된다. 아미노산 서열은 서열의 아미노 말단에서 시작하여 카르복시 말단까지 순방향으로(즉, 각각의 선에서 좌측으로부터 우측으로) 진행되는 표준 관계를 따른다.

[0647] [표 9]

서열의 설명.

서열번호	유형	설명
1	단백질	인간 인자 IX 단백질 NCBI 수탁번호 NP_000124.1
2	DNA	인간 *F9* mRNA(cDNA) NCBI 수탁번호 NM_000133.4
3	DNA	인간 *F9* CDS CCDS ID CCDS14666.1
4	DNA	인간 *ALB* 인트론 1
5	DNA	가이드 RNA 표적 서열 + PAM v1
6	DNA	가이드 RNA 표적 서열 + PAM v2
7	DNA	가이드 RNA 표적 서열 + PAM v3
8	단백질	SpCas9 단백질 V1
9	DNA	SpCas9 DNA V1
10	DNA	SpCas9 mRNA(cDNA)
11	단백질	SpCas9 단백질 V2
12	RNA	SpCas9 mRNA V2
13	단백질	SV40 NLS v1
14	단백질	SV40 NLS v2
15	단백질	뉴클레오플라스민 NLS
16	RNA	crRNA 테일 v1
17	RNA	crRNA 테일 v2
18	RNA	TracrRNA v1
19	RNA	TracrRNA v2
20	RNA	TracrRNA v3
21	RNA	gRNA 스캐폴드 v1
22	RNA	gRNA 스캐폴드 v2
23	RNA	gRNA 스캐폴드 v3
24	RNA	gRNA 스캐폴드 v4
25	RNA	gRNA 스캐폴드 v5
26	RNA	gRNA 스캐폴드 v6
27	RNA	gRNA 스캐폴드 v7
28	RNA	gRNA 스캐폴드 v8
29	RNA	변형된 gRNA 스캐폴드
30 내지 61	RNA	인간 *ALB* 인트론 1 가이드 서열
62 내지 125	RNA	인간 *ALB* 인트론 1 가이드 서열
126 내지 157	DNA	인간 *ALB* 인트론 1 가이드 RNA 표적 서열
158	DNA	자연 *F9* 인서트
159	DNA	스플라이스 *F9* 인서트가 제거되지 않은 자연 CpG
160	DNA	*F9* 인서트가 제거된 자연 CpG
161	DNA	*F9* 인서트가 제거된 자연 스플라이스
162	DNA	코돈 최적화된 *F9* 인서트
163	DNA	COMP *F9* 인서트
164	DNA	DC *F9* 인서트
165	DNA	GA *F9* 인서트
166	DNA	CpG0 *F9* 인서트
167	DNA	CpG3 *F9* 인서트
168	DNA	CpG *F9* 인서트가 없는 CpG10

[0648]

서열번호	유형	설명
169	DNA	CpG10 *F9* 인서트
170	DNA	CpG *F9* 인서트가 없는 CpG20
171	DNA	CpG20 *F9* 인서트
172	DNA	인서트 72
173	DNA	인서트 18
174	DNA	인서트 19
175	DNA	인서트 20
176	DNA	인서트 21
177	DNA	인서트 27
178	DNA	인서트 28
179	DNA	인서트 29
180	DNA	인서트 30
181	DNA	인서트 36
182	DNA	인서트 37
183	DNA	인서트 38
184	DNA	인서트 39
185	DNA	인서트 22
186	DNA	인서트 23
187	DNA	인서트 24
188	DNA	인서트 25
189	DNA	인서트 26
190	DNA	인서트 31
191	DNA	인서트 32
192	DNA	인서트 33
193	DNA	인서트 34
194	DNA	인서트 35
195	단백질	*F9* 인서트에 의해 인코딩된 FIX
196	DNA	ITR 145
197	DNA	ITR 141
198	DNA	ITR 130
199	DNA	SV40 폴리 A
200	DNA	CpG 고갈된 bGH 폴리 A
201	DNA	마우스 *Alb* 엑손 2 스플라이스 수용체
202	DNA	ITR 이 없는 인서트 72
203	DNA	ITR 이 없는 인서트 18
204	DNA	ITR 이 없는 인서트 19
205	DNA	ITR 이 없는 인서트 20
206	DNA	ITR 이 없는 인서트 21
207	DNA	ITR 이 없는 인서트 27
208	DNA	ITR 이 없는 인서트 28
209	DNA	ITR 이 없는 인서트 29
210	DNA	ITR 이 없는 인서트 30
211	DNA	ITR 이 없는 인서트 36
212	DNA	ITR 이 없는 인서트 37
213	DNA	ITR 이 없는 인서트 38
214	DNA	ITR 이 없는 인서트 39
215	DNA	ITR 이 없는 인서트 22

[0649]

서열번호	유형	설명
216	DNA	ITR 이 없는 인서트 23
217	DNA	ITR 이 없는 인서트 24
218	DNA	ITR 이 없는 인서트 25
219	DNA	ITR 이 없는 인서트 26
220	DNA	ITR 이 없는 인서트 31
221	DNA	ITR 이 없는 인서트 32
222	DNA	ITR 이 없는 인서트 33
223	DNA	ITR 이 없는 인서트 34
224	DNA	ITR 이 없는 인서트 35
225	RNA	Cas9 mRNA
226	RNA	Cas9 mRNA CDS
227	DNA	Cas9 CDS
228	RNA	마우스 *Alb* 인트론 1 가이드 서열 g666
229	DNA	마우스 *Alb* 인트론 1 가이드 RNA 표적 서열 g666
230 내지 231	RNA	마우스 *Alb* 인트론 1 sgRNA 서열 g666

[0650]

[0651] **실시예**

[0652] **실시예 1. 단일 가이드 RNA 및 DNA 템플릿 선택**

[0653] B형 혈우병은 *인자 9*(*F9*) 유전자 및 인자 IX(FIX) 단백질이 결손되거나 결함이 있는 유전적 장애로, 출혈 장애를 초래한다. B형 혈우병 환자는 혈전에 감소된 능력을 나타낸다. 혈장 내 FIX 단백질을 복원하기 위해 알부민(*ALB*) 유전자좌에 표적화된 이식유전자 삽입을 사용하여 B형 혈우병을 치료하는 접근법이 본원에 기재된다.

이 방법은 재조합 아데노-연관 바이러스 혈청형 8(rAAV8)에 포함된 양방향 *F9* DNA 유전자 삽입 템플릿과 관련된 지질 나노입자(LNP) 전달 시스템에 함유된 CRISPR/Cas9 유전자 편집 기술에 기초한다. 대안적인 방법은 재조합 아데노-연관 바이러스 혈청형 8(rAAV8)에 함유된 일방향 *F9* DNA 유전자 삽입 템플릿과 관련된 지질 나노입자(LNP) 전달 시스템에 포함된 CRISPR/Cas9 유전자 편집 기술에 기초한다. CRISPR/Cas9 성분은 간세포의 *ALB* 게놈 유전자좌에서 이중 가닥 DNA를 표적화하고 절단하도록 설계되어, AAV 벡터에 의해 전달되는 *F9* DNA 템플릿이 안전 항만 유전자좌에서 유전체에 삽입될 수 있다. 도 2를 참조한다. 이식유전자 삽입은 B형 혈우병 환자에서 결손되거나 결함이 있는 게놈 *F9*를 인코딩하는 기능성 *F9* 유전자를 제공한다. 본원에 기재된 유전자 삽입 플랫폼은 단일 1회 용량 후에 환자의 생애에 대해 혈장에서 정상 수준의 FIX를 복원할 수 있다. 본원에 기재된 유전자 삽입 플랫폼은 AAV 에피솜 유전자 치료법의 기존 한계 중 몇 가지를 극복할 수 있다.

[0654] AAV 벡터는 생체내 세포에 대한 치료용 이식유전자의 강력한 전달 비히클이다. 특히, AAV 혈청형 8(AAV8)을 포함한 여러 AAV 혈청형은 마우스, 비인간 영장류, 및 인간 환자에서 전신 주사 시 간세포를 표적화할 수 있다. 이와 같이, 간-발현된 유전자에서 결핍에 의해 야기되는 장애는 AAV-기반 유전자 요법에 대한 잠재적인 후보이다. 하나의 이러한 질환은 *F9* 유전자에 의해 암호화된 FIX 단백질의 결핍 또는 돌연변이에 의해 발생하는 B형 혈우병이다.

[0655] *F9* 유전자는 간세포에서 배타적으로 발현되어, 간에 의한 FIX 단백질의 합성을 초래한다. 따라서, CRISPR/Cas9 유도 이중 가닥 절단부(DSB)가 형성된 후 특정 안전 항만 부위에서 프로모터가 없는 *F9*-인코딩 DNA가 숙주 세포 DNA에 영구적으로 통합되는 표적 유전자 삽입 플랫폼이 개발되었다.

[0656] *F9* DNA 템플릿은 rAAV8 벡터에 의해 세포 내로 반입되고, CRISPR/Cas9 RNA 성분(Cas9 mRNA 및 sgRNA)은 LNP-매개 전달에 의해 간세포로 전달된다(**도 3**). rAAV-전달 *F9* DNA 카세트는 프로모터가 없고, 대신에 삽입 유전자좌의 전사가 FIX 단백질을 인코딩하는 치료적 이식유전자의 발현을 유도하도록 하는 것이다.

[0657] AAV8 혈청형은 여러 모델 시스템에서 간을 표적화하는 능력, 유리한 제조 프로파일 및 혈우병 분야의 여러 시험을 포함한 인간 임상 시험에서 간-영양(tropic) 벡터로서의 사용으로 인해 삽입 플랫폼의 혈청형으로 선택되었다.

[0658] *ALB* 유전자좌는 간세포에서 강력한 발현을 갖는 간 안전 항만 부위이다. 또한, 엑손 1에 신호 펩티드가 존재하며, 이는 하류에 삽입된 이식유전자의 분비를 매개하도록 흡수될(co-opted) 수 있다. CRISPR/Cas9 성분을 지시하는 단일 가이드 RNA(sgRNA)는 *ALB* 유전자의 인트론 1 내에 절단을 생성하도록 설계되었다. 삽입된 *F9* 유전자는 *ALB* 프로모터 및 발현을 위한 시작 코돈에 의존하고, 분비를 위한 ALB 신호 펩티드에 의존한다.

[0659] rAAV8-전달된 DNA 삽입 템플릿은 *ALB* sgRNA 표적 부위를 플랭킹하는 뉴클레오티드와 상동성을 갖지 않고, 상동성-독립적인 메커니즘을 통해 삽입된다. 따라서 삽입 카세트는 양방향으로 설계되었고, 센스 및 안티센스 방향 모두에서 야생형 FIX 단백질의 사본을 인코딩하여 삽입 배향 중 하나가 FIX 단백질 발현을 지원할 수 있다. 그러나, 일방향 삽입 카세트가 또한 사용될 수 있다. 스플라이스 수용체 부위는 각각의 *F9* 이식유전자의 상류에 인코딩되고, 폴리아데닐화 서열은 *F9*의 각각의 사본의 다운스트림에 인코딩된다(**도 2**). 따라서 *ALB* 엑손 1 스플라이스 공여체는 *F9* DNA 템플릿에 암호화된 스플라이스 수용체와 결합된다.

[0660] 요약하면, LNP에 의해 전달되는 매우 정확하고 표적화된 CRISPR/Cas9 기술과 선택된 rAAV8 벡터에 의해 전달되는 *F9* DNA 템플릿의 조합은 간세포로부터 야생형 FIX 단백질의 장기간 발현을 허용하여 잠재적으로 B형 혈우병 환자에게 평생 동안 효과적인 치료법을 제공할 수 있다. 또한, FIX 발현은 gRNA의 효율, AAV 템플릿의 용량, 및 LNP의 용량에 의해 조정될 수 있다.

[0661] ***단일 가이드 RNA 설계 및 선택***

[0662] *ALB* 유전자좌는 간세포에서 가장 많이 발현되는 유전자좌이며, 알부민 분비를 매개하는 신호 펩티드가 엑손 1에서 발견되어 삽입된 이식유전자의 분비 촉진에 사용될 수 있기 때문에 *F9* DNA 템플릿의 삽입 부위로 선택되었다. 인간 *ALB* 유전자좌는 Cas9 유도 DNA 절단이 발생할 수 있는 유전자좌의 첫 번째 인트론에서 표적 부위 목록을 생성하기 위해 특정 CRISPR/Cas9 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 부위의 존재에 대해 평가되었다. 선택된 부위가 gRNA 효율에 영향을 미칠 수 있는 공통 SNP를 갖지 않도록 하기 위해 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP) 분석에 대해 부위를 교차 참조했다. 그 후에, sgRNA의 목록을 생성하였다. **표 10**을 참조한다. 후보 sgRNA를 합성하고 시험관내 및 생체내 평가를 위해 Cas9 mRNA가 있는 LNP로 제형화하였다.

[0663] [표 10]

인간 *ALB* 인트론 1 가이드 RNA.

가이드 RNA	서열번호 (DNA-표적화 세그먼트)	서열번호 (비변형된 sgRNA)	서열번호 (변형된 sgRNA)	서열번호 (가이드 RNA 표적 서열)
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

[0664]

[0665] LNP는 먼저 양방향 *nanoluc*-인코딩 AAV 삽입 템플릿을 리포터로 사용하여 1차 인간 간세포(PHH)에서 스크리닝되었다. *nanoluc*의 표적 삽입을 지원하는 LNP는 PHH 배양의 상등액으로 분비되는 *nanoluc* 단백질을 측정하여 확인되었다.

[0666] 그 후에, 초기 PHH 스크리닝을 통과한 후보는 인간화된 *ALB* 유전자좌와 *F9* 유전자 결핍을 모두 포함하는 유전자 조작 마우스에서 생체내 유전자 삽입을 지원하는 능력에 대해 테스트되었다. 생체내 연구의 상위 후보는 표적-외 절단에 대해 기능적으로 평가되었다.

[0667] *ALB*-표적 sgRNA 9860으로 제형화된 LNPF9는 여러 플랫폼(1차 인간 및 비인간 영장류 간세포, *ALB* 인간화 마우스, 비인간 영장류), 확인된 표적-외 부위 부재, 종 간 번역, 표적 부위에 공통 인간 SNP 부족, 그룹 내 hFIX 발현의 낮은 변동성, 및 용량 범위에서의 성능에서 강력한 hFIX 발현 수준에 대한 지원을 바탕으로 개발 후보로 선정되었다(**도 3**). sgRNA 9860의 표적 부위는 시노몰구스 원숭이에서 보존된다. LNPF9는 인간 게놈에서 검출 가능한 표적-외 부위가 없었고(포화 수준의 편집에서 두 개의 1차 인간 간세포에서 수행된 표적화된 앰플리콘(amplicon) 시퀀싱(rhAMP-Seq)에서는 *ALB*에서 표적-내 이외의 어떤 유전자좌도 검증하지 못함), 1차 인간 및 비인간 영장류 간세포, *ALB* 인간화 마우스, 및 비인간 영장류에 삽입을 통해 FIX 발현을 지원하였다.

[0668] ***LNPF9 설명 및 제조***

[0669] LNPF9는 약 100개의 뉴클레오티드 길이의 sgRNA 및 4개의 상이한 지질로 구성된 LNP에 캡슐화된 Cas9-인코딩 mRNA를 포함하는 지질 나노입자이다. LNP의 조성물은 **표 11**에 요약되어 있다. LNPF9는 하기 몰비: 50mol%의 지질 A, 9mol%의 DSPC, 38mol%의 콜레스테롤, 및 3mol%의 PEG2k-DMG로 4개의 지질을 포함하고, pH 7.4에서 50mM의 Tris-HCl, 45mM의 NaCl, 5%(w/v)의 수크로스로 구성된 수성 완충액에서 제형화된다. N:P 비는 약 6이고, gRNA:Cas9 mRNA 비는 약 1:2 중량비이다. LNP는 단일 정맥내(IV) 투여를 위해 의도된다.

[0670] [표 11]

지질 나노입자(LNPF9) 조성물.

성분	설명
활성 약제학적 성분	Cas9 mRNA sgRNA(gRNA9860)
지질 부형제	지질 A: (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트 콜레스테롤 DSPC PEG2K-DMG
다른 부형제	트리스, NaCl, 수크로스 WFI

[0671]

[0672] LNPF9는 지질 나노입자에 캡슐화된 2개의 CRISPR/Cas9 분자로 이루어진다. 첫 번째는 sgRNA 9860이고, 이는 33 킬로달톤(kDa)의 분자량을 갖는 100개의 뉴클레오티드로 구성되며, 인간 *ALB* 유전자의 인트론 1에서 표적 영역과 상보적인 20개의 뉴클레오티드 서열을 함유하는 단일 가이드 RNA(sgRNA) 서열이다. g9860에 의해 인식된 표적 서열은 시노몰구스 원숭이 *mfA1b* 유전자 인트론 1에 보존되어 있다. 두 번째는 CRISPR-관련 Cas9 단백질을 코딩하는 코돈-최적화된 메신저 RNA(mRNA) 서열로서, 약 1.5메가달톤(MDa)의 분자량을 갖는 약 4,400개의 뉴클레오티드로 이루어져 있다. Cas9 mRNA로부터 발현된 Cas9 단백질은 sgRNA 9860이 PAM과 연관된 표적화된 상보적 DNA 서열에 결합하는 경우에만 DNA를 절단하도록 지시된다.

[0673] *ALB* 유전자좌는 간세포에서 특이적으로 그리고 강력하게 발현되기 때문에 삽입을 위한 표적화된 부위로서 선택되었다. 또한, ALB 신호 펩티드는 엑손 1로 인코딩되고, 이는 하류에 삽입된 전이유전자의 분비를 매개하도록 흡수될 수 있다. 따라서 삽입된 *F9* 유전자는 *ALB* 프로모터에 의존하고, 발현을 위한 코돈 및 분비를 위한 ALB 신호 펩티드를 시작한다. *ALB* 유전자좌 내의 유전자 삽입은 삽입을 통해 *ALB* 유전자의 극히 일부만 수정되기 때문에 전반적인 혈청 알부민 수준에 실질적인 영향을 미치지 않을 것으로 예상된다.

[0674] ***단일 가이드 RNA***. LNPF9에 사용된 단일 가이드 RNA(sgRNA 9860)는 표준 고체상 포스포로아미다이트 올리고뉴클레오티드 합성을 통해 제조된 100량체 올리고뉴클레오티드이다. 제조는 고체 지지체에 고정된 3' 말단 우라실 뉴클레오티드로부터 구축된 99-사이클 화학 합성으로 이루어진다. 화학적 변형은 합성 동안 100량체에 혼입되며, 여기에는 sgRNA의 5'- 및 3'-단부에 있는 포스포로티오에이트(PS) 결합과 RNA의 일부 당에 대한 2'-O-메틸 변형이 포함된다. 합성 후, 100량체를 고체 지지체로부터 절단한 후 보호기를 제거한다. 미정제 100량체 생성물의 정제는 이온 교환 크로마토그래피에 의해 완료된다. 크로마토그래피 분획을 모으고, 완충액 교환하고, 탈염하고, 물에서 -65℃ 미만에서 냉동 보관한다.

[0675] ***Cas9 mRNA***. LNP9에 사용된 Cas9 메신저 RNA(mRNA)는 *스트렙토콕커스 피오게네스*의 Cas9 단백질 서열을 기반으로 한다. Cas9-인코딩 mRNA(서열번호 225, 서열번호 226에 기재된 CDS와 함께)는 길이가 약 4400개 뉴클레오티드이며, 선형화된 DNA 템플릿과 T7 RNA 중합효소를 사용하여 시험관내 전사(IVT) 반응을 통해 합성된다. 서열은 5' 캡, 5' 비번역 영역(UTR), Cas9 단백질을 인코딩하는 개방형 리딩 프레임(ORF), 3' UTR 및 폴리A 테일을 함유한다. 5' 캡은 안티-리버스 캡 유사체(ARCA)로 공지된 합성 캡 유사체 구조체를 사용하여 동시-전사적으로 생성된다. IVT 반응에 사용되는 뉴클레오티드(NTP)는 3개의 비변형된 NTP, ATP, CTP, 및 GTP, 그리고 하나의 변형된 뉴클레오티드, N1-메틸 슈도-UTP를 포함한다. IVT 반응의 완료 후, 미정제 mRNA는 염화리튬 및 접선 유동 여과에 의한 선택적 침전에 의해 정제된다. 최종 정제된 mRNA를 물 중에 -80℃에서 냉동시킨다(-65℃ 미만).

[0676] mRNA 서열의 우라실은 시험관내 전사 동안 변형된 N^1 메틸 슈도우리딘으로 완전히 대체되었다. N^1 메틸슈도우리딘은 우라실의 자연 유도체이고, mRNA 내로의 이의 혼입은 단백질 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. mRNA의 5' 단부는 안정성을 증가시키기 위해 합성 캡 유사체 구조체를 갖는다. 대략 100개의 뉴클레오티드의 폴리-A 테일은 mRNA 분자에 추가적인 세포내 안정성을 부여한다.

[0677] *Cas9* mRNA는 재조합 효소 공정을 이용하여 시험관내 전사를 통해 생산될 수 있다. 주요 성분은 **표 12**에 요약되어 있다. mRNA 합성을 위한 템플릿은 *이. 콜라이*에서 생산되는 플라스미드 내에 포함된 Cas9 인코딩 서열일 수 있다.

[0678] [표 12]

주요 mRNA 공정 성분의 요약

성분	설명	목적
뉴클레오티드	N1-메틸슈도우리딘-5'-트리포스페이트	출발 물질
	아데노신 트리포스페이트	
	시티딘 트리포스페이트	
	구아노신 트리포스페이트	
mRNA 캡	ARCA 또는 CleanCap™	mRNA 에 대한 합성 "캡"
단백질/효소	T7 중합효소	mRNA 의 중합체 연장을 위한 재조합 효소
	RNase 억제제	트레이스 Rnase 존재에 의한 mRNA 의 분해를 방지하기 위한 재조합 효소
	피로포스파타제	디포스페이트 절단 생성물을 제거하기 위한 재조합 효소(T7pol 을 억제함)
	DNase(Turbo, TF)	mRNA 의 합성 후 분해 플라스미드 템플릿은 완료됨
Cas9 유전자 서열을 인코딩하는 플라스미드	선형화된 플라스미드	Cas9 mRNA 를 인코딩하기 위한 템플릿

[0679]

[0680] 플라스미드는 표준 방법에 의해 추출되고 정제된다. 이 출발 물질은 정의된 사양에 대해 시험 및 방출된다. 플라스미드는 제한 분해에 의해 선형화되고, mRNA를 제조하기 위한 템플릿으로서 사용하기 전에 이 엔도뉴클레아제로부터 정제된다. 플라스미드는 벌크 용액으로서 냉동 저장된다.

[0681] *Cas9* mRNA는 선형화된 플라스미드 주형에 의해 제공되는 T7 RNA 중합효소 촉진체에 의해 구동되는 시험관내 전사(IVT) 반응에 의해 생성된다. IVT 과정은 2시간 내지 4시간, 37℃ 반응을 통해 진행되며, 여기서 T7 중합효소는 초기 사슬의 5' 단부에서 합성 안티-리버스 캡 유사체(예를 들어, ARCA)로 전사를 시작한 다음 dsDNA 템플릿의 단부에 도달하고 약 4,514개 뉴클레오티드의 mRNA 분자를 방출할 때까지 성장하는 단일 가닥 mRNA에 적절한 상응하는 뉴클레오티드를 순차적이고 점진적으로 추가한다.

[0682] IVT 반응 후, 나머지 플라스미드 DNA(pDNA) 템플릿은 DNase 분해에 의해 분해된다. 후속 하류 정제 단계를 수행하여 출발 물질을 제거하고 mRNA 약물 물질을 농축시킨다. 벌크 *Cas9* mRNA는 방출 시험을 거치고 -20℃ 이하에서 냉동 저장된다.

[0683] ***지질 부형제***. 3개의 비전매 특허의 지질, 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)-2000](PEG2K-DMG), 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 및 콜레스테롤은 cGMP 표준으로 제조될 수 있다.

[0684] ***LNPF9 최종 제형***. 교차-유동 혼합 공정은 LNP에서 sgRNA 및 Cas9 mRNA를 캡슐화한다. 동결건조된 sgRNA는 주입(WFI)을 위해 주사용 물에서 재구성되고, Cas9 mRNA 용액은 해동된다. sgRNA 및 mRNA를 혼합한다. 제어된 혼합 공정은 특정 중량 기반의 양의 sgRNA 및 Cas9 mRNA를 함유하는 수성 완충 용액을 특정 몰비로 4개의 지질 성분을 함유하는 에탄올 용액으로 블렌딩하였다. 혼합 후에, WFI 또는 완충제를 사용한 인라인(inline) 희석이 존재한다. 후속 하류 가공은 최종 농도 및 완충제 교환을 위한 한외여과 및 정용여과를 수반한다. 이어서, 다중 멸균 필터를 사용하여 제형을 멸균 여과하고 바이알에 충전한다. 최종 생성물은 sgRNA 및 Cas9 mRNA를 함유하는 냉동 LNP 현탁액이다.

[0685] ***DNA 템플릿 설계 및 선택***

[0686] rAAV8 벡터에 의해 전달된 *F9* DNA 템플릿은 면역원성을 최소화하면서 강한 표적-내 FIX 발현을 지원하기 위해 야생형 FIX 단백질을 인코딩하는 양방향 카세트로서 설계되었다. 그러나, 일방향 카세트 또한 사용될 수 있다. *F9* DNA 주형은 프로모터가 없는 주형이므로, 발현을 위해 표적 *ALB* 유전자좌 프로모터에 의존한다.

[0687] 카세트에 플랭킹된 AAV 역위 말단 반복(ITR)은 AAV2로부터 유래되었다. 부분 야생형 F9 코딩 서열(CDS)은 DNA 템플릿 내의 센스 및 안티센스 배향 모두에서 인코딩된다. 이들 *F9* 이식유전자는 자연 FIX 신호 펩티드가 결여되어 있고, 대신 *ALB* 엑손 1 신호 펩티드에 의존하지만 *F9* 이식유전자는 부분 FIX 프로펩티드 서열을 유지한다. 각각의 *F9*의 사본은 고유 코딩 시퀀스를 사용하고; 하나는 공통(consensus) 인간 CDS의 변형된 버전이고, 다른 하나는 코돈 최적화되었다. *F9*의 두 사본은 두 사본 사이의 분자 내 혼성화 및 플라스미드 또는 AAV DNA의 헤어핀 구조 형성을 제한하기 위해 가능한 한 서로 다른 순서로 설계되었다. 두 사본 모두는 CpG 디뉴클레오티드 모티프가 고갈되고, 적절한 경우 잠적 스플라이스 공여체 모티프가 제거되었다.

[0688] 각각의 *F9* 이식 유전자의 5' 단부에서의 스플라이스 수용체 서열은 마우스 *A1b* 엑손 2 스플라이스 수용체로부터

유래되었다. *F9* 이식 유전자의 3' 단부에 있는 폴리아데닐화 서열은 시미안 바이러스 40(SV40) 및 소 성장 호르몬(bGH)에서 유래되었다.

[0689] 개발 후보를 선택하기 위해, 변형된 *F9*의 하나 또는 두 사본 모두를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 있는 여러 버전의 양방향 삽입 카세트가 생성되었다. **표 13**은 시험된 *F9* 인서트의 상이한 버전을 열거하고, **표 14**는 시험된 상이한 양방향 삽입 카세트를 열거한다. 후보 삽입 템플릿은 시험관내, 1차 인간 간세포(PHH), 1차 시노몰구스 원숭이 간세포(PCH) 및 쥐의 생체내에서 비교되었고, FIX 단백질 발현 및 가변성에 대해 평가되었다. 리드 AAV 템플릿은 여러 플랫폼(1차 인간 및 비인간 영장류 간세포, *ALB* 인간화 마우스, 및 비인간 영장류), 잠적 스플라이싱 사건의 감소, 최소 CpG 함량, 및 제조 가능성(포장 수용력/수율, 빈/가득찬 비율)에 걸쳐 강력한 hFIX 발현 수준을 지원하는 것을 기반으로 선택되었다. **표 13**의 "스플라이스가 제거되지 않은 자연 CpG"는 18개의 CpG 디뉴클레오티드가 제거되고 3개의 잠적 스플라이스 공여체 부위가 제거된(하나의 새로운 CpG 디뉴클레오티드 모티프를 도입하는 것은 피할 수 없음) 자연 *F9* 서열을 나타낸다. **표 13**의 "코돈 최적화된" *F9* 인서트 및 인서트 72에 사용된 것은 74개의 CpG를 가지고, 인서트 72에 사용된 "자연" *F9* 인서트는 18개의 CpG를 가진다. **표 14**의 인서트 27, 인서트 28, 인서트 29, 및 인서트 30은 모두 ITR 내에 단일 CpG만을 함유한다.

[0690] [표 13]

삽입 카세트용 *F9* 인서트.

***F9* 인서트**	**서열번호**
자연 *F9* 인서트	158
스플라이스 F9 인서트가 제거되지 않은 자연 CpG	159
F9 인서트가 제거된 자연 CpG	160
F9 인서트가 제거된 자연 스플라이스	161
코돈 최적화된 *F9* 인서트	162
COMP *F9* 인서트	163
DC *F9* 인서트	164
GA *F9* 인서트	165
CpG0 *F9* 인서트	166
CpG3 *F9* 인서트	167
CpG *F9* 인서트가 없는 CpG10	168
CpG10 *F9* 인서트	169
CpG *F9* 인서트가 없는 CpG20	170
CpG20 *F9* 인서트	171

[0691]

[0692] [표 14]

양방향 삽입 카세트.

구조체	***F9* #1**	***F9* #2**	**서열번호 (ITR 있음; ITR 없음)**
72	자연	코돈 최적화	172; 202
18	자연	COMP	173; 203
19	자연	DC	174; 204
20	자연	GA	175; 205
21	자연	CpG0	176; 206
27	스플라이스가 제거되지 않은 자연 CpG	COMP	177; 207
28	스플라이스가 제거되지 않은 자연 CpG	DC	178; 208
29	스플라이스가 제거되지 않은 자연 CpG	GA	179; 209
30	스플라이스가 제거되지 않은 자연 CpG	CpG0	180; 210
36	스플라이스가 제거되지 않은 자연 CpG	코돈 최적화	181; 211
37	자연 CpG 제거됨	코돈 최적화	182; 212
38	자연	코돈 최적화	183; 213
39	자연 스플라이스 제거됨	코돈 최적화	184; 214
22	자연	CpG3	185; 215
23	자연	CpG 없는 CpG10	186; 216
24	자연	CpG10	187; 217
25	자연	CpG 없는 CpG20	188; 218
26	자연	CpG20	189; 219
31	스플라이스가 제거되지 않은 자연 CpG	CpG3	190; 220
32	스플라이스가 제거되지 않은 자연 CpG	CpG 없는 CpG10	191; 221
33	스플라이스가 제거되지 않은 자연 CpG	CpG10	192; 222
34	스플라이스가 제거되지 않은 자연 CpG	CpG 없는 CpG20	193; 223
35	스플라이스가 제거되지 않은 자연 CpG	CpG20	194; 224

[0693]

[0694] 선택된 개발 후보는 인서트 30에 의해 인코딩되는 양방향 삽입 카세트이며, 이는 rAAV8 내로 포장될 때, 이로써 REGV131로 표시된다(**도 3**). REGV131은 1차 인간 및 비인간 영장류 간세포, *ALB* 인간화 마우스 및 비인간 영장류에 삽입을 통해 FIX 단백질 발현을 입증하였다. 다른 양방향 *F9* 삽입 카세트(예를 들어, 인서트 72)와 비교하여, 인서트 30은 hFIX 발현(수준, 활성, 낮은 변동성, 제조 가능성)을 유지하는 동시에 인간 환자의 템플릿 성능에 영향을 미칠 수 있는 잠재적인 부정적인 특징을 제거하여 야생형 마우스와 비인간 영장류에서 관찰되는 의도하지 않은 잠적 스플라이싱 이벤트를 최소화하고, AAV 바이러스 벡터의 CpG 부위에 강력한 TLR9 효능제가 될 수 있는 메틸화되지 않은 C를 함유하기 때문에 CpG를 고갈시킨다. 이를 입증하기 위해, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 인간 혈액으로부터 단리하였다. 플라스마시토이드 수지상 세포(pDC)를 농축하고 pBMC(웰당 1e4 pDC + 1e5 PBMC)와 결합했다. 세포를 AAV 또는 대조군 CpG-올리고데옥시뉴클레오티드(ODN)로 16시간 내지 18시간 동안 인큐베이션하였다. 상층액을 채집하고, IFNα ELISA를 수행하였다. CpG-고갈된 *F9* 서열(예: 인서트 29 및 인서트 30)은 CpG-고갈되지 않은 *F9* 서열과 비교하여 1차 인간 플라스마시토이드 DC-기반 분석에서 감소된 IFN-I 반응을 유도하였다(**도 9**).

[0695] ***REGV131(rAAV8 벡터) 설명 및 제조***

[0696] REGV131은 야생형 FIX 단백질을 인코딩하는 양방향 *F9* rAAV ssDNA 게놈 카세트로 구성되며, 복제-무능력한 rAAV8 캡시드로 포장된다. 야생형 FIX는 전임상 연구에서 강력한 발현에 기초하여 선택되었으며, 이는 과활성 변이체 FIX의 사용에 대한 필요성을 배제하였다. AAV8은 여러 모델 시스템에서 간을 표적화하는 능력, 유리한 제조 프로파일, 및 인간 임상 시험에서 간-영양 벡터로서의 이의 사용으로 인해 삽입 플랫폼에 대한 혈청형으로 선택되었다.

[0697] DNA 템플릿은 각각의 말단에서 AAV2 유래 ITR을 활용하고, 2개의 *F9* 코딩 서열(CDS)을 포함하고, 각각의 CDS는 스플라이스 수용체 및 폴리아데닐화(폴리A) 서열에 의해 플랭킹된다.

[0698] *F9* DNA 템플릿은 *ALB* sgRNA 표적 부위를 플랭킹하는 뉴클레오티드와 상동성을 갖지 않고, 상동성-독립적인 메커니즘을 통해 삽입된다. 따라서, 삽입 카세트는 양방향으로 설계되고, 두 개의 탠덤(tandem) 역(inverted) *F9* 이식유전자를 인코딩하여 삽입 배향 중 하나가 FIX 단백질 발현을 지원할 수 있다. 이들 *F9 이식유전자*는 자연 FIX 신호 펩티드가 결여되어 있는데, 이는 이들이*ALB* 분비를 위한 엑손 1 신호 펩티드에 의존하지만 세포내 단백질분해 처리를 위한 부분 FIX 프로펩티드 서열을 보유하기 때문이다.

[0699] 각각의 *F9*의 사본은 고유 코딩 시퀀스를 사용하고; 하나는 공통 인간 CDS의 변형된 버전이고 다른 하나는 코돈 최적화되었다. *F9*의 두 사본은 두 사본 사이의 분자 내 혼성화 및 플라스미드 또는 AAV DNA의 헤어핀 구조 형성을 제한하기 위해 가능한 한 서로 다른 순서로 설계되었다. 두 사본 모두 이식유전자 발현-제한 면역 반응을 최소화하기 위해 CpG 디뉴클레오티드 모티프가 고갈되고, 적절한 경우 잠적 스플라이스 공여체 모티프가 제거되었다.

[0700] 각각의 *F9* 이식 유전자의 5' 단부에서의 스플라이스 수용체 서열은 마우스 *A1b* 엑손 2 스플라이스 수용체로부터 유래하였다. F9 이식 유전자의 3' 단부에 있는 폴리아데닐화 서열은 시미안 바이러스 40(SV40) 및 소 성장 호르몬(bGH)에서 유래하였다.

[0701] REGV131 주사는 미리 결정된 강도에서 수성 완충 용액으로서 제형화된 선택된 DNA 템플릿을 함유하는 정제된 rAAV8 벡터의 멸균 주사가능한 생성물이다. 약물 물질(DS)은 HEK293 세포의 삼중 형질주입을 이용하여 제조된 후, 멸균 주사가능한 약물 생성물로 추가로 제조된다.

[0702] ***REGV131의 구조***. REGV131은 AAV 혈청형 8로부터 유래된 AAV-기반 벡터이다. REGV131 게놈은 각각의 단부에 역위 말단 반복(ITR)을 포함하는 단일 가닥 데옥시리보핵산(DNA)이다. ITR은 **도 3**에 나타낸 바와 같이, 2개의 상이한 코돈-최적화된, CpG-최소화된, 야생형 FIX 단백질의 양방향의 코딩 DNA(cDNA) 서열, 프로모터가 없는 삽입 템플릿을 플랭킹한다. REGV131은 DNA 양방향 템플릿을 표적화된 세포로 전달할 비복제 벡터이다.

[0703] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 양방향 템플릿은 CRISPR/Cas9(LNP9) 표적 부위에서 상동성-독립적인 DNA 수선 후 *ALB* 인트론 1 내에서 표적 세포 유전체에 통합된다. 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 이러한 통합은 FIX 프로펩티드 및 알부민 엑손 1로부터의 잔류 아미노산, 즉 신호 서열 및 8개의 아미노산으로 이루어진 융합 단백질의 안정한 발현을 초래한다. 단백질분해 절단은 분비 동안 일어나고, 야생형 FIX 성숙 단백질이 혈장 또는 세포외 구획 내로 방출되게 한다.

[0704] **도 4**에 도시된, 양방향 템플릿 플라스미드는 상보성을 최소화하기 위해 각각 CpG를 최소화하고 코돈-최적화된

F9 유전자에 대한 2개의 코딩 서열을 함유한다. 이러한 설계는 템플릿이 삽입 방향에 관계없이 기능적 FIX 발현으로 이어질 것을 보장한다. 구조체의 중간에 있는 각각의 *F9* 유전자의 정지 코돈 뒤에 배치되는 것은 두 개의 폴리A 서열 중 하나이다. 하나는 원래 소 성장 호르몬 유전자(bGH 폴리A)에서 유래한 것이고, 다른 하나는 시미안 바이러스 40 폴리A(SV40 폴리A)에서 유래한 서열에서 유래한 것으로, 둘 다 일반적으로 여러 포유동물 숙주를 위해 설계되고 효율적인 폴리A 신호로 알려진 이식유전자 구조체에 사용된다. 구조체에서 각각의 *F9* 유전자는 프로모터가 없고, 대신 3' 스플라이스 수용체 부위가 인코딩되어 자연 *ALB* 유전자좌로부터 전사 후 알부민 신호 서열이 이식유전자 생성물에 융합될 수 있다.

[0705] AAV 바이러스 게놈(vg)을 인코딩하는 플라스미드 서열은 박테리아 복제 기원(ori)을 포함하는 플라스미드 백본 및 *카나마이신 내성* 유전자(KanR)를 인코딩하는 박테리아 발현 카세트에 삽입되었다.

[0706] rep/cap 플라스미드 Rep2/Cap8은 AAV 및 이의 의도된 F9 이식유전자의 적절한 조립을 가능하게 하기 위해 양방향 템플릿 플라스미드와 함께 세포 내로 공동-형질주입되는 바이러스 단백질을 인코딩하는 2개의 플라스미드 중 하나이다. 복제/캡 플라스미드는 야생형 AAV 게놈의 두 가지 주요 구성 요소를 인코딩한다: 단백질 캡시드의 조립에 필요한 *rep* 유전자 및 *cap* 유전자, AAV 이식유전자 게놈을 인코딩하는 DNA를 단일 가닥 DNA(ssDNA)로 처리하고, ssDNA 바이러스 게놈을 캡시드로 포장함. 플라스미드는 AAV2의 *rep* 유전자와 AAV8의 *cap* 유전자를 이용한 키메라 서열을 포함한다. *cap* 유전자만 단백질 캡시드의 단백질을 암호화하기 때문에, AAV8 혈청형을 갖는 재조합 AAV를 만들기에 충분하다. *rep* 전사체는 야생형 AAVP5 프로모터의 절단된 버전의 제어 하에 있는 반면, *cap* 전사체는 전사 및 번역을 유도하기 위해 추가 아데노바이러스 단백질이 필요한 AAV p40 프로모터의 제어 하에 있다. P5-rep/cap 시스템은 박테리아 기원 및 KanR을 포함하는 표준 플라스미드 백본으로 합성되었다.

[0707] 플라스미드 pAd-헬퍼-Kan은 AAV 생산자 세포가 AAV rep/cap 플라스미드로부터 Rep 및 Cap 단백질을 성공적으로 발현하기 위해 필요한 아데노바이러스 단백질을 인코딩하는 헬퍼 플라스미드이다. 아데노바이러스 단백질은 전달 플라스미드로부터 AAV 이식유전자의 필요한 DNA 복제 및 포장을 유도하고, AAV 생성을 유도하는 데 필요한 추가 기능을 수행한다. pAd-헬퍼-Kan에 인코딩된 일련의 아데노바이러스 개방형 리딩 프레임(ORF) 및 RNA는 AAV 생산을 위한 헬퍼 작용제로서 전장 아데노바이러스 유전체 또는 감염성 아데노바이러스의 사용을 필요로 하지 않고 이 작업을 추진하기에 충분하다.

[0708] REGV131은 상업용 HEK293 세포주 CTS 바이러스 생산 세포(Cat#A3152801, Thermo Fisher Scientific)의 삼중 형질주입에 의해 제조될 수 있다.

[0709] REGV131은 예를 들어, pH 7.3에서 10mM의 인산나트륨, 180mM의 염화나트륨 및 0.005%의 폴록사머 188 중 제형화될 수 있다.

[0710] ***B형 혈우병의 치료를 위한 REGV131-LNPF9***

[0711] REGV131 및 LNPF9는 정맥내 주입에 의해 전신으로 투여되도록 계획된다. 간세포에 진입할 때, REGV131은 *F9* DNA 템플릿을 핵으로 전달하고, LNP9는 두 개의 RNA 분자를 세포질로 전달한다. 번역되면, Cas9 단백질은 sgRNA 9860과 복합체를 형성하여 리보핵단백질(RNP) 복합체를 형성하고, 이는 핵으로 이동하여 *ALB* 유전자좌의 인트론 1의 sgRNA 9860 표적 부위에서 숙주 dsDNA를 절단할 수 있다. *F9* DNA 템플릿은 후속적으로 NHEJ에 의해 DSB 부위에 삽입될 수 있다.

[0712] *ALB* 인트론 1에 *F9* DNA 템플릿을 삽입한 후, 내인성 *ALB* 프로모터로부터의 mRNA 전사는 *ALB* 엑손 1을 통해 진행되어 폴리A 서열에 도달할 때까지 *F9* DNA 템플릿으로 계속되어, 전사의 종료를 신호한다. *ALB* 엑손 1 스플라이스 공여체와 *F9* 삽입 템플릿에 인코딩된 스플라이스 수용체 사이의 스플라이스 후, 생성된 mRNA는 *ALB* 엑손 1과 *F9* 코딩 서열 사이의 융합 전사체이다. 번역 동안, 엑손 1에 인코딩된 ALB 신호 펩티드는 폴리펩티드가 분비 경로로 진입하는 것을 매개하고,분비 동안 단백질분해적으로 제거된다. FIX 폴리펩티드를 세포내에서 추가로 가공하여 FIX 프로펩티드를 제거하고, 따라서 성숙 및 기능적 야생형 FIX 단백질을 산출하고, 이어서 이를 순환으로 분비하고 혈장에서 검출한다.

[0713] 요약하면, LNPF9에 의해 전달되는 매우 정확하고 표적화된 CRISPR/Cas9 기술과 선택된 rAAV8 벡터(REGV131)에 의해 전달되는 *F9* DNA 템플릿의 조합은 간세포로부터 야생형 FIX 단백질의 발현을 허용하여 잠재적으로 B형 혈우병 환자에게 평생 동안 효과적인 치료법을 제공할 것으로 기대된다.

[0714] ***실시예 2. 시험관내 검증***

[0715] ***1차 인간 간세포에서의 FIX 단백질 발현 수준***

[0716] rAAV8-전달된 DNA 템플릿의 표적 삽입이 리드 LNP 후보와 결합된 리드 rAAV 후보가 있는 인간 간세포에서 발생할 수 있음을 확인하기 위해, *ALB* 유전자좌에서 야생형 FIX 단백질의 발현을 1차 인간 간세포(PHH)에서 시험관 내에서 평가했다.

[0717] PHH는 *ALB* 인트론 1로의 템플릿 삽입을 표적화하기 위해 LNPF9 유무에 관계없이 인서트 30에 의해 인코딩된 *F9* DNA 템플릿 또는 두 개의 다른 후보 삽입 템플릿(인서트 72 및 인서트 29)으로 포장된 rAAV8로 처리되었다. 도 2를 참조한다. hFIX(Abcam #ab188393)에 대한 ELISA 검정을 사용하여 8일 후에 FIX 단백질 농도를 측정하였다.

[0718] 처리되지 않은 세포는 낮은 수준의 내인성 hFIX를 발현하였고, rAAV8-포장된 세포로 형질도입된 세포 *F9* DNA 템플릿 단독은 유사한 hFIX의 낮은 내인성 수준을 발현하였다. 대조적으로,rAAV8-전달된 *F9* DNA 삽입 템플릿 및 인간 *ALB* 인트론 1(예를 들어, g9857, g9874 및 g9844)을 표적화하는 다른 sgRNA를 포함하는 LNPF9 또는 LNP로 처리된 세포는 LNP 용량-의존적 방식으로 hFIX를 분비하였다(**도 5**).

[0719] 결론적으로, PHH의 *ALB* 유전자좌에 *F9* DNA 템플릿의 표적 삽입은 시험관내 FIX 단백질 발현을 초래하였다. 인서트 30에서 생성된 *F9* DNA 주형은 LNP9와 함께 PHH에서 헤드 대 헤드로 시험했을 때 다른 DNA 템플릿보다 더 높은 수준의 hFIX를 지원했다.

[0720] ***1차 비인간 영장류 간세포에서의 FIX 단백질 발현 수준***

[0721] rAAV8-전달된 DNA 템플릿의 표적 삽입이 리드 LNP 후보와 함께 리드 rAAV8 후보가 있는 비인간 영장류 간세포에서 발생할 수 있음을 확인하기 위해, *ALB* 유전자좌에서 야생형 FIX 단백질의 발현을 1차 시노몰구스 원숭이 간세포(PCH)에서 시험관 내에서 평가했다.

[0722] PCH는 *ALB* 인트론 1로의 템플릿 삽입을 표적화하기 위해 LNPF9 유무에 관계없이 인서트 30에 의해 인코딩된 AAV 템플릿 또는 두 개의 다른 후보 삽입 템플릿(인서트 72 및 인서트 29)으로 포장된 rAAV8로 처리되었다. hFIX(Abcam #ab188393)에 대한 ELISA 검정을 사용하여 8일 후에 FIX 단백질 농도를 측정하였다.

[0723] 미처리된 채 남은 PCH 및 rAAV8-포장된 세포로 형질도입된 세포 *F9* DNA 템플릿 단독에서, 낮은 수준의 배경 hFIX 신호를 측정하였다. 대조적으로,rAAV8-전달된 *F9* DNA 삽입 템플릿 및 인간 *ALB* 인트론 1(예를 들어, g9857, g9874 및 g9844)을 표적화하는 다른 sgRNA를 포함하는 LNPF9 또는 LNP로 처리된 세포는 LNP 용량-의존적 방식으로 hFIX를 분비하였다(**도 6**).

[0724] 결론적으로, PCH의 *ALB* 유전자좌에 *F9* DNA 템플릿의 표적 삽입은 시험관내 FIX 단백질 발현을 초래하였다. 이러한 결과는 인간이 아닌 영장류에서 유래한 간세포가 LNP9 및 rAAV8-포장된 *F9* DNA 템플릿 인서트 30(REGV131)을 사용한 삽입을 통해 hFIX의 발현을 지원할 수 있음을 보여주며, 나아가 이러한 후보를 사용한 번역 연구에 적합한 대형 동물 모델로서 비인간 영장류의 선택을 지원할 수 있음을 보여준다.

[0725] **실시예 3. 생체내 B형 혈우병의 마우스 질환 모델에서의 인간 FIX 단백질 발현 및 활성**

[0726] LNPF9(g9860) 및 REGV131(인서트 30)은 FIX의 결핍 또는 기능 장애를 가진 B형 혈우병 환자와 유사하게 인간화된 *ALB* 유전자좌를 보유하고 *F9* 유전자 결핍에 기인한 FIX 활성이 결여된 유전자 조작 마우스에서 인간 야생형 FIX 단백질(hFIX) 발현 및 활성 수준에 대한 용량 매트릭스 연구에서 평가되었다.

[0727] $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스에 LNPF9(0.3, 1.0 또는 3.0mg/kg) 및/또는 REGV131(3.0E10 또는 1.5E11vg/마우스)을 정맥내 투여하였다. LNPF9 또는 REGV131 단독으로 처리된 그룹은 모니터링 4주 동안 혈장에서 hFIX를 발현하지 않았다. 그러나, LNPF9와 REGV131의 조합으로 처리된 동물은 용량-의존적으로 혈장 hFIX를 발현하였다(**도 7**).

[0728] LNPF9와 REGV131의 조합으로 처리된 $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스의 혈장은 hFIX 활성을 나타내는 hFIX를 발현했다(**도 8a**). 처리 후 4주차에 마우스로부터 혈장을 분리하고 hFIX에 특이성이 있는 포획 항체(AHIX-5041; Haematologic Technologies)를 사용하여 마우스에서 생성된 hFIX를 풀다운(pull-down)한 다음, 발색 검정(BioPhen FIX, Hypen BioMed)을 사용하여 상대적인 hFIX 활성을 측정하였다. hFIX 수준은 4주차의 hFIX 활성과 상관관계가 있었다(**도 8b**). 데이터는 수준 대 활성의 상관관계로서 개별 동물에 대해 표시된다.

[0729] 요약하면, 이 개념 입증 연구는 FIX 결핍이 있는 $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스가 인간화 *ALB* 유전자좌에 hF9 유전자의 CRISPR/Cas9 삽입 후 기능적 hFIX를 발현할 수 있음을 보여주었다.

[0730] 조합된 데이터는 인서트 30의 *F9* DNA 템플릿이 PHH(**도 5** 참조), PCH(**도 6** 참조), 및 시노몰구스 원숭이(**도 10a**

참조)의 생체내에서 1세대 템플릿(인서트 72)보다 더 높은 수준의 hFIX 발현을 생성했음을 보여주었다. 또한, 인서트 30 템플릿은 인서트 72에 비해 벡터에 대한 반응으로 IFNα 생성이 더 적었다(**도 9**).

[0731] **실시예 4. 생체내 비인간 영장류에서의 인간 FIX 단백질 발현 및 활성**

[0732] LNPF9(g9860) 및 REGV131(인서트 30)의 조합은 LNPF9 및 REGV013(인서트 72)의 조합과 비교하여, 암수 *시노몰구스* 원숭이(비인간 영장류(NHP))에서 인간 FIX(hFIX) 발현 및 활성의 효율성에 대해 평가되었다. g9860의 표적 부위는 *시노몰구스* 원숭이에서 보존되므로, 인서트 30은 원숭이 *ALB* 유전자좌에 삽입될 수 있다.

[0733] 원숭이에게 LNPF9(1.0 또는 3.0mg/kg) 및/또는 REGV131(1.5×10^{13}vg/kg) 또는 REGV013(1.5×10^{13}vg/kg)을 정맥내 투여하였다. 3.0mg/kg LNP만 처리한 대조군은 주사 후 4주 모니터링 기간 동안 혈장에서 hFIX를 발현하지 않았다. 그러나, LNPF9 및 REGV131의 조합으로 처리된 원숭이는 LNP-용량-의존적 방식으로 혈장 hFIX를 발현한다(**도 10a**). 인서트 30은 3.0mg/kg의 LNPF9와 함께 1.5×10^{13}vg/kg으로 투여했을 때 인서트 72보다 더 높은 FIX 수준을 생성하였다. 더 낮은 용량의 LNPF9(1.0mg/kg)와 함께 투여된 경우에도, 인서트 30은 더 높은 용량의 LNPF9(3.0mg/kg)와 함께 투여되었을 때 여전히 인서트 72만큼의 인간 FIX를 생성하였다. LNPF9(1.0 또는 3.0mg/kg) 및/또는 REGV131(1.5×10^{13}vg/kg)을 정맥내 투여한 일부 원숭이에서 혈장 내 hFIX 발현을 6개월 동안 평가하였다(**도 10c**). 처리는 비인간 영장류에서 전체 6개월 동안 용량-반응성 hFIX 발현을 초래하였다.

[0734] 원숭이 발현 hFIX 단백질은 생체외 FIX 활성 분석에서 hFIX 기능을 평가하기 위해 인간 FIX에 특이성이 있는 항체(AHIX-5041; Haematologic Technologies)를 사용하여 내인성 원숭이 FIX를 갖는 원숭이 혈장으로부터 단리되었다. LNPF9만 처리된 원숭이의 혈장에는 hFIX 단백질이 없었기 때문에 hFIX 활성이 나타나지 않았다. 그러나, LNPF9와 REGV131의 조합으로 처리한 원숭이의 혈장은 hFIX 단백질을 발현하고, hFIX 활성에 대한 hFIX 발현의 상관관계 분석에서 나타난 바와 같이 hFIX 활성에 대한 LNP-용량-의존적 반응을 보였다(**도 10b, 표 15**).

[0735] [표 15]

2 주차에 hFIX 활성에 대한 hFIX 발현의 상관관계.

LNP 및 바이러스 용량	상대 hF9% 활성	hF9 μg/mL
g9860 – 3 mpk PBS 수컷	0	N/D
g9860 – 3 mpk 인서트 72 – 1.5E13 수컷	213.2	6.65
	368.7	12.19
	224.4	6.63
g9860 – 3 mpk 인서트 30 – 1.5E13 수컷	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 인서트 30 – 1.5E13 암컷	533.7	21.77
	431.6	19.98
	307.4	13.13
g9860 – 1 mpk 인서트 30 – 1.5E13 수컷	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 인서트 30 – 1.5E13 암컷	218.3	9.59
	111.3	2.84
	210.4	10.60

[0736]

[0737] 요약하면, 이 개념 입증 연구는 *시노몰구스* 원숭이가 원숭이 ALB 유전자좌에 hF9 유전자를 CRISPR/Cas9 삽입한 후 기능적 hFIX를 발현할 수 있음을 보여주었다. 원숭이 연구에 사용된 동일한 LNP 및 AAV 성분이 간세포의 인간 ALB 유전자좌로의 삽입을 위해 *hF9* 유전자를 표적으로 하기 때문에 이러한 결과는 B형 혈우병 환자에게 고무적이다.

[0738] **실시예 5. 마우스에서 신생 삽입 후 영속적 인간 FIX 단백질 발현**

[0739] 성체 및 신생 마우스에서 에피솜-매개 발현 대 삽입-매개 발현을 비교하고 성체 및 신생 마우스의 다양한 DNA 수선 경로를 비교하기 위해 hFIX 에피솜(hAAT 프로모터에 의해 유도되는 발현), 양방향 hFIX NHEJ 삽입 템플릿, 500bp의 상동성 아암이 있는 hFIX HDR 삽입 템플릿 및 800bp의 상동성 아암이 있는 hFIX HDR 삽입 템플릿의 투여 후 hFIX 혈청 수준을 비교하였다. **도 11**을 참조한다. 신생 C57BL/6 마우스는 하기처럼 P0 또는 P1에 투여되었다: (1) 4mg/kg의 LNP-g666 및 3e9vg/마우스의 hFIX-HDR-500 템플릿을 갖는 rAAV8; (2) 4mg/kg의 LNP-g666 및 3e9vg/마우스의 hFIX-HDR-800 템플릿을 갖는 rAAV8; (3) 4mg/kg의 LNP-g666 및 3e9vg/마우스의 hFIX-NHEJ 템플릿을 갖는 rAAV8; 또는 (4) rAAV8 에피솜 템플릿의 3e9vg/마우스. 식염수가 주사된 마우스는 음성 대조군으로서 사용되었다. 에피솜 AAV의 hFIX 코딩 서열은 야생형 인간 *F9*를 인코딩하는 코돈-최적화된 서열이었다. 2개의 HDR 구조체에서 hFIX 코딩 서열은 파두아 돌연변이(R338L)를 갖는 자연 인간 *F9* 코딩 서열이었다. 혈액을 수집하고, 투여 후 1주차, 2주차 및 5주차에 혈장을 준비하였다. hFIX 수준을 인간 FIX ELISA에 의해 측정하였다. 이어서 실험은 성체 C57BL/6 마우스에 반복적으로 수행되었으며, 성체 마우스에는 하기처럼 투여되었다: (1) 0.8mg/kg의 LNP-g666 및 2e10vg/마우스의 hFIX-HDR-500 템플릿을 갖는 rAAV8; (2) 0.8mg/kg의 LNP-g666 및 2e10vg/마우스의 hFIX-HDR-800 템플릿을 갖는 rAAV8; (3) 0.8mg/kg의 LNP-g666 및 2e10vg/마우스의 hFIX-NHEJ 템플릿을 갖는 rAAV8; 또는 (4) rAAV8 에피솜 템플릿의 2e10vg/마우스. 식염수가 주사된 마우스는 음성 대조군으로서 사용되었다. 혈액을 수집하고, 투여 후 1주차, 2주차 및 4주차에 혈장을 준비하였다. 결과는 **도 2** 및 **표 12 내지 표 13**에 나타난다. 에피솜-매개 발현은 신생아에서 삽입-매개 발현과 비교하여 제1 시점에서도 낮았고, 신생아에서 시간이 지남에 따라 손실되었다. 성체 마우스에서 반대가 관찰되었다: 에피솜-매개 발현은 성체 마우스에서 삽입-매개 발현과 비교하여 제1 시점 및 후속 시점에서 더 높았다. 이러한 결과는 이전의 유사한 실험에서 관찰된 것을 확인하였다(데이터 미도시). 신생 마우스에서의 결과와 대조적으로, hFIX 수준은 에피솜 및 삽입 구조체 둘 모두를 갖는 성체 마우스에서 안정적으로 유지되었으며, 에피솜 구조체가 가장 높은 발현을 제공하였다. **도 12a 내지 도 12b** 및 **표 16 내지 표 18**을 참조한다.

[0740] [표 16]

신생 마우스에서 인간 FIX 혈청 수준(μg/mL).

	에피솜								
W1	0.9	0.56	0.48	0.52	0.96	0.67	0.93	0.98	0.77
W2	0.2	0.11	0.12	0.14	0.15	0.17	0.22	0.21	0.15
W5	0.06	0.03	0.03	0.07	0.07	0.03	0.04	0.04	0.04
	NHEJ								
W1	14.22	19.28	14.12	18.67	21.69				
W2	16.08	17.25	16.07	17.66	21.39				
W5	12.29	12.41	14.18	16.61	13.71				
	HDR500								
W1	11.03	8.02	7.86	10.11					
W2	8.29	6.74	8.63	8.61					
W5	6.27	4.09	5.24	5.49					

	HDR800								
W1	3.86	6.44	6.52	4.43		1.41	2	3.58	2.71	2.07
W2	3.54	6.9	7.46	4.44	4.64	1.65	2.45	3.55	2.83	2.5
W5	2.4	3.49	3.48	3.33	3.77	0.77	2.19	2.7	2.5	1.68

[0741]

[0742] [표 17]

성체 마우스에서 인간 FIX 혈청 수준(μg/mL).

	에피솜				
W1	16.69	15.57	18.97	14.17	9.82
W2	25.39	23.07	41.53	27.53	12.07
W4	39.97	26.61	39.63	28.5	14.28
	NHEJ				
W1	8.1	9.52	13.09	6.55	9.2
W2	9.15	8.12	8.18	6.46	7.27
W4	14.86	10.86	13.85	8.42	13
	HDR500				
W1	2.23	2.5	1.89	3.14	1.85
W2	1.2	2.62	1.55	2.41	1.34
W4	3.83	5.39	4.89	4.62	2.75

	HDR800				
W1	1.65	0.94	0.26	0.54	0.14
W2	0.69	1.52	0.24	0.67	0.46
W4	2.13	1.87	0.49	0.94	0.43

[0743]

[0744] [표 18]

신생 마우스에서 인간 FIX 혈청 수준(μg/mL).

마우스 #	군 #	1 주차 hF9 ug/mL	2 주차 hF9 μg/mL	5 주차 hF9 μg/mL	3 개월차 hF9 μg/mL	4 개월차 hF9 μg/mL	7 개월차 hF9 μg/mL	9 개월차 hF9 μg/mL	10 개월차 hF9 μg/mL	12 개월차 hF9 μg/mL	15 개월차 hF9 μg/mL
1	대조군 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	대조군 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	대조군 3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	대조군 4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	대조군 5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	대조군 6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	대조군 7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	대조군 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	에피솜 1	0.90	0.20	0.06	0.16	0.14	0.12	0.04	0.05	0.04	0.04
14	에피솜 2	0.56	0.11	0.03	0.09	0.09	0.08	0.03	0.03	0.04	0.06
15	에피솜 3	0.48	0.12	0.03	0.11	0.09	0.09	0.02	0.04	0.02	0.03
16	에피솜 4	0.52	0.14	0.07	0.14	0.11	0.09	0.03	0.02	0.02	0.05
17	에피솜 5	0.96	0.15	0.07	NA(마우스 사망)			NA(마우스 사망)			
18	에피솜 6	0.67	0.17	0.03	0.13	0.11	0.11	0.03	0.04	0.00	0.04
19	에피솜 7	0.93	0.22	0.04	0.13	0.09	0.09	0.09	0.05	0.04	0.03
20	에피솜 8	0.98	0.21	0.04	0.14	0.10	0.11	0.06	0.03	0.04	0.05
21	에피솜 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(마우스 사망)			NA(마우스 사망)			
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(마우스 사망)				NA(마우스 사망)			
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(마우스 사망)					NA(마우스 사망)			
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(마우스 사망)					NA(마우스 사망)			
40	NHEJ 8	21.69	21.39	13.71	11.15	11.88	12.72	12.36	18.53	11.19	18.07

[0745]

[0746] 이들 실험은 삽입된 *F9*의 발현이 신생아 간에서 영속성이 있음을 보여주었고, 이는 *알부민* 유전자좌에 *F9* 템플릿을 삽입하면 신생아 대상체에서 영속성 있는 발현을 초래할 수 있음을 나타낸다. 이들 게놈 통합은 신생 마우스에서 실험 전체에 걸쳐 유지된 영속성 발현을 제공하였다.

[0747] **실시예 6. 다양한 ITR 길이 플라스미드를 사용하여 제조된 rAAV8 바이러스**

[0748] *F9* DNA 템플릿의 1차 인간 간세포의 *ALB* 유전자좌로의 표적 삽입은 시험관내 FIX 단백질 발현에 대한 영향을 결정하기 위해 다양한 길이의 ITR 길이 플라스미드를 사용하여 생성된 재조합 AAV8 바이러스로 시험되었다. 구체적으로, 재조합 AAV8 바이러스를 145bp ITR(서열번호 196), 141bp ITR(서열번호 197), 또는 130bp ITR(서열번호 198)을 갖는 플라스미드를 사용하여 생성하였다. LNPF9는 상이한 ITR 길이(2.8E10vg/μL rAAV8-F9-145bp ITR, 3.24E10vg/μL rAAV8-F9-130bp ITR, 및 1.33E10vg/μL rAAV8-F9-141bp ITR)를 갖는 rAAV8-포장된 *F9* DNA 템플릿 인서트 30과 함께 1차 인간 간세포에 다양한 농도로 투여되었다 이어서, FIX 발현을 ELISA에 의해 7일차에 평가하였다. **도 13a 내지 도 13b**에 나타낸 것과 같이, 인간 간세포에서 유사하게 수행된 다양한 ITR 길이 플라스미드를 사용하여 생성된 rAAV8 바이러스는 유사한 수준의 FIX 발현을 생성하였다.

[0749] **실시예 7. CRISPR/Cas9-삽입된 인간 *F9* 유전자가 지혈을 복원함**

[0750] LNPF9(g9860)와 REGV131(인서트 30)의 조합은 FIX의 결핍 또는 기능 장애를 가진 B형 혈우병 환자와 유사하게, 인간화된 *ALB* 유전자좌를 보유하고 *F9* 유전자 결핍에 기인한 FIX 활성이 결여된 유전자 조작 마우스에서 꼬리 출혈 공격 후 지혈을 복원할 수 있는(즉, 출혈 억제) 인간 FIX(hFIX)의 발현 및 분비에 대해 평가되었다.

[0751] *ALB*$^{hu/hu}$ / *F9*$^{-/-}$ 마우스에 표 19에 나타난 바와 같이 LNPF9(0.3 또는 1.0mg/kg) 및/또는 REGV131(1.5E13 또는 1.5E12vg/kg)을 정맥내 0.3 투여하였다.

[0752] [표 19]

치료군.

군	치료	AAV(vg/kg)	LNP(mpk)	"n" size
A	야생형(*ALB*$^{hu/hu}$/*F9*$^{+/+}$)	-	-	5
B	미처리(*ALB*$^{hu/hu}$/*F9*$^{-/-}$)	-	-	5
C	LNP1265 단독	-	1	5
D	AAV 단독(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

[0753]

[0754] 처리 후 1주차, 2주차, 4주차 및 6주차에 마우스로부터 혈장을 분리하고 hFIX에 특이성이 있는 포획 항체(AHIX-5041; Haematologic Technologies)를 사용하여 마우스에서 생성된 hFIX를 풀다운하고, 및 발색 검정(BioPhen FIX, Hypen BioMed)을 사용하여 상대 hFIX 활성을 측정하였다. MESO Scale Discovery(MSD)를 사용하여 인간 FIX 발현을 평가하였다. 비오틴화된 포획 항체는 스톡(Capture Mab HFIX R044 Biotin, 1000 μg/mL)으로부터 분석 희석제(0.5% BSA-PBS) 중 포획 항체 1 μg/mL를 만듦으로써 제조되었고, 검출 항체는 스톡(MSD에 의해 접합된 Detection Mab AHIX-5041 Sulfo-tag, 1000 μg/mL)으로부터 분석 희석제(0.5% BSA) 중 검출 항체 1 μg/mL를 만듦으로써 제조되었다. 표준을 제조하고, 샘플을 분석 희석제에서 1:500 및 1:1000 희석으로 제조하였다. 150 μL/웰의 차단 용액을 MSD GOLD 플레이트에 첨가하여 차단이 수행되었고, 플레이트를 밀봉하고 실온에서 진탕(~700rpm)으로 1시간 동안 인큐베이션하였다. 트래시에서 플레이트를 플리킹(flicking)함으로써 차단액을 탭핑(tapping)함으로써 코팅을 수행하였다. 비오틴화된 포획 항체를 첨가하였다(분석 희석제에서 25 μL/웰의 1 μg/mL 비오티닐화된 포획 항체). 플레이트를 밀봉하고 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 플레이트 세척기에서 세척하였다(350 μL PBST × 4). 교정 표준(50 μL) 및 희석된 샘플을 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 2시간 동안 진탕하며(~700rpm) 또는 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 검출을 위해, 플레이트를 플레이트 세척기(350 μL PBST × 4)로 세척하고, SULFO-TAG 검출 항체를 첨가한 후(분석 희석제 중 SULFO-TAG 검출 항체 25 μL/웰의 1 μg/mL) 플레이트를 밀봉하고 실온에서 1시간 동안 진탕(~700rpm)하면서 인큐베이션하였다. 플레이트를 플레이트 세척기로 세척하고 Read 용액(150 μL/웰의 2x MSD Read 용액)을 첨가한 후, 플레이트를 MESO SECTOR S 600MM(Methodical Mind 소프트웨어 포함)에서 즉시 판독하였다.

[0755] 마우스 혈장으로부터 hFIX의 면역-침전 후에 BIOPHEN 인자 IX 키트를 사용하여 인간 FIX 활성을 평가하였다. 혈장으로부터 hFIX의 면역침전을 위한 준비를 위해, ELISA 플레이트를 1 μg/mL에서 PBS에 mAb를 희석한 다음, 100 μL 희석된 mAb를 100ng/100 μL/웰의 High-Bound 검정 플레이트에 첨가하여 100ng의 Anti-Hu FIX 항체(HTI-AHIX-5041의 단일 클론 항체)로 코팅하였다. 플레이트를 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 코팅 mAb 용액을 폐기하였다. 이어서, 플레이트 상에 150 μL/웰을 첨가하여 실온에서 2시간 동안 인큐베이션함으로써, 코팅된 플레이트를 3% BSA/PBS로 차단하였다. 이어서, 플레이트를 세척하였다(4× 400 μL PBS Wash Buffer). 연구 샘플 및 표준/교정기의 준비를 위해, 연구 혈장 샘플을 키트로부터의 R4 완충액에 희석하였다. 키트의 프로토콜에 따라 100% 내지 0%의 표준 범위를 사용하여 키트로부터 교정기 혈장을 생성하였다. (예를 들어, George King Bio-Medical로부터 구매된 인간 정상 풀링된 혈장은, 분석에서 100% hFIX 활성으로서 R4 완충액으로 희석된 100x이다). 표준 교정기(정제된 hFIX) 및 샘플을 R4 완충액(Std 1 = 100ng/mL 시작부터 3x 연속 희석으로 R4 완충액에 희석된 ERL 정제된 혈장 hFIX 단백질을 사용하여 생성된 표준 곡선)에 희석한 다음 100 μL/웰로 플레이트에 첨가하고 실온에서 2시간 동안(또는 4℃에서 밤새) 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 PBST로 3x 세척하였다. 활성을 트리거하고 정량화하기 위해, 모든 내용물을 폐기하고, 50 μL의 R4를 모든 시험 웰에 첨가하였다. 이어서, 키트 프로토콜에 기재된 바와 같이 다음처럼 활성 검정을 실행하였다: 50 μL R1 완충액(37℃로 예열됨)을 첨가하고, 37℃에서 4분 동안 인큐베이션함; 50 μL R2 완충액(37℃에서 예열됨)을 첨가하고, 37℃에서 8분 동안 인큐베이션함; 50 μL R3 완충액(37℃에서 예열됨)을 첨가하고, 37℃에서 5분 동안 인큐베이션함; 그리고 50 μL의 20% 아세트산(정지 용액)을 첨가하고, SoftMax 7.2에 의해 분자 디바이스(Molecular Device) 마이크로플레이트 판독기에서 405nm에서 흡광도를 판독함.

[0756] **도 14a** 및 **도 14c**는 1주차, 2주차, 4주차 및 6주차의 혈장 내 hFIX 발현 수준을 나타내고, **도 14b**는 6주차의 혈장 내 hFIX 발현 수준을 나타내고, **도 15a**는 1주차, 2주차, 4주차 및 6주차의 혈장 내 hFIX 활성을 나타내고,

도 15b는 6주차의 혈장 내 hFIX 활성을 나타낸다. **도 15c**는 혈장 내 hFIX 발현 수준과 hFIX 활성의 상관관계를 나타낸다. **도 14a 내지 도 15c**에 나타낸 바와 같이, REGV131-LNP9 처리는 시험된 6주 동안 $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스에서 용량-반응성 hFIX 발현 및 활성을 초래하였다. 삽입 템플릿의 삽입 수준(인서트 30) 및 hFIX의 mRNA 수준은 유사한 용량 반응을 보였다(데이터 미도시).

[0757] 꼬리 절단 후 출혈 시간은 생체 내 지혈을 평가하기 위해 4주에 측정되었다. 온도 제어식 37℃ 미니 인큐베이터를 아이소플루란 마취를 위해 준비된 노즈 콘(nose cone)으로 준비하였다. 각각의 마우스에 대해, 리도카인 하이드로클로라이드(2%)를 통증을 위해 꼬리 끝에 적용하였다. 마우스는 2% 아이소플루란 및 1.5L/min 비율의 100% 산소와 함께 가열된 37℃ 아이소플루란 챔버에 5분 동안 배치되었다. 쥐가 의식을 잃으면(~5분), 체온을 유지하기 위해 가열된 패드 위에 쥐를 놓고, 코(nosepiece)를 통해 마취를 유지하였다. 부프레노르핀-SR/ER(1mg/mL)을 진통제로 1mg/kg 피하 투여하였다. 포비돈 거즈를 사용하여 꼬리 끝을 닦고, 이어서 알코올 패드를 닦았다; 이를 각각 새로운 포비돈 및 알코올 패드를 사용하여 2회 더 반복하였다. 자 또는 캘리퍼를 사용하여 끝에서부터 2mm에서 그리고/또는 1mm 직경을 측정하고, 멸균 메스 칼날을 사용하여 꼬리를 절단하였다. 마우스를 즉시 온도 조절식(37℃) 미니 인큐베이터에 옮기고, 마우스의 코를 아이소플루란 노즈콘에 넣고, 꼬리 끝을 5mL 식염수(꼬리 끝으로부터 1cm 깊이)에 넣었다. 혈류를 제1 지혈까지 시간에 대해 밀접하게 모니터링하였다. 제1 지혈까지의 시간은 꼬리를 절단한 후 1분간 재출혈 없이 출혈하는 시간을 지칭한다. 총 출혈 시간은 꼬리 절단 후 10분 동안 초기 출혈 시간과 추가 재출혈 시간의 합을 의미한다. 혈류는 재출혈에 대해 10분까지 지속적으로 모니터링되었으며, 모든 재출혈 시간이 기록되었다. 10분 후에, 마우스를 미니 인큐베이터로부터 꺼내고, 꼬리 끝을 멸균 게이지 패드로 가압하여 출혈이 완전히 정지되도록 하였다. 필요한 경우, 클로티솔(혈액 응고 현탁액)을 꼬리 절단 부위에 적용하였다. 식염수(0.5mL의 0.9% 식염수)를 피하 주사하고, 동물을 다시 그의 케이지에 넣고, 마취로부터 완전히 회복될 때까지 모니터링하였다. 각각의 군에 대한 총 출혈 시간은 **도 16**에 나타나 있다. **도 16**에 나타낸 바와 같이, REGV131-LNPF9 처리는 4주차에서 지혈 용량의 구제를 초래하였다.

[0758] 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT)을 6주차에 희석되지 않은 혈장에서 평가하였다. **도 17**에 나타낸 바와 같이, $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스에서 REGV131-LNPF9 처리는 aPTT를 $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{+/+}$ 마우스에서 관찰된 값으로 정규화하였다.

[0759] 이어서, 인간 FIX 활성을 엘라그산(ellagic acid) 또는 신스아실에 의한 임상 1단계 응고/aPTT 검정을 사용하여 평가하였다. $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스 혈장에 스파이크된 정제된 인간 FIX 단백질(ERL HFIX 1009으로부터, Lot4940)의 동일한 제조에서 얻은 표준/교정기 혈장을 KO 마우스 혈장에서 인간 FIX의 1.25IU/mL 내지 0IU/mL의 표준 곡선을 제조하는 데 사용하였다. 대조군 혈장 샘플은 삽입 연구에서 선택된 마우스 혈장 샘플과 동일한 농도의 $F9^{-/-}$ 마우스 혈장 내 hFIX 단백질을 매칭하여 생성되었다. 연구 표준/교정기 및 대조군 샘플의 준비 후, 모든 연구 혈장 샘플은 인간 FIX 결핍 혈장으로 10x 희석되었다(*PrecisionBioLogic*에서 구입, Cat#FDP09-15). 이어서, 큐벳-스트립 내의 각각의 큐벳에 볼을 분배하였다. 큐벳 스트립은 37℃에서 예열 기계를 위해 Start4 지혈 분석기(Diagnostica Stago, Manual Ref 0931079A)의 인큐베이션 영역에 배치되었다. 희석된 혈장 샘플을 Start4 지혈 분석기의 큐벳 상에 첨가하고(중복에서 50μL/큐벳), 시험 큐벳을 37℃에서 3분 동안 인큐베이션하였다 엘라그산(APTT-XL Thermo Scientific, Cat#95059-804) 또는 신스아실(HemosIL, APTT Lyophilized silica - 0008468710)을 첨가하고(50μL/큐벳), 37℃에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 시험-컬럼 상에서, 피펫 제어 키를 활성화되고(볼은 큐벳에서 앞뒤로 이동하기 시작함), 예열된 50μL의 0.025M $CaCl_2$를 각각의 큐벳에 분배하였다. 혈전이 형성될 때, 볼은 움직임을 중단하고, 응고 시간이 기록된다. 데이터 분석은 표준 곡선으로부터 보간된 데이터를 얻기 위해 비선형 최상의 곡선 피팅을 사용하는, GraphPad Prism 8 소프트웨어에 의한 것이다. **도18**에 나타낸 바와 같이, 마우스-생성 인간 FIX는 1단계 응고/aPTT 검정에서 정제된 인간 FIX와 유사한 특이적 활성을 나타냈다.

[0760] 이어서, 인간 FIX 활성을 Aniara Diagnostica에 의해 임상 2단계 발색원성 기질 검정 키트를 사용하여 평가하였다. $ALB^{hu/hu}$ / $F9^{-/-}$ 마우스 혈장에 스파이크된 정제된 인간 FIX 단백질(ERL HFIX 1009으로부터, Lot4940)의 동일한 제조에서 얻은 표준/교정기 혈장을 KO 마우스 혈장에서 인간 FIX의 1.25IU/mL 내지 0IU/mL의 표준 곡선을 제조하는 데 사용하였다. 대조군 혈장 샘플은 삽입 연구에서 선택된 마우스 혈장 샘플과 동일한 농도의 $F9^{-/-}$ 마우스 혈장 내 hFIX 단백질을 매칭하여 생성되었다. 연구 표준/교정기 및 대조군 샘플의 제조 후, 모든 연구 혈장 샘플은 R4 완충액으로 희석된 채로 100x 희석되었고, 25μL/웰을 96 웰 검정 플레이트에 이중으로 첨가하

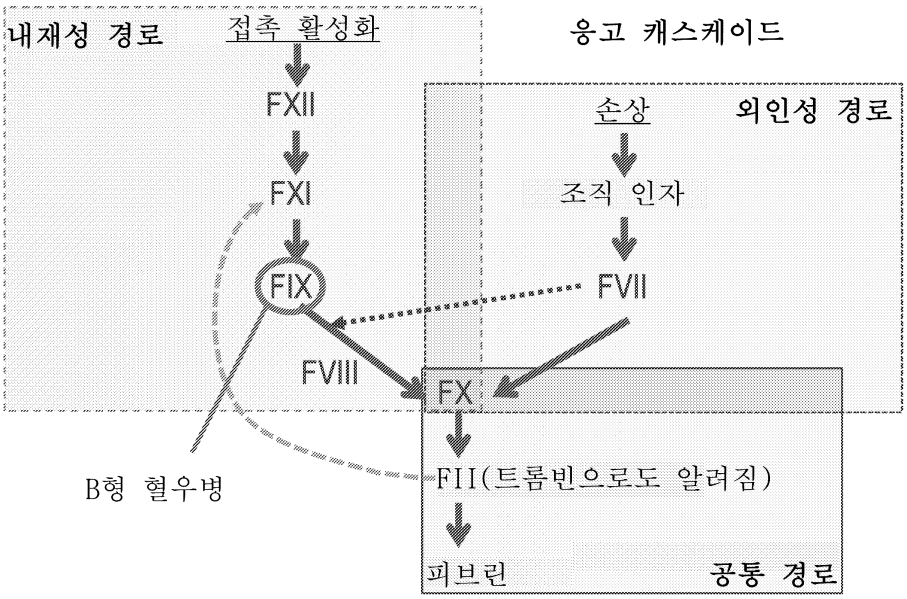
였다. 다음으로, 25μL/웰 R1 시약을 검정 플레이트에 첨가하고 37℃에서 5분 동안 인큐베이션하고, 25μL/웰 R2 시약(37℃에서 예열됨)를 첨가하고 플레이트를 37℃에서 8분 동안 인큐베이션하고, 25μL/웰 R3 시약을 첨가하고 검정 플레이트를 37℃에서 3분 내지 5분 동안 인큐베이션하고, 그리고 25μL/웰의 20% 아세트산(정지 용액)을 첨가하고, SoftMax 7.2에 의해 분자 디바이스 마이크로플레이트 판독기에서 405nm에서 흡광도를 판독하였다. 데이터 분석은 표준 곡선으로부터 보간된 데이터를 얻기 위해 비선형 최상의 곡선 피팅을 사용하는, GraphPad Prism 8 소프트웨어에 의한 것이다.

[0761] 별도의 실험에서, 이어서 인간 FIX 활성을 Rossix에 의해 임상 2단계 발색원성 기질 검정 키트를 사용하여 평가하였다. *ALB*$^{hu/hu}$ / *F9*$^{-/-}$ 마우스 혈장에 스파이크된 정제된 인간 FIX 단백질(ERL HFIX 1009으로부터, Lot4940)의 동일한 제조에서 얻은 표준/교정기 혈장을 KO 마우스 혈장에서 인간 FIX의 1.25IU/mL 내지 0IU/mL의 표준 곡선을 제조하는 데 사용하였다. 대조군 혈장 샘플은 삽입 연구에서 선택된 마우스 혈장 샘플과 동일한 농도의 *F9*$^{-/-}$ 마우스 혈장 내 hFIX 단백질을 매칭하여 생성되었다. 연구 표준/교정기 및 대조군 샘플의 제조 후, 모든 연구 혈장 샘플은 희석제 완충액으로 80x 희석되었고, 13μL/웰을 96 웰 검정 플레이트에 이중으로 첨가하였다. 다음으로, 13μL/웰 시약 A를 검정 플레이트에 첨가하고 37℃에서 5분 동안 인큐베이션하고, 75μL/웰 시약 B(37℃에서 예열된 시약)를 첨가하고 플레이트를 37℃에서 8분 동안 인큐베이션하고(활성을 위해), 25μL/웰 Fxa 기질을 첨가하고 검정 플레이트를 37℃에서 3분 동안 인큐베이션하고, 그리고 25μL/웰의 20% 아세트산(정지 용액)을 첨가하고, SoftMax 7.2에 의해 분자 디바이스 마이크로플레이트 판독기에서 405nm에서 흡광도를 판독하였다. 데이터 분석은 표준 곡선으로부터 보간된 데이터를 얻기 위해 비선형 최상의 곡선 피팅을 사용하는, GraphPad Prism 8 소프트웨어에 의한 것이다. **도19**에 나타낸 바와 같이, 마우스-생성 인간 FIX는, Aniara 진단의 임상 2단계 발색원성 기질 분석 키트와 Rossix의 임상 2단계 발색 기질 분석 키트를 모두 사용하여 2단계 발색원성 기질 분석에서 정제된 인간 FIX와 유사한 특이적 활성을 보여주었다.

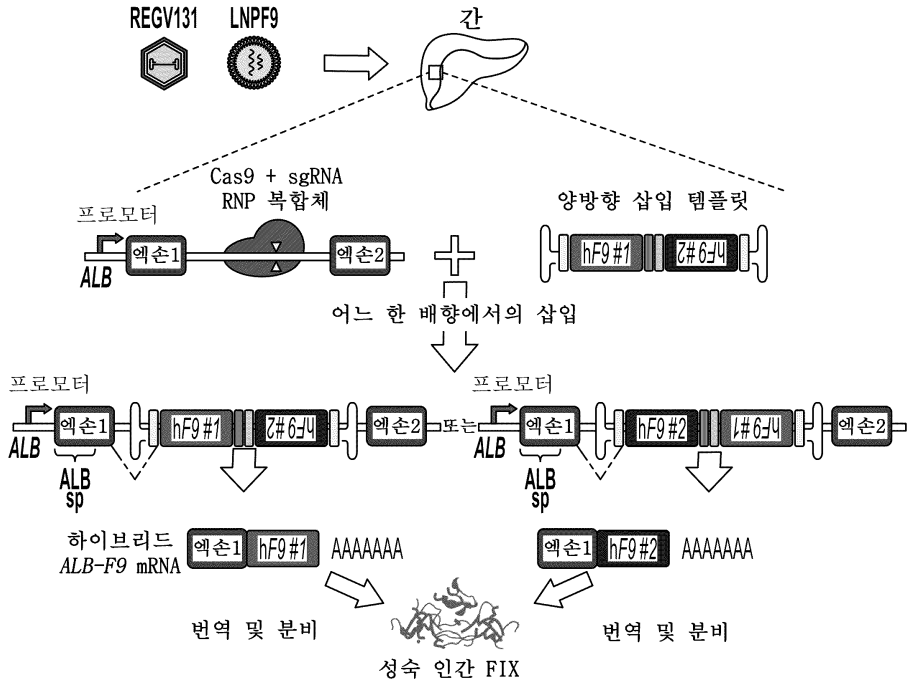
[0762] 요약하면, LNP 및 AAV의 농도가 증가함에 따라 용량-의존적 hFIX 발현이 관찰되었고, 발현은 6주의 관찰에 걸쳐 지속되었다. 또한, 마우스-생성 hFIX는 다수의 기능적 검정을 사용하여 검증된 바와 같이 기능적으로 활성이었다: 그것은 aPTT를 정상으로 회복하였고, 이는 정제된 hFIX와 유사한 특이적 활성을 가졌고(OS 및 CS 임상 검정을 사용하여 확인됨), 꼬리 출혈 공격 후 지혈 용량을 회복시켰다.

도면

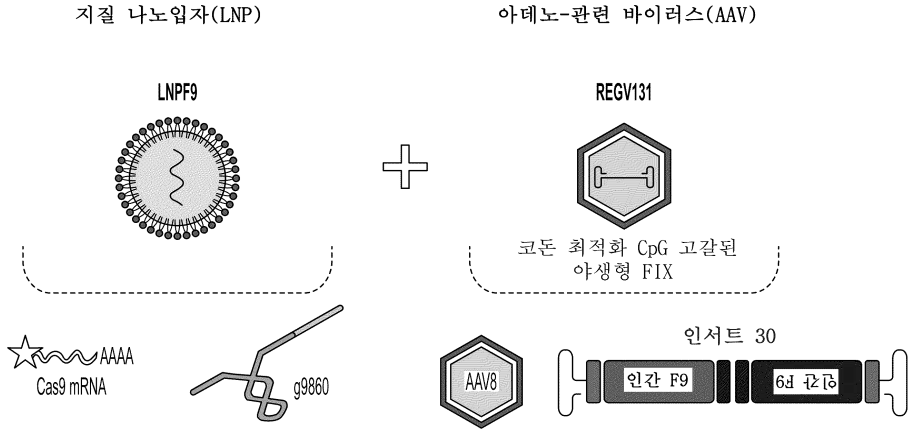
도면1



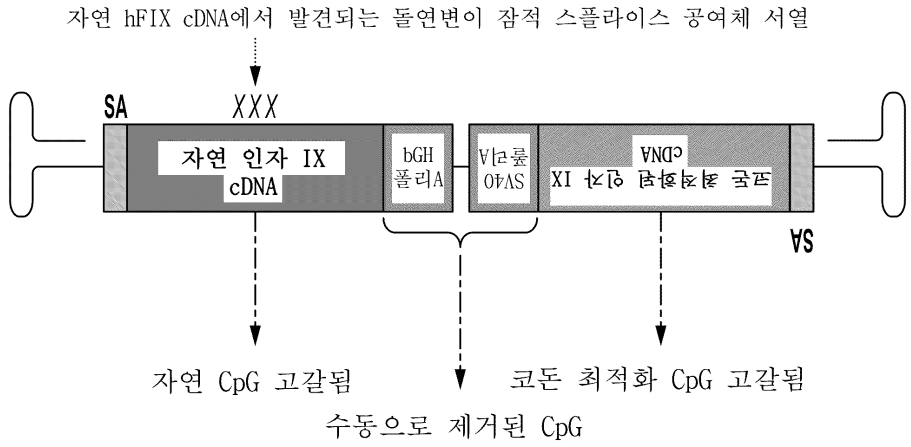
도면2


REGV131
LNPF9
간
Cas9 + sgRNA
RNP 복합체
프로모터
ALB
엑손1
엑손2
양방향 삽입 템플릿
hF9#1
hF9#2
어느 한 배향에서의 삽입
프로모터
ALB
엑손1
hF9#1
hF9#2
엑손2
ALB sp
또는
프로모터
ALB
엑손1
hF9#2
hF9#1
엑손2
ALB sp
하이브리드
ALB-F9 mRNA
엑손1
hF9#1
AAAAAAA
엑손1
hF9#2
AAAAAAA
번역 및 분비
번역 및 분비
성숙 인간 FIX

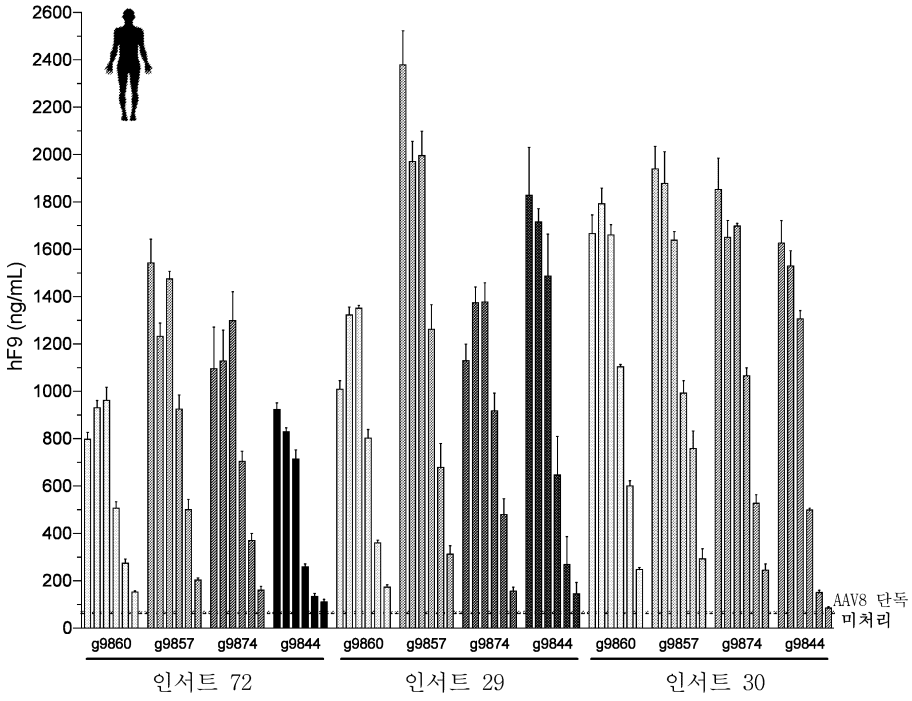
도면3


지질 나노입자(LNP)
아데노-관련 바이러스(AAV)
LNPF9
REGV131
코돈 최적화 CpG 고갈된
야생형 FIX
AAAA
Cas9 mRNA
g9860
AAV8
인서트 30
인간 F9
인간 F9

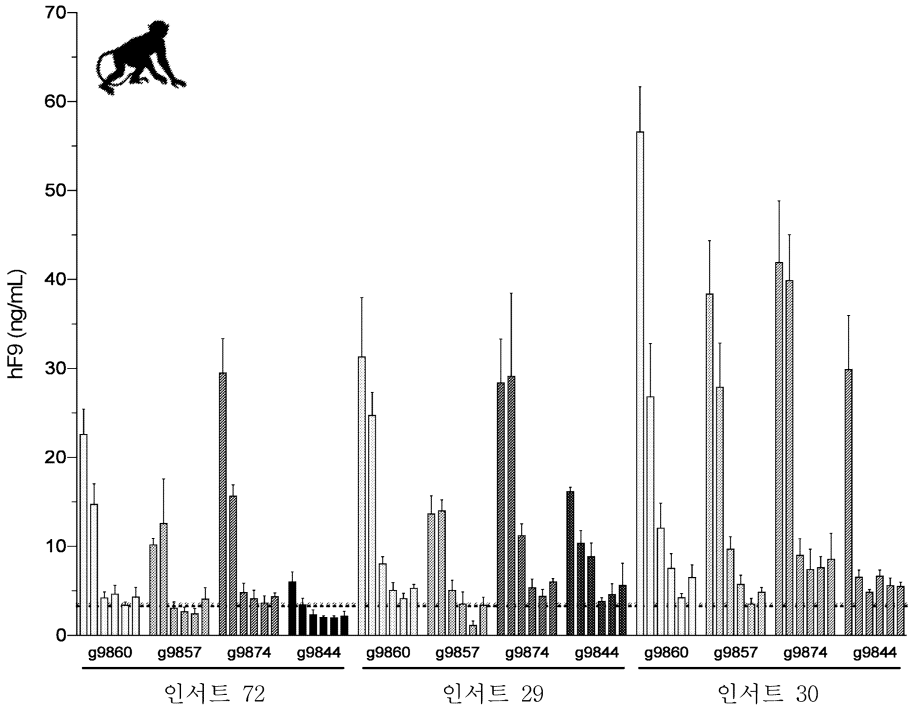
도면4


자연 hFIX cDNA에서 발견되는 돌연변이 잠적 스플라이스 공여체 서열
SA
XXX
자연 인자 IX
cDNA
bGH
폴리A
SV40
폴리A
코돈 최적화된 인자 IX
cDNA
SA
자연 CpG 고갈됨
코돈 최적화 CpG 고갈됨
수동으로 제거된 CpG

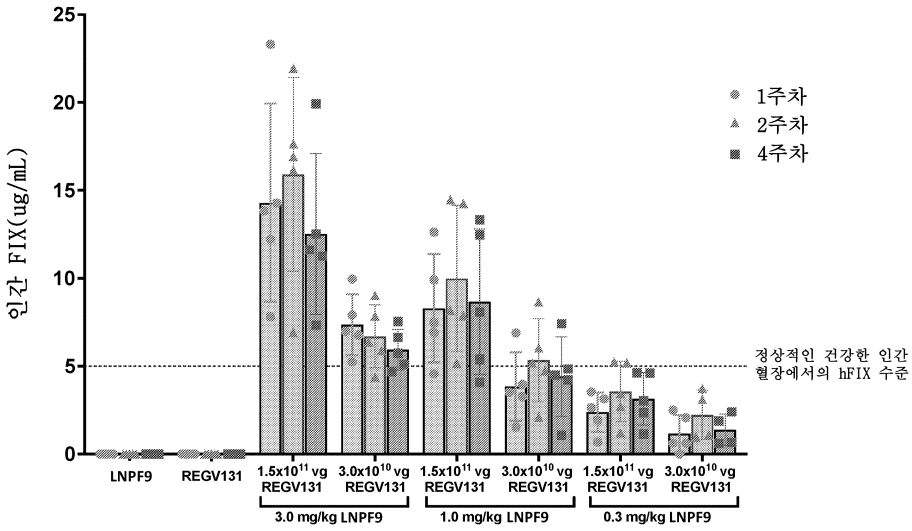
도면5


hF9 (ng/mL)
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
AAV8 단독
미처리
g9860
g9857
g9874
g9844
g9860
g9857
g9874
g9844
g9860
g9857
g9874
g9844
인서트 72
인서트 29
인서트 30

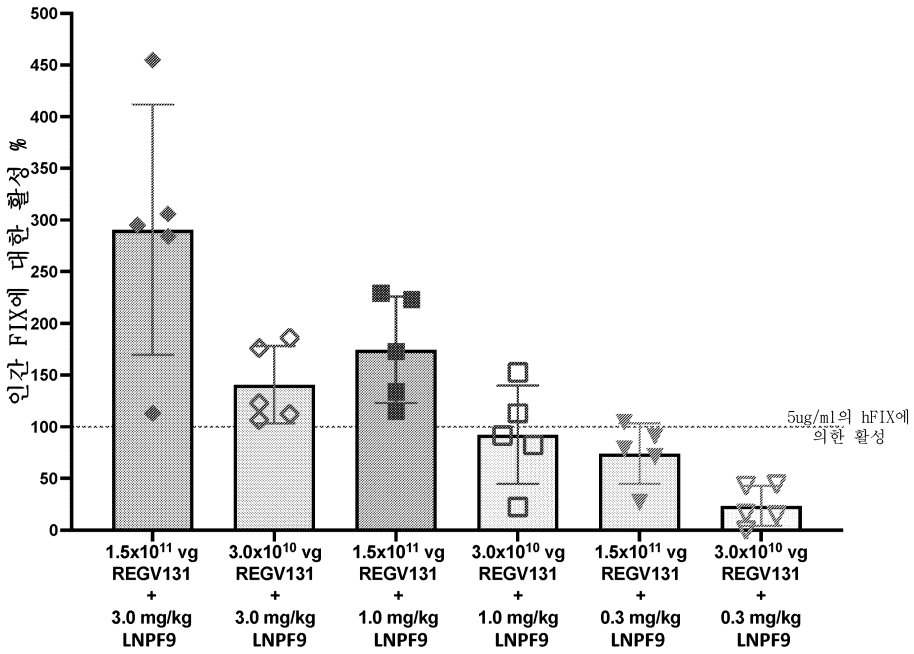
도면6


hF9 (ng/mL)
70
60
50
40
30
20
10
0
g9860
g9857
g9874
g9844
g9860
g9857
g9874
g9844
g9860
g9857
g9874
g9844
인서트 72
인서트 29
인서트 30

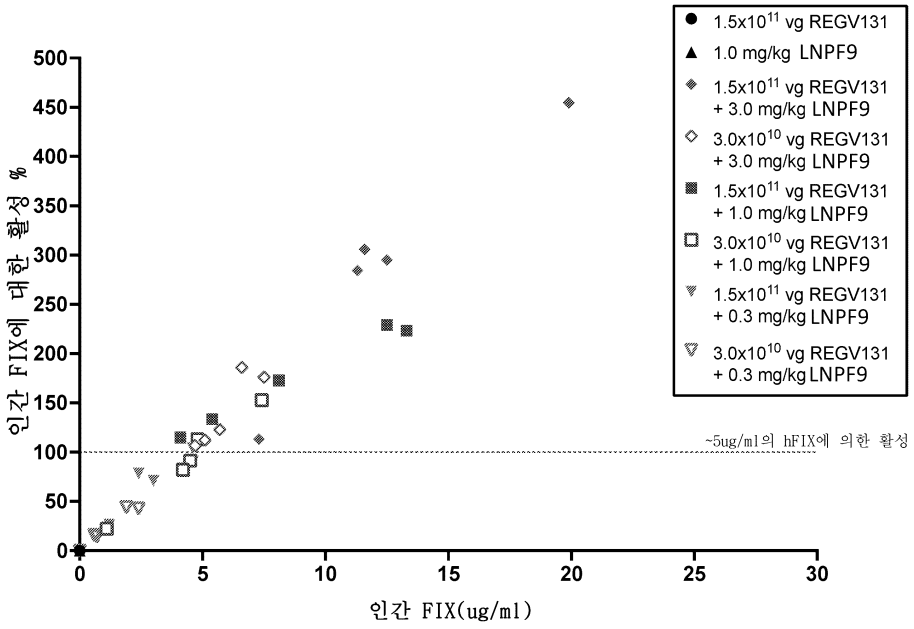
도면7


인간 FIX(ug/mL)
25
20
15
10
5
0
1주차
2주차
4주차
정상적인 건강한 인간
혈장에서의 hFIX 수준
LNPF9
REGV131
1.5x10^11 vg REGV131
3.0x10^10 vg REGV131
1.5x10^11 vg REGV131
3.0x10^10 vg 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

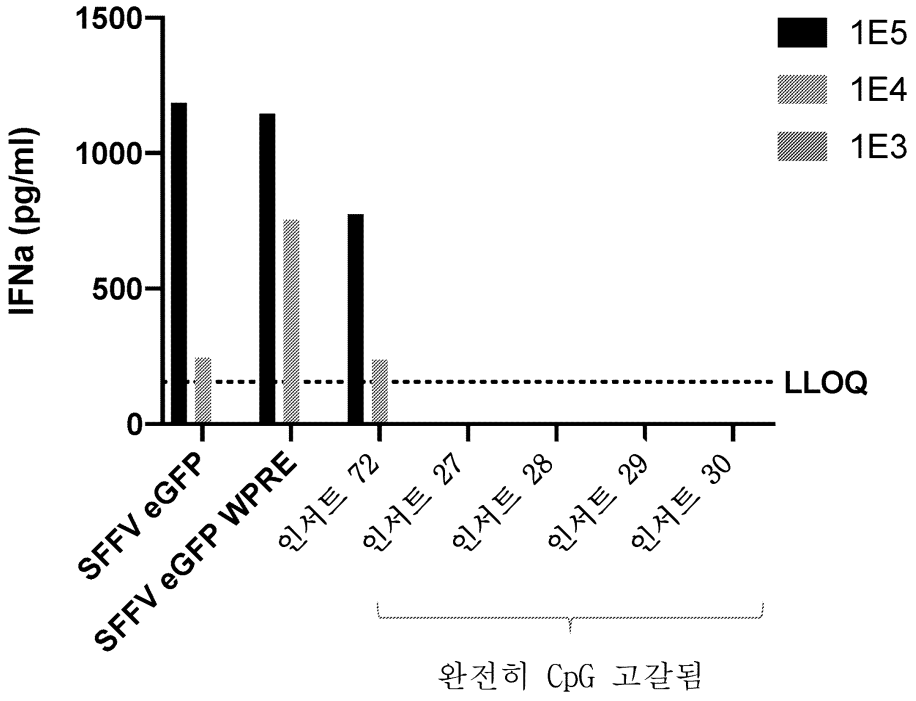
도면8a


인간 FIX에 대한 활성 %
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
5ug/ml의 hFIX에 의한 활성
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

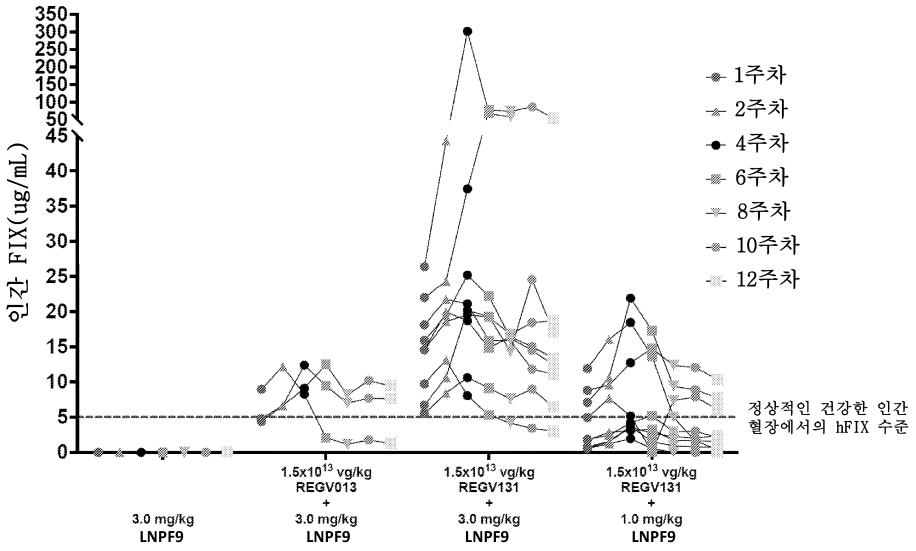
도면8b


인간 FIX에 대한 활성 %
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
30
인간 FIX(ug/ml)
~5ug/ml의 hFIX에 의한 활성
1.5x10^11 vg REGV131
1.0 mg/kg LNPF9
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

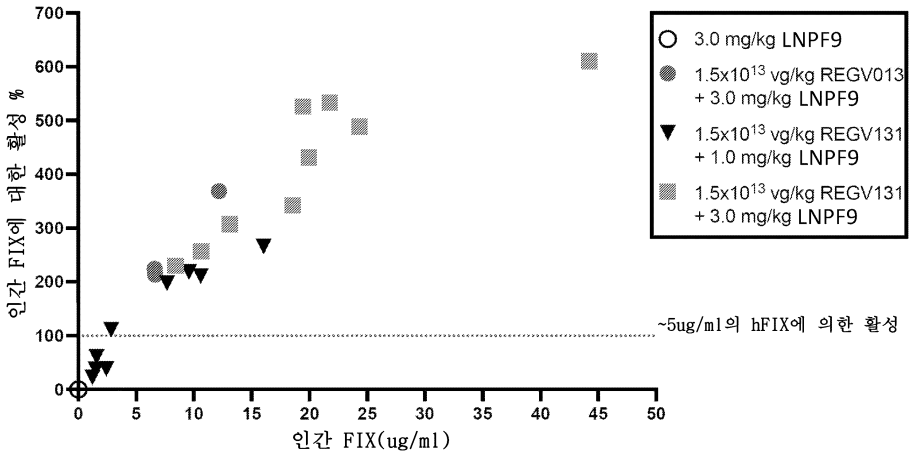
도면9


1500
1000
500
0
IFNa (pg/ml)
1E5
1E4
1E3
LLOQ
SFFV eGFP
SFFV eGFP WPRE
인서트 72
인서트 27
인서트 28
인서트 29
인서트 30
완전히 CpG 고갈됨

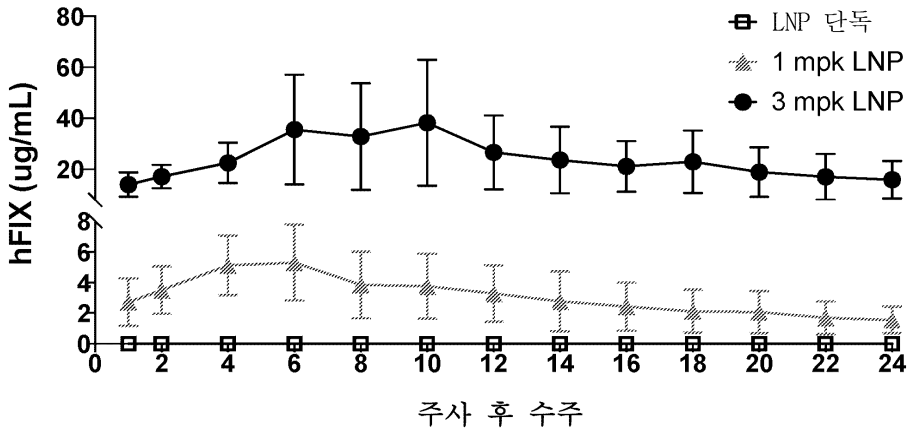
도면10a


350
300
250
200
150
100
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
인간 FIX(ug/mL)
1주차
2주차
4주차
6주차
8주차
10주차
12주차
정상적인 건강한 인간
혈장에서의 hFIX 수준
3.0 mg/kg
LNPF9
1.5x10^13 vg/kg
REGV013
+
3.0 mg/kg
LNPF9
1.5x10^13 vg/kg
REGV131
+
3.0 mg/kg
LNPF9
1.5x10^13 vg/kg
REGV131
+
1.0 mg/kg
LNPF9

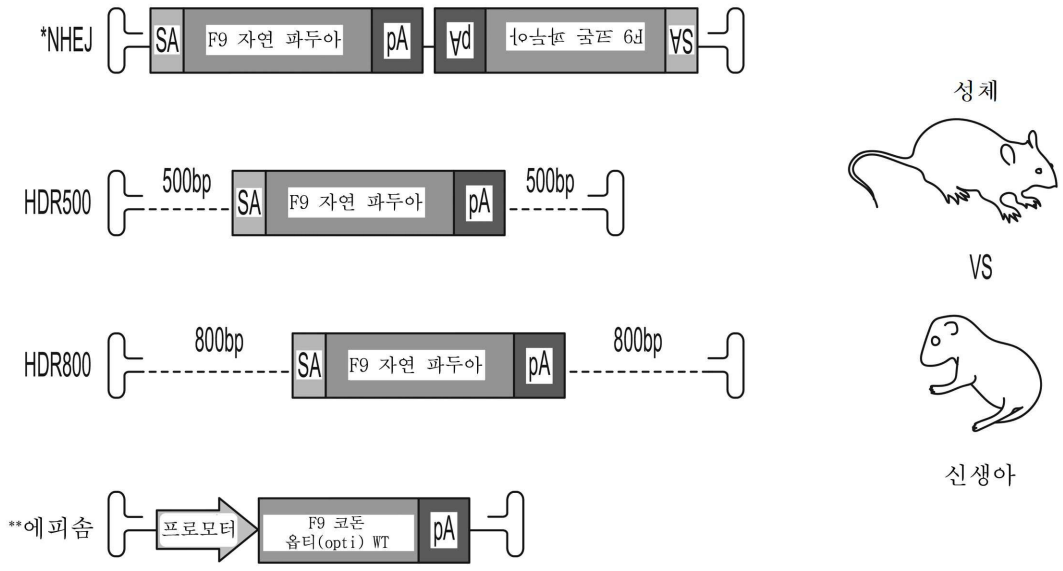
도면10b



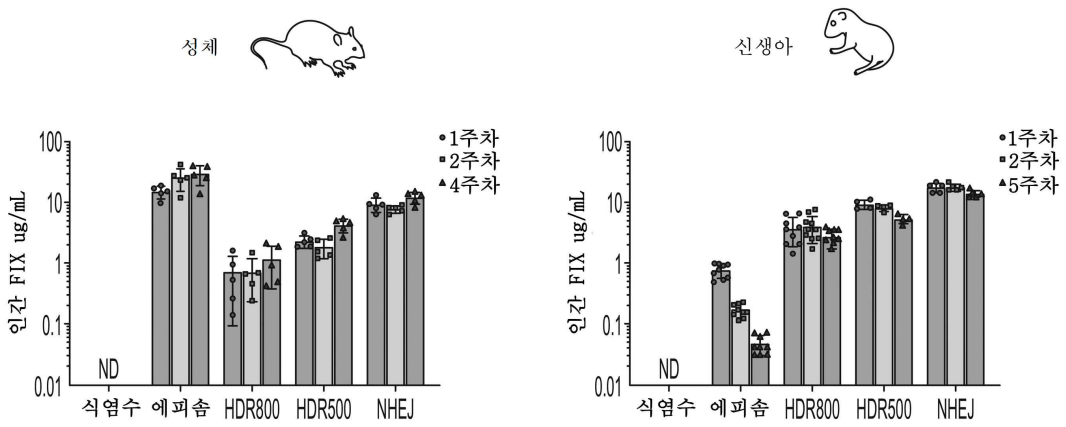
도면10c



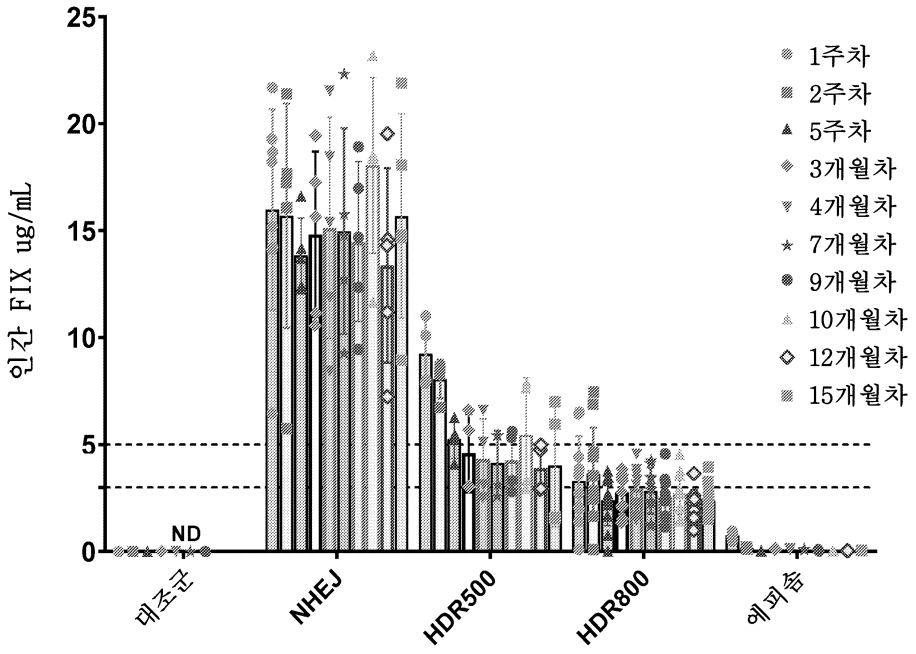
도면11



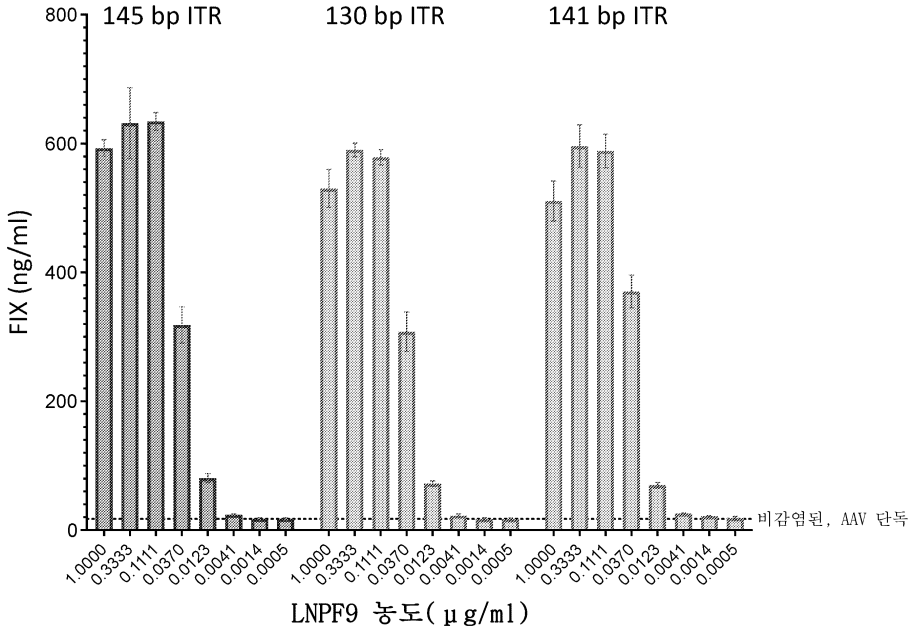
도면12a


성체
신생아
인간 FIX ug/mL
100
10
1
0.1
0.01
ND
식염수
에피솜
HDR800
HDR500
NHEJ
1주차
2주차
4주차
5주차

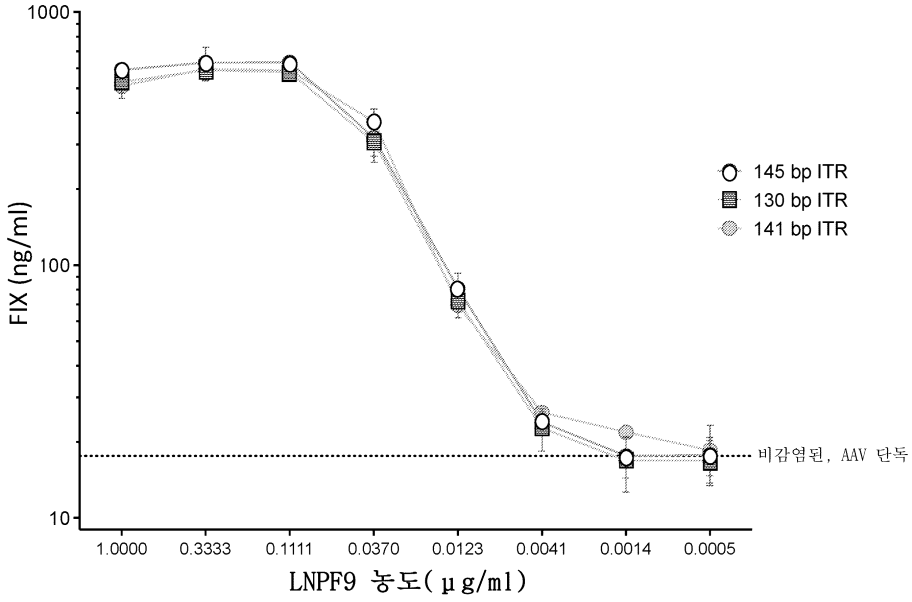
도면12b


인간 FIX ug/mL
25
20
15
10
5
0
ND
대조군
NHEJ
HDR500
HDR800
에피솜
1주차
2주차
5주차
3개월차
4개월차
7개월차
9개월차
10개월차
12개월차
15개월차

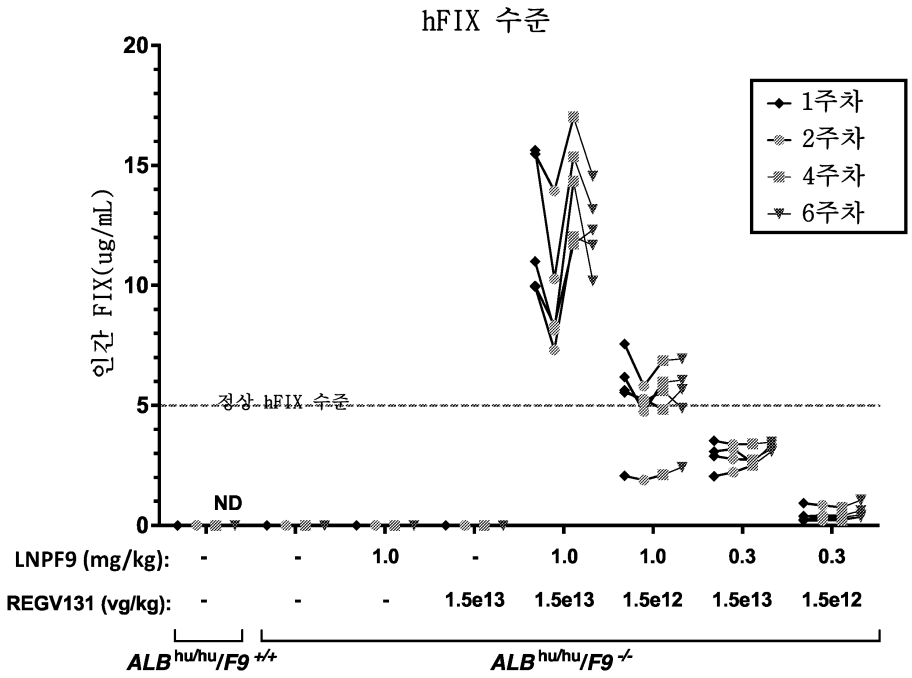
도면13a


145 bp ITR
130 bp ITR
141 bp ITR
FIX (ng/ml)
800
600
400
200
0
비감염된, AAV 단독
1.0000
0.3333
0.1111
0.0370
0.0123
0.0041
0.0014
0.0005
LNPF9 농도(μg/ml)

도면13b

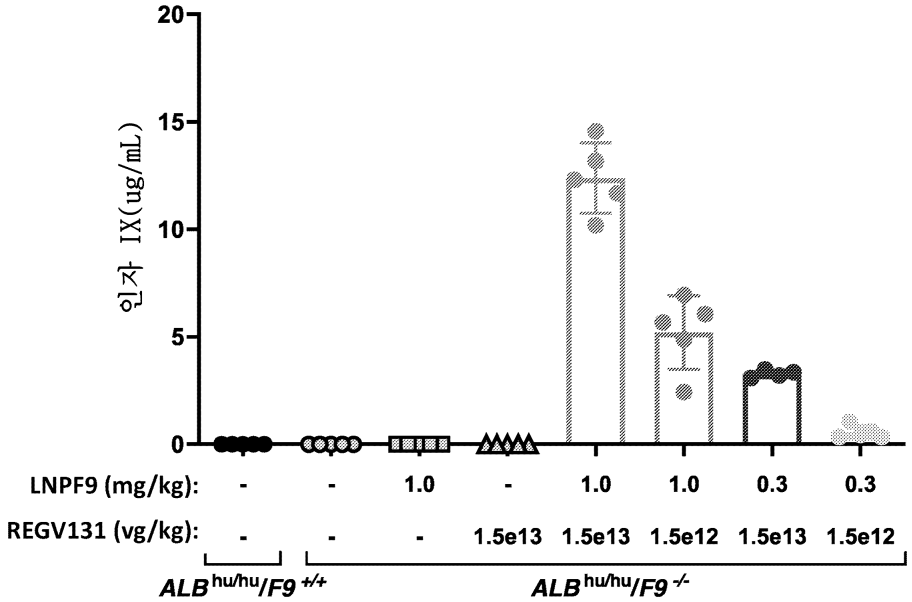

1000
100
10
FIX (ng/ml)
145 bp ITR
130 bp ITR
141 bp ITR
비감염된, AAV 단독
1.0000
0.3333
0.1111
0.0370
0.0123
0.0041
0.0014
0.0005
LNPF9 농도(μg/ml)

도면14a

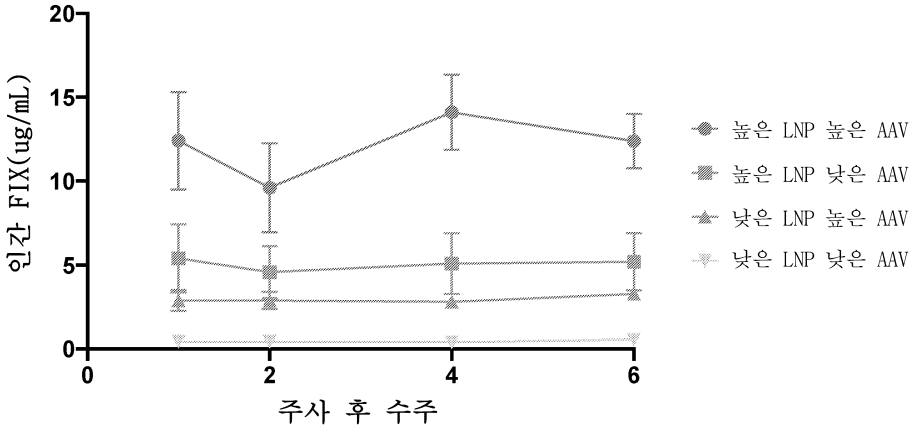


도면14b

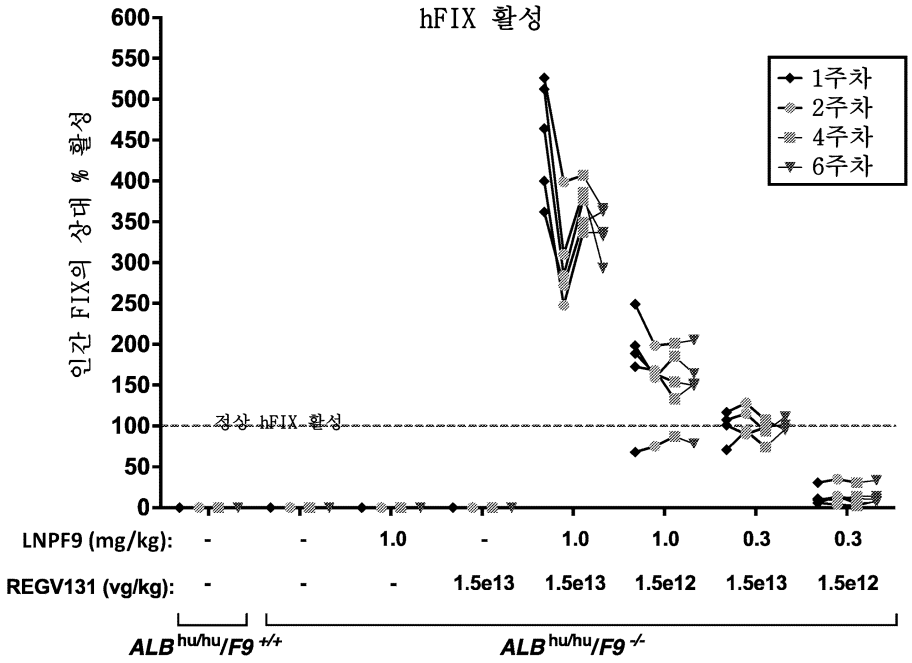
6주차 FIX 단백질 수준



도면14c

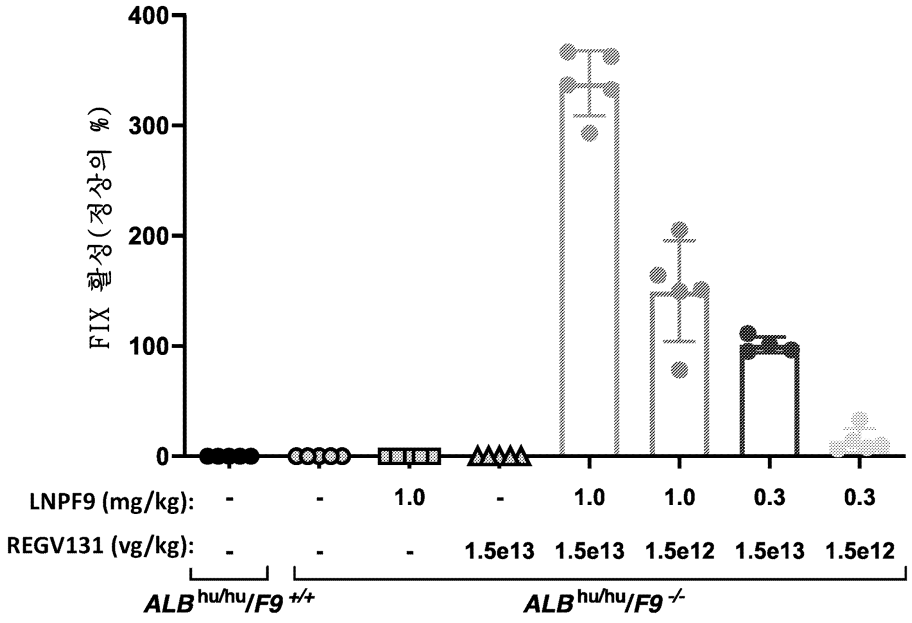

인간 FIX(ug/mL)
20
15
10
5
0
0
2
4
6
주사 후 수주
높은 LNP 높은 AAV
높은 LNP 낮은 AAV
낮은 LNP 높은 AAV
낮은 LNP 낮은 AAV

도면15a


hFIX 활성
인간 FIX의 상대 % 활성
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
정상 hFIX 활성
1주차
2주차
4주차
6주차
LNPF9 (mg/kg): - - 1.0 - 1.0 1.0 0.3 0.3
REGV131 (vg/kg): - - - 1.5e13 1.5e13 1.5e12 1.5e13 1.5e12
ALB hu/hu/F9 +/+
ALB hu/hu/F9 -/-

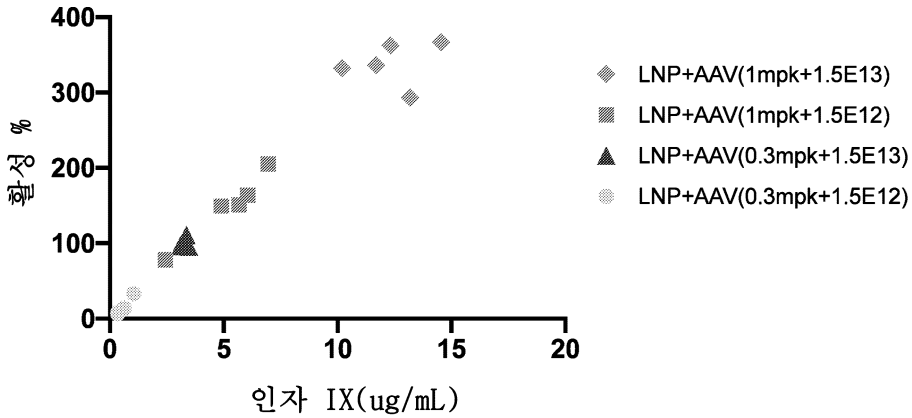
도면15b

6주차 FIX 활성 수준

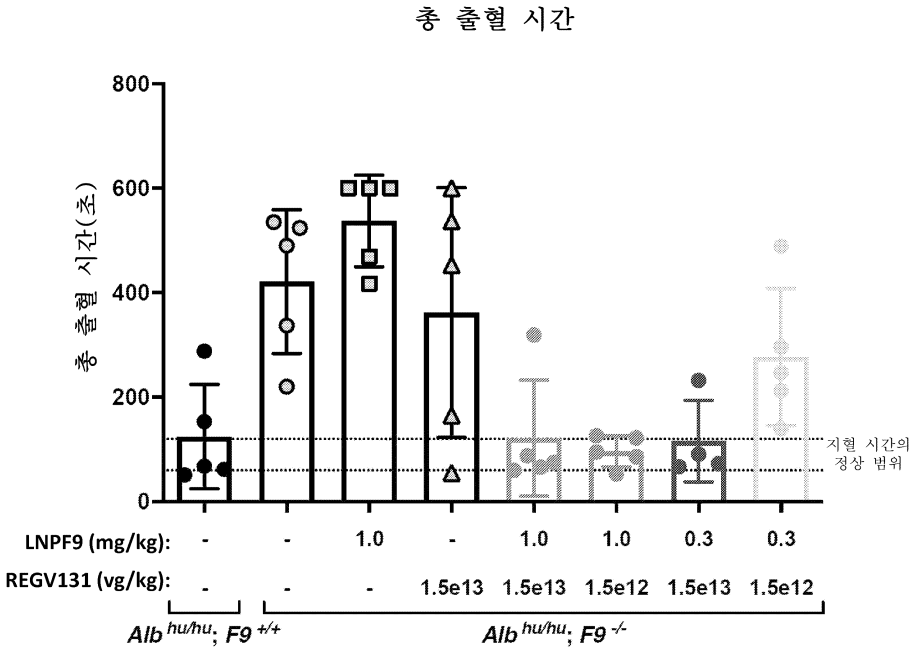


도면15c

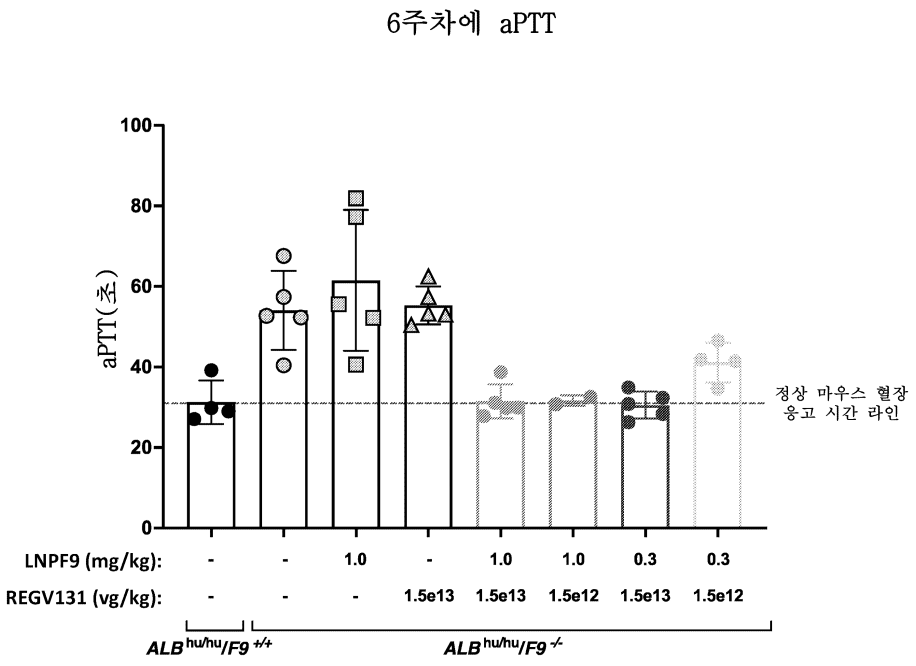
6주차에서 hFIX 단백질과 활성 %의 상관관계



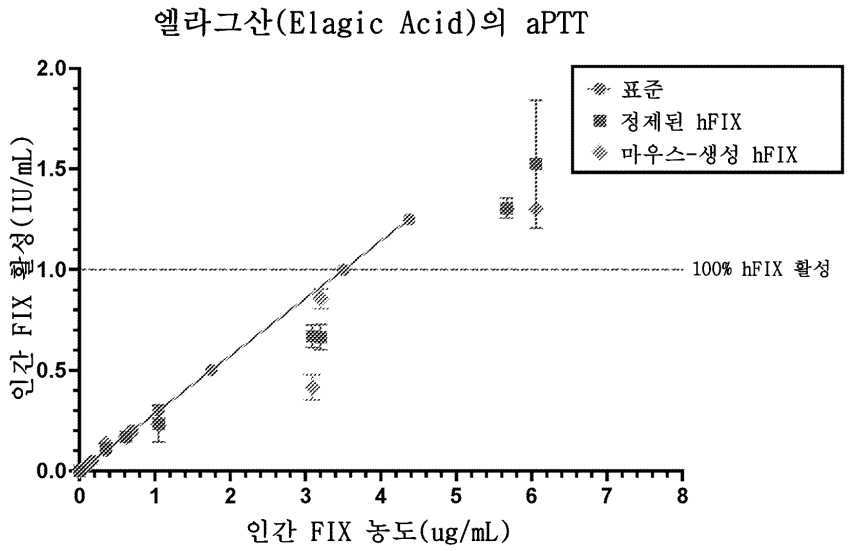
도면16

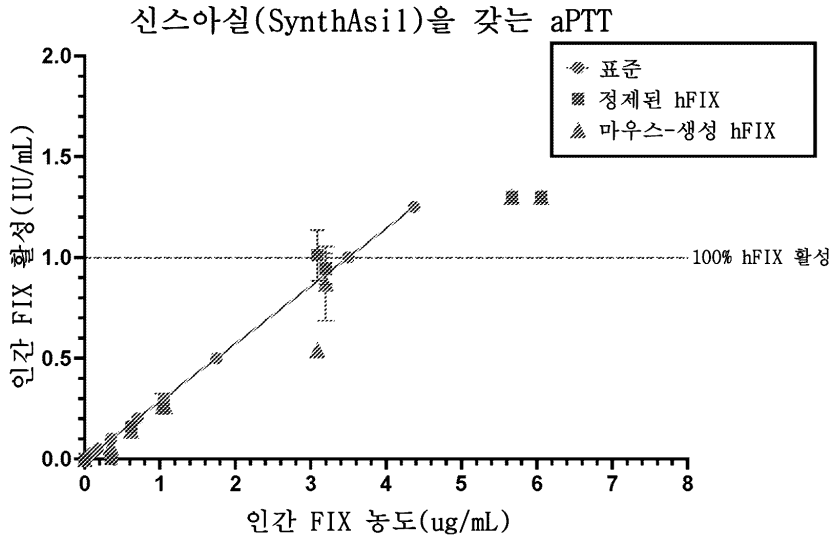

총 출혈 시간
총 출혈 시간(초)
800
600
400
200
0
지혈 시간의
정상 범위
LNPF9 (mg/kg): - - 1.0 - 1.0 1.0 0.3 0.3
REGV131 (vg/kg): - - - 1.5e13 1.5e13 1.5e12 1.5e13 1.5e12
Alb hu/hu; F9 +/+
Alb hu/hu; F9 -/-

도면17

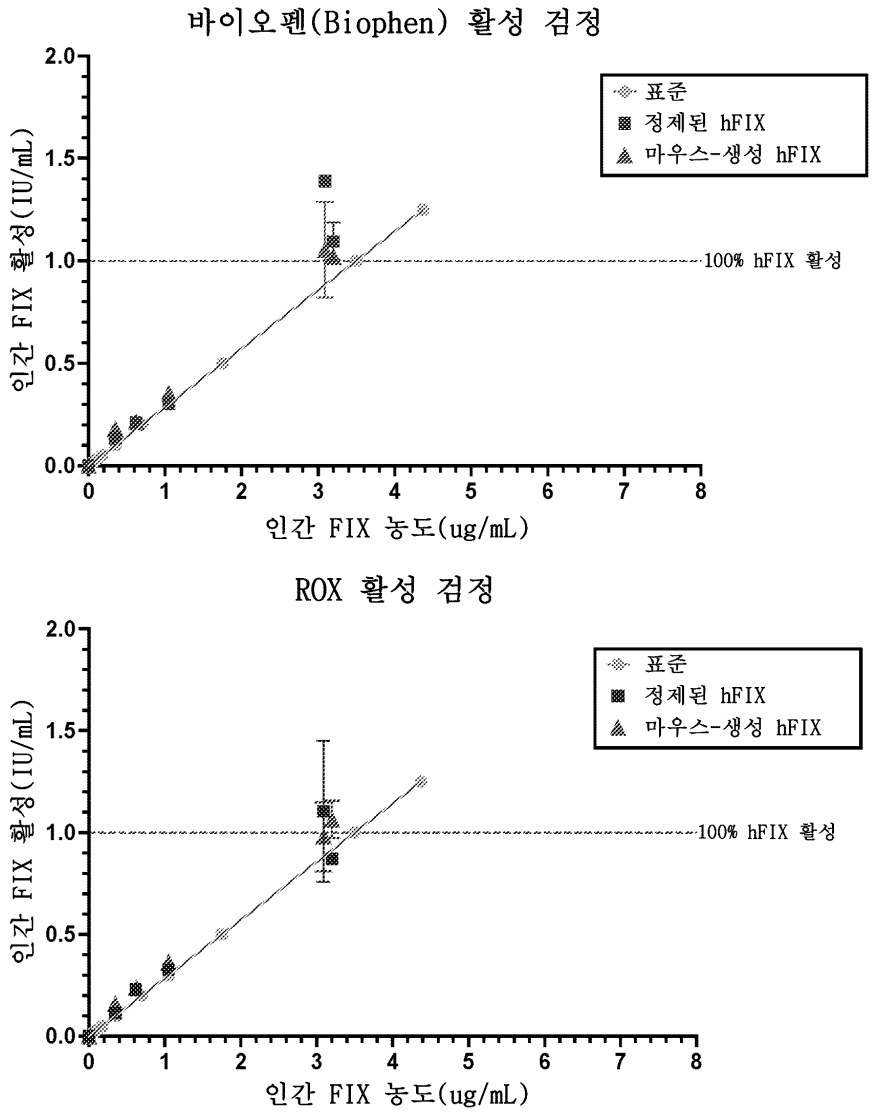

6주차에 aPTT
aPTT(초)
100
80
60
40
20
0
정상 마우스 혈장
응고 시간 라인
LNPF9 (mg/kg): - - 1.0 - 1.0 1.0 0.3 0.3
REGV131 (vg/kg): - - - 1.5e13 1.5e13 1.5e12 1.5e13 1.5e12
ALB hu/hu/F9 +/+
ALB hu/hu/F9 -/-

도면18


엘라그산(Elagic Acid)의 aPTT
표준
정제된 hFIX
마우스-생성 hFIX
100% hFIX 활성
인간 FIX 활성(IU/mL)
인간 FIX 농도(ug/mL)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
6
7
8


신스아실(SynthAsil)을 갖는 aPTT
표준
정제된 hFIX
마우스-생성 hFIX
100% hFIX 활성
인간 FIX 활성(IU/mL)
인간 FIX 농도(ug/mL)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
6
7
8

도면19


바이오펜(Biophen) 활성 검정
표준
정제된 hFIX
마우스-생성 hFIX
100% hFIX 활성
인간 FIX 활성(IU/mL)
인간 FIX 농도(ug/mL)
ROX 활성 검정
표준
정제된 hFIX
마우스-생성 hFIX
100% hFIX 활성
인간 FIX 활성(IU/mL)
인간 FIX 농도(ug/mL)