República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021007289-6 A2

(22) Data do Depósito: 18/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 27/07/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR DEFICIÊNCIA DE ALFA-1 ANTITRIPSINA

(51) Int. Cl.: C12N 15/113; A61K 48/00; C12N 15/90.

(30) Prioridade Unionista: 18/10/2018 US 62/747,522.

(71) Depositante(es): INTELLIA THERAPEUTICS, INC..

(72) Inventor(es): JONATHAN DOUGLAS FINN; HON-REN HUANG; ANTHONY FORGET; XIN XIE.

(86) Pedido PCT: PCT US2019057092 de 18/10/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/082047 de 23/04/2020

(85) Data da Fase Nacional: 16/04/2021

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR DEFICIÊNCIA DE ALFA-1 ANTITRIPSINA. Trata-se de composições e métodos para expressar alfa-1 antitripsina (AAT) em uma célula hospedeira. Também são fornecidos composições e métodos para tratar indivíduos que têm deficiência de alfa-1 antitripsina (AATD).



“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR DEFICIÊNCIA DE ALFA-1 ANTITRIPSINA”

[001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade do Pedido Provisório US nº 62/747.522, depositado em 18 de outubro de 2018. O relatório descritivo do pedido supracitado é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[002] Alfa-1 antitripsina (AAT ou A1AT) ou inibidor de tripsina de soro é um tipo de inibidor de serina protease (também denominado serpina) codificado pelo gene de SERPINA1. AAT é primariamente sintetizada e secretada por hepatócitos e funciona para inibir a atividade de elastase de neutrófilo no pulmão. Sem quantidades suficientes de AAT funcional, a elastase de neutrófilo é descontrolada e danifica alvéolos no pulmão. Assim, mutações em SERPINA1 que resultam em níveis diminuídos de AAT ou níveis diminuídos de AAT funcional de modo apropriado, levam à patologia de pulmão. Além disso, mutações em SERPINA1 que levam à produção de AAT mal formada levam à patologia de fígado devido ao acúmulo de AAT nos hepatócitos. Assim, AAT insuficiente e formada inapropriadamente causada por mutação de SERPINA1 pode levar à patologia de pulmão e fígado.

[003] Mais do que cem variantes alélicas foram descritas para o gene de SERPINA1. As variantes são geralmente classificadas de acordo com o seu efeito em níveis de soro de AAT. Por exemplo, alelos M são variantes normais associadas a níveis de AAT de soro normais, enquanto alelos Z e S são variantes mutantes associadas a níveis de AAT diminuídos. A presença de alelos Z e S é associada a uma deficiência de alfa-1 antitripsina (AATD ou A1AD), um distúrbio genético caracterizado por mutações no gene de SERPINA1 que leva à produção de AAT anormal.

[004] Há muitas formas e graus de AATD. A “variante Z” é a mais comum, causando doença clínica severa tanto em fígado quanto em pulmão. A variante Z é caracterizada por uma mudança de nucleotídeo única na extremidade 5’ do 5º éxon ,que resulta em uma mutação missense de ácido glutâmico para lisina na posição de aminoácido 342 (E342K). Os sintomas surgem em pacientes que são tanto homozigotos (ZZ) quanto heterozigotos (MZ ou SZ) no alelo Z. A presença de um

ou dois alelos Z resulta em instabilidade de mRNA de SERPINA1, e polimerização de proteína de AAT e agregação em hepatócitos de fígado. Pacientes que têm pelo menos um alelo Z têm uma incidência aumentada de câncer de fígado devido ao acúmulo de proteína de AAT agregada no fígado. Além da patologia de fígado, AATD caracterizada por pelo menos um alelo Z também é caracterizada por doença de pulmão devido à diminuição em AAT nos alvéolos e da diminuição resultante em inibição de elastase de neutrófilo. A prevalência da forma ZZ severa (isto é, expressão homozigota da variante Z) é 1: 2.000 em populações do norte europeu, e 1: 4.500 nos Estados Unidos. A outra mutação comum é a variante S, que resulta em uma proteína que é degradada de modo intracelular antes da secreção. Em comparação com a variante Z, a variante S causa redução mais amena em AAT de soro e risco mais baixo para doença de pulmão. Uma necessidade existe por melhorar os efeitos negativos de AATD tanto no fígado quanto no pulmão.

[005] A presente divulgação fornece composições e métodos para expressar AAT heteróloga em um lócus genômico humano, como um sítio de porto seguro de albumina, assim permitindo a secreção de AAT heteróloga e aliviando os efeitos negativos de AATD no pulmão. A presente divulgação também fornece composições e métodos para realizar *knockout* do gene de SERPINA1 endógeno assim eliminando a produção de formas mutantes de AAT que são associadas a sintomas de fígado em pacientes com AATD. A invenção combina o *knockout* de um alelo de SERPINA1 endógeno com inserção de AAT heteróloga em um sítio de porto seguro para restaurar a função de AAT em uma célula ou um organismo.

[006] Em particular, são fornecidos no presente documento RNAs guia para uso em inserção alvejada de uma sequência de ácido nucleico que codifica AAT em um sítio de porto seguro humano, como íntron 1 de um sítio de porto seguro de albumina. Também são fornecidos construtos doadores (por exemplo, construtos bidirecionais), que compreendem uma sequência que codifica AAT, para uso na inserção alvejada em um sítio de porto seguro humano, tal como íntron 1 de um sítio de porto seguro de albumina. Em algumas modalidades, o RNA guia divulgado no presente documento pode ser usado em combinação com um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, Cas nuclease) e um construto doador que compreende uma sequência que codifica AAT (por exemplo, construto bidirecional).

Em algumas modalidades, o construto doador (por exemplo, construto bidirecional) pode ser usado com qualquer um ou mais sistemas de edição de gene (por exemplo, sistema de CRISPR/Cas; sistema de nuclease de dedo de zinco (ZFN); sistema de nuclease efetora semelhante ao ativador de transcrição (TALEN)). As seguintes modalidades são fornecidas.

[007] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para introduzir um ácido nucleico de SERPINA1 em uma célula ou população de células, que compreende administrar: i) um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação de proteína de AAT heteróloga; ii) um agente de ligação de DNA guiado por RNA; e iii) um RNA guia de albumina (gRNA) que compreende uma sequência escolhida de: a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97; d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33; e) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33; f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e g) uma sequência que é complementar a 15 nucleotídeos consecutivos +/- 10 nucleotídeos das coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2 a 33, assim introduzindo o ácido nucleico de SERPINA1 à célula ou população de células.

[008] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para expressar AAT em um indivíduo que necessita da mesma, que compreende administrar: i) um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação de proteína de AAT heteróloga; ii) um agente de ligação de DNA guiado por RNA; e iii) um RNA guia de albumina (gRNA) que compreende uma sequência escolhida de: a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80%, ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos

de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97; d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33; e) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33; f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e g) uma sequência que é complementar a 15 nucleotídeos consecutivos +/- 10 nucleotídeos das coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2 a 33, assim expressando AAT em um indivíduo que necessita da mesma.

[009] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para tratar deficiência de alfa-1 antitripsina (AATD) em um indivíduo que necessita de proteína de AAT, que compreende administrar: i) um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação de proteína de AAT heteróloga; ii) um agente de ligação de DNA guiado por RNA; e iii) uma RNA guia de albumina (gRNA) que compreende uma sequência escolhida de: a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80%, ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97; d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33; e) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33; f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e g) uma sequência que é complementar a 15 nucleotídeos consecutivos +/- 10 nucleotídeos das coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2 a 33, assim tratando AATD no indivíduo.

[010] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método para aumentar a secreção de AAT de uma célula de fígado ou população de células

que compreende administrar: i) um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação de proteína de AAT heteróloga; ii) um agente de ligação de DNA guiado por RNA; e iii) um RNA guia de albumina (gRNA) que compreende uma sequência escolhida de: a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97; d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33; e) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33; f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e g) uma sequência que é complementar a 15 nucleotídeos consecutivos +/- 10 nucleotídeos das coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2 a 33, assim aumentando a secreção de AAT da célula de fígado ou da população de células.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[011] As Figuras 1A a 1C mostram resultados de exame in vitro de um construto bidirecional através de sítios-alvo em hepatócitos de camundongo primários. A Figura 1A representa um esquema do vetor testado. A Figura 1B mostra níveis variados de edição com o uso de vários gRNAs testados (IDs guia indicados no eixo geométrico x). A Figura 1C mostra que o alto nível de edição não necessariamente resultou em expressão mais eficiente do transgene.

[012] As Figuras 2A a 2C mostram resultados de exame in vitro de construtos bidirecionais através de sítios-alvo em hepatócitos cinomolgos primários. A Figura 2A mostra níveis variados de edição detectados para cada uma das combinações testadas. A Figura 2B e a Figura 2C mostram que níveis significativos de edição (como formação de indel em um sítio-alvo específico) não resultaram necessariamente em inserção mais eficiente ou expressão dos transgenes.

[013] As Figuras 3A a 3C mostram resultados de exame in vitro de

construtos bidirecionais através de sítios-alvo em hepatócitos cinomolgos humanos. A Figura 3A mostra níveis variados de edição detectados para cada um dos testes de combinações. A Figura 3B e a Figura 3C mostram que níveis significativos de edição (como formação de indel em um sítio-alvo específico) não resultaram necessariamente em inserção mais eficiente ou expressão dos transgenes.

[014] As Figuras 4A a 4C mostram resultados de estudos in vivo de inserção de hSERPINA1 no lócus de mAlbumina. A Figura 4A mostra resultados de edição com o uso dos gRNAs testados (indicados no eixo geométrico x). A Figura 4B mostra níveis de hA1AT de soro em 1, 2 e 4 semanas depois da dose. A Figura 4C mostra uma correlação positiva entre os níveis de expressão conforme medido em RLU para um dado guia de experimentos in vitro e níveis de expressão de transgene de hA1AT in vivo.

[015] As Figuras 5A a 5D mostram resultados de knockdown in vivo de transgene de PiZ de hSERPINA1 e inserção de hSERPINA1 em lócus de mAlbumina. A Figura 5A destaca as condições de edição usadas para cada grupo de teste. A Figura 5B mostra a formação de indel na variante de PiZ de hSERPINA1 que foi alvejada no Estágio 1. A Figura 5C mostra a formação de indel no lócus de albumina alvejado no Estágio 2. A Figura 5D mostra níveis de proteína de hA1AT em soro em vários pontos no tempo conforme medido por ELISA, assim como níveis de hA1AT conforme medido em plasma humano.

[016] A Figura 6 mostra unidades de luciferase relativas de um ensaio de detecção de fluorescência com base em luciferase.

[017] A Figura 7 mostra os resultados de exame in vitro de um construto bidirecional através de sítios-alvo com o uso de vários sgRNAs em hepatócitos de camundongo primários. A Figura 7 mostra que níveis variados de expressão foram detectados com o uso de vários sgRNAs.

[018] A Figura 8 mostra os resultados de exame in vitro de um construto bidirecional através de sítios-alvo em hepatócitos de rato primários. A Figura 8 mostra a inserção com o uso de determinados RNAs guia (unidades de luciferase relativa).

[019] A Figura 9 mostra a inserção com o uso de várias concentrações de

RNAs guia.

[020] A Figura 10 mostra níveis de AAT com o uso de vários construtos de AAV.

[021] A Figura 11 mostra níveis de AAT em vários pontos no tempo conforme medido por ELISA.

[022] A Figura 12 mostra a formação de indel no lócus de albumina.

[023] A Figura 13A mostra níveis de AAT em vários pontos no tempo conforme medido por ELISA. A Figura 13B mostra níveis de AAT em vários pontos no tempo conforme medido por LC-MS/MS.

[024] As Figuras 14A e Figura 14B mostram níveis de expressão de AAT com várias concentrações de LNP ou AAV. A Figura 14C e a Figura 14D mostram a formação de indel com o uso de várias concentrações de LNP e AAV.

[025] A Figura 15 mostra um esquema de dois construtos de AAV de AAT bidirecionais.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[026] Referência será feita agora em detalhes a determinadas modalidades da invenção, exemplos dessas são ilustrados nos desenhos anexos. Embora os presentes ensinamentos tenham sido descritos em combinação com várias modalidades, não se pretende limitar a invenção àquelas modalidades. Pelo contrário, os presentes ensinamentos abrangem várias alternativas, modificações e equivalentes, conforme será observado por aqueles versados na técnica.

[027] Antes de descrever os presentes ensinamentos em detalhes, deve-se entender que a divulgação não se limita às composições ou etapas de processo específicas, as quais podem variar. Deve-se notar que, conforme usado neste relatório descritivo e nas modalidades anexas, a forma singular “um”, “uma”, “a” e “o” incluem referências plurais a menos que o contexto dite o contrário. Assim, por exemplo, a referência a “um conjugado” inclui uma pluralidade de conjugados e referência a “uma célula” inclui uma pluralidade de células e semelhantes. Conforme usado no presente documento, o termo “inclui” e suas variantes gramaticais pretendem ser não limitantes, de modo que a citação de itens em uma lista não seja a exclusão de outros itens semelhantes que podem ser substituídos ou adicionados aos itens listados.

[028] As faixas numéricas são inclusivas dos números que definem a faixa. Entende-se que os valores medidos e mensuráveis sejam aproximados, levando-se em conta dígitos significativos e o erro associado à medição. Além disso, o uso de “compreendem”, “compreende”, “que compreende”, “contêm”, “contém”, “que contém”, “incluem”, “inclui” e “que inclui” não pretende ser limitante. Deve-se entender que tanto a descrição geral anterior quanto a descrição detalhada são apenas exemplificativas e explicativas e não são restritivas dos ensinamentos.

[029] A menos que seja observado especificamente no relatório descritivo, modalidades no relatório descritivo que citam “que compreendem” vários componentes também são contempladas como “que consistem nos” ou “que consistem essencialmente nos” componentes citados; modalidades no relatório descritivo que citam “que consistem nos” vários componentes também são contempladas como “que compreendem nos” ou “que consistem essencialmente nos” componentes citados; e modalidades no relatório descritivo que citam “que consistem essencialmente nos” vários componentes também são contempladas como “que consistem nos” ou “que compreendem nos” componentes citados (isso não se aplica intercambiavelmente ao uso desses termos nas modalidades). O termo “ou” é usado em um sentido inclusivo, isto é, equivalente a “e/ou”, a menos que o contexto indique claramente de outra forma.

[030] O termo “cerca de”, quando usado antes de uma lista, modifica cada membro da lista. O termo “cerca de” ou “aproximadamente” significa um erro aceitável para um valor particular conforme determinado por uma pessoa versada na técnica, que depende em parte de como o valor é medido ou determinado.

[031] Os títulos de seção usados no presente documento são para fins organizacionais apenas e não devem ser interpretados como limitação da matéria desejada de maneira nenhuma. No caso de qualquer material incorporado a título de referência contradizer qualquer termo definido neste relatório descritivo ou qualquer outro conteúdo expresso deste relatório descritivo, este relatório descritivo tem o controle.

I. DEFINIÇÕES

[032] A menos que seja afirmado de outra forma, os seguintes termos e frases, conforme usados no presente documento devem ter os seguintes

significados:

[033] “Polinucleotídeo” e “ácido nucleico” são usados no presente documento para se referir a um composto multimérico que compreende nucleosídeos ou análogos de nucleosídeo que têm bases heterocíclicas nitrogenosas ou análogos de base ligados juntos ao longo de uma cadeia principal, que inclui RNA convencional, DNA, RNA e DNA misturados, e polímeros que são análogos dos mesmos. Uma “cadeia principal” de ácido nucleico pode ser constituída por uma variedade de ligações, que incluem uma ou mais por ligações de açúcar e fosfodiéster, ligações de peptídeo e ácido nucleico (“ácidos nucleicos de peptídeo” ou PNA; documento PCT nº WO 95/32305), ligações de fosforotioato, ligações de metilfosfonato ou combinações das mesmas. Porções químicas de açúcar de um ácido nucleico podem ser ribose, desoxirribose, ou compostos similares com substituições opcionais, por exemplo, substituições de 2’ metóxi ou 2’ haleto. Bases nitrogenosas podem ser bases convencionais (A, G, C, T, U), análogos das mesmas (por exemplo, uridinas modificadas, tais como 5-metóxiuridina, pseudouridina ou N1-metilpseudouridina, ou outras); inosina; derivados de purinas ou pirimidinas (por exemplo, desoxiguanosina de N^4-metila, deaza- ou aza-purinas, deaza- ou aza-pirimidinas, bases de pirimidina com grupos de substituinte na posição 5 ou 6 (por exemplo, 5-metilcitosina), bases de purina com um substituinte nas posições 2, 6 ou 8, 2-amino-6-metilaminopurina, O^6-metilguanina, 4-tio-pirimidinas, 4-amino-pirimidinas, 4-dimetil-hidrazina-pirimidinas, e O^4-alquil-pirimidinas; documento de Patente nº U.S. 5.378.825 e PCT nº WO 93/13121). Para a discussão geral, consultar, The Biochemistry of the Nucleic Acids, 5 a 36, Adams et al., 11ª edição, 1992). Ácidos nucleicos podem incluir um ou mais resíduos “abásicos” quando a cadeia principal não inclui base nitrogenosa para a posição (ou posições) do polímero (documento de Patente nº U.S. 5.585.481). Um ácido nucleico pode compreender apenas açúcares de RNA ou DNA convencionais, bases e ligações, ou pode incluir tanto componentes quanto substituições convencionais (por exemplo, nucleosídeos convencionais com substituintes de 2’ metóxi, ou polímeros que contêm tanto nucleosídeos convencionais quanto um ou mais análogos de nucleosídeo). Ácido nucleico inclui “ácido nucleico travado” (LNA), um análogo que contém um ou mais monômeros

de nucleotídeo de LNA com uma unidade de furanose bicíclica travada em uma conformação de açúcar de imitação de RNA, que intensificam a afinidade de hibridização em direção às sequências de RNA e DNA complementares (Vester e Wengel, 2004, Biochemistry 43(42): 13.233 a 13.241). RNA e DNA têm diferentes porções químicas de açúcar e podem se diferir pela presença de uracila ou análogos da mesma em RNA e timina ou análogos da mesma em DNA.

[034] “RNA guia”, ”gRNA” e simplesmente “guia” são usados no presente documento intercambiavelmente para se referir a um guia que compreende uma sequência guia, por exemplo, um crRNA (também conhecido como RNA de CRISPR), ou a combinação de um crRNA e um trRNA (também conhecido como crRNA de tracrRNA (também conhecido como CRISPR RNA), ou a combinação de um crRNA e um trRNA (também conhecido como tracrRNA). O crRNA e trRNA podem ser associados como uma molécula de RNA única (RNA guia único, sgRNA) ou, por exemplo, em duas moléculas de RNA separadas (RNA guia duplo, dgRNA). “RNA” ou “gRNA” se refere a cada tipo. O trRNA pode ser uma sequência de ocorrência natural ou uma sequência de trRNA com modificações ou variações em comparação com sequências de ocorrência natural. RNAs guia, tais como sgRNAs ou dgRNAs, podem incluir RNAs modificados, conforme descrito no presente documento.

[035] Conforme usado no presente documento, uma “sequência guia” se refere a uma sequência dentro de um RNA guia que é complementar a uma sequência-alvo e funciona para direcionar um RNA guia para uma sequência-alvo para ligação ou modificação (por exemplo, clivagem) por um agente de ligação de DNA guiado por RNA. Uma “sequência guia” também pode ser denominada uma “sequência de alvejamento” ou uma “sequência de espaçador”. Uma sequência guia pode ser 20 pares de base em comprimento, por exemplo, no caso de Streptococcus pyogenes (isto é, Spy Cas9) e homólogos/ortólogos de Cas9 relacionados. Sequências mais curtas ou mais longas também podem ser usadas como guias, por exemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 ou 25 nucleotídeos em comprimento. Por exemplo, em algumas modalidades, a sequência guia compreende pelo menos 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência guia de albumina selecionada das SEQ ID NOs: 2 a 33 ou sequência

guia de SERPINA1 selecionada das SEQ ID Nos: 1.000 a 1.128. Em algumas modalidades, a sequência-alvo está em um gene ou em um cromossomo, por exemplo, e é complementar à sequência guia. Em algumas modalidades, o grau de complementaridade ou identidade entre uma sequência guia e sua sequência-alvo correspondente pode ser cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%. Por exemplo, em algumas modalidades, a sequência guia compreende uma sequência com cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com pelo menos 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência guia de albumina selecionada das SEQ ID NOs: 2 a 33 ou sequência guia de SERPINA1 selecionada das SEQ ID Nos: 1.000 a 1.128. Em algumas modalidades, a sequência guia e a região-alvo podem ter 100% de complementaridade ou ser idênticas. Em outras modalidades, a sequência guia e a região-alvo podem conter pelo menos uma disparidade. Por exemplo, a sequência guia e a sequência-alvo podem conter 1, 2, 3 ou 4 disparidades, quando o comprimento total da sequência-alvo tem pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais pares de base. Em algumas modalidades, a sequência guia e a região-alvo podem conter 1 a 4 disparidades quando a sequência guia compreende pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais nucleotídeos. Em algumas modalidades, a sequência guia e a região-alvo podem conter 1, 2, 3 ou 4 disparidades quando a sequência guia compreende 20 nucleotídeos.

[036] Sequências-alvo para agentes de ligação de DNA guiados por RNA incluem ambas as fitas positivas e negativas de DNA genômico (isto é, a sequência dada e o complemento reverso da sequência), como um substrato de ácido nucleico para um agente de ligação de DNA guiado por RNA é um ácido nucleico de fita dupla. Consequentemente, quando se diz que uma sequência guia é “complementar a uma sequência-alvo”, entende-se que a sequência guia pode direcionar um RNA guia para se ligar à fita senso ou antissenso (por exemplo, complemento reverso) de uma sequência-alvo. Assim, em algumas modalidades, quando a sequência guia se liga ao complemento reverso de uma sequência-alvo, a sequência guia é idêntica a determinados nucleotídeos da sequência-alvo (por exemplo, a sequência-alvo que não inclui o PAM) exceto pela substituição de U por T na sequência guia.

[037] Conforme usado no presente documento, um “agente de ligação de DNA guiado por RNA” significa um polipeptídeo ou complexo de polipeptídeos que tem atividade de ligação de RNA e DNA, ou uma subunidade de ligação de DNA de um tal complexo, sendo que a atividade de ligação de DNA é de sequência específica e depende da sequência do RNA. O termo agente de ligação de DNA guiado por RNA também inclui ácidos nucleicos que codificam tais polipeptídeos. Agentes de ligação de DNA guiados por RNA exemplificativos incluem Cas clivases/nickases. Agentes de ligação de DNA guiados por RNA exemplificativos podem incluir formas inativadas dos mesmos (“agentes de ligação de DNA de dCas”), por exemplo, se esses agentes forem modificados para permitir clivagem de DNA, por exemplo, por meio de fusão com um domínio de FokI clivase. “Cas nuclease”, conforme usado no presente documento, engloba Cas clivases e Cas nickases. Cas clivases e Cas nickases incluem um complexo Csm ou Cmr de um sistema de CRISPR de tipo III, a subunidade Cas 10, Csm1 ou Cmr2 do mesmo, um complexo de Cascata de um sistema de CRISPR de tipo I, a subunidade Cas3 do mesmo, e Cas nucleases de Classe 2. Conforme usado no presente documento, uma “Cas nuclease de Classe 2” é um polipeptídeo de cadeia única com atividade de ligação de DNA guiada por RNA. Cas nucleases de Classe 2 incluem Cas clivases/nickases de Classe 2 (por exemplo, variantes H840A, D10A ou N863A), que têm, adicionalmente, atividade de clivases ou nickase de DNA guiadas por RNA, e agentes de ligação de DNA de dCas de Classe 2, em que a atividade de clivase/nickase é inativada”), se esses agentes forem modificados para permitir clivagem de DNA. Cas nucleases de Classe 2 incluem, por exemplo, proteínas Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (por exemplo, variantes N497A, R661A, Q695A, Q926A), HypaCas9 (por exemplo, variantes N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1.0) (por exemplo, variantes K810A, K1003A, R1060A) e eSPCas9(1.1) (por exemplo, variantes K848A, K1003A, R1060A) e modificações das mesmas. A proteína Cpf1, Zetsche et ah, Cell, 163: 1 a 13 (2015), também contém um domínio de nuclease semelhante a RuvC. Sequências de Cpf1 de Zetsche são incorporadas a título de referência em sua totalidade. Consultar, por exemplo, Zetsche, Tabelas S1 e S3. Consultar, por exemplo, Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722 a 736 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385 a

397 (2015). Conforme usado no presente documento, a entrega de um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, uma Cas nuclease, uma Cas9 nuclease ou uma Cas9 nuclease de S. pyogenes) inclui entrega do polipeptídeo ou mRNA.

[038] Conforme usado no presente documento, “ribonucleoproteína” (RNP) ou “complexo de RNP” se refere a um RNA guia juntamente com um agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma Cas nuclease, por exemplo, uma Cas clivase, Cas nickase ou agente de ligação de DNA de dCas (por exemplo, Cas9). Em algumas modalidades, o RNA guia guia o agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como Cas9 para uma sequência-alvo, e o RNA guia hibridiza com a sequência-alvo e o agente se liga à mesma; em casos em que o agente é uma clivase ou nickase, a ligação pode ser seguida por clivagem ou corte.

[039] Conforme usado no presente documento, uma primeira sequência é considerada por “compreender uma sequência com pelo menos X% de identidade com” uma segunda sequência se um alinhamento da primeira sequência com a segunda sequência mostra que X% ou mais das posições da segunda sequência em sua totalidade são correspondidas pela primeira sequência. Por exemplo, a sequência AAGA compreende uma sequência com 100% de identidade com a sequência AAG uma vez que um alinhamento geraria 100% de identidade, em que existem correspondência com todas as três posições da segunda sequência. As diferenças entre RNA e DNA (geralmente a troca de uridina por timidina ou vice-versa) e a presença de análogos de nucleosídeo, tais como uridinas modificadas não contribuem para as diferenças em identidade ou complementaridade entre polinucleotídeos desde que os nucleotídeos relevantes (tal como timidina, uridina ou uridina modificada) tenham o mesmo complemento (por exemplo, adenosina para toda timidina, uridina ou uridina modificada; outro exemplo é citosina e 5-metilcitosina, em que ambas têm guanosina ou guanosina modificada como um complemento). Assim, por exemplo, a sequência 5’-AXG, em que X é qualquer uridina modificada, tal como pseudouridina, pseudouridina de N1-metila ou 5-metóxiuridina, é considerada 100% idêntica a AUG em que ambas são perfeitamente complementares à mesma sequência (5’-CAU). Algoritmos de alinhamento exemplificativos são os algoritmos Smith-Waterman e Needleman-

Wunsch, que são bem conhecidos na técnica. Uma pessoa versada na técnica entenderá que a escolha de configurações de algoritmo e parâmetro é apropriada para um dado par de sequências a ser alinhado; para sequências de comprimento geralmente similar e identidade esperada >50% para aminoácidos ou >75% para nucleotídeos, o algoritmo Needleman-Wunsch com configurações padrão da interface de algoritmo Needleman-Wunsch fornecido pelo EBI no servidor da web www.ebi.ac.uk é geralmente apropriado.

[040] Conforme usado no presente documento, uma primeira sequência é considerada como “X% complementar a” uma segunda sequência se X% das bases da primeira sequência fizerem par com a segunda sequência. Por exemplo, uma primeira sequência 5’AAGA3’ é 100% complementar a uma segunda sequência 3’TTCT5’, e a segunda sequência é 100% complementar à primeira sequência. Em algumas modalidades, uma primeira sequência 5’AAGA3’ é 100% complementar a uma segunda sequência 3’TTCTGTGA5’, enquanto a segunda sequência é 50% complementar à primeira sequência.

[041] Conforme usado no presente documento, “mRNA” é usado no presente documento para se referir a um polinucleotídeo que é inteira ou predominantemente RNA ou RNA modificado e compreende um quadro de leitura aberto que pode ser traduzido em um polipeptídeo (isto é, pode servir como um substrato para tradução por um ribossomo e tRNAs aminoacilados). mRNA pode compreender uma cadeia principal de fosfato-açúcar que inclui resíduos de ribose ou análogos dos mesmos, por exemplo, resíduos de ribose de 2’-metóxi. Em algumas modalidades, os açúcares de uma cadeia principal de fosfato-açúcar de mRNA consistem essencialmente em resíduos de ribose, resíduos de ribose de 2’-metóxi ou uma combinação dos mesmos.

[042] Sequências guia exemplificativas úteis nas composições de RNA guia e métodos descritos no presente documento são mostradas na Tabela 1, Tabela 2 e ao longo do pedido.

[043] Conforme usado no presente documento, “indels” se referem às mutações de inserção/deleção que consistem em um número de nucleotídeos que são inseridos ou deletados no sítio de quebra de fita dupla (DSBs) em um ácido nucleico-alvo.

[044] Conforme usado no presente documento, “alfa-1 antitripsina heteróloga” é usada intercambiavelmente com “AAT heteróloga” ou “A1AT heteróloga” ou “transgene de AAT/A1AT”, que é o produto de gene de um gene de SERPINA1 que é heterólogo com relação ao seu sítio de inserção. Em algumas modalidades, o gene de SERPINA1 é exógeno. A sequência de proteínas de AAT de tipo selvagem humanas está disponível em NCBINP_000286; a sequência de gene está disponível em NCBINM_000295. O cDNA de AAT de tipo selvagem humano tem sido sequenciado (consultar, por exemplo, Long et al., “Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant,” Biochemistry 1984) e codifica uma molécula precursora que contém um peptídeo sinal e um peptídeo de AAT maduro. Domínios do peptídeo responsável por alvejamento intracelular, fixação de carboidrato, função catalítica, atividade inibidora de protease, etc., foram caracterizados (consultar, por exemplo, Kalsheker, “Alpha 1-antitrypsin: structure, function and molecular biology of the gene,” Biosci Rep. 1989; Matamala et al., “Identification of Novel Short C-Terminal Transcripts of Human SERPINA1 Gene,” PLoS One 2017; Niemann et al., “Isolation and serine protease inhibitory activity of the 44-residue, C-terminal fragment of alpha 1-antitrypsin from human placenta,” Matrix 1992). Conforme usado no presente documento, AAT heteróloga abrange AAT precursora, AAT madura e variantes e fragmentos das mesmas, por exemplo, fragmentos funcionais, por exemplo, fragmentos que retêm atividade inibidora de protease (por exemplo, pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% ou 100%, em comparação com AAT de tipo selvagem, por exemplo, conforme ensaiado por um ensaio de inibição de protease comercialmente disponível ou ensaio de inibição de elastase de neutrófilo humano (HNE)). Em algumas modalidades, o fragmento funcional é de ocorrência natural, por exemplo, um fragmento C-terminal curto. Em algumas modalidades, o fragmento funcional é geneticamente manipulado, por exemplo, um fragmento funcional hiperativo. Exemplos da sequência de proteínas AAT são descritos no presente documento (por exemplo a SEQ ID NO: 700 ou SEQ ID NO: 702). Conforme usado no presente documento, AAT heteróloga também abrange uma variante de AAT, por exemplo, uma variante que possui atividade inibidora de protease aumentada em comparação com AAT de tipo selvagem.

Conforme usado no presente documento, AAT heteróloga também engloba uma variante que é 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% idêntica a SEQ ID NO: 700, que tem atividade funcional – por exemplo, pelo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100%, ou mais, atividade em comparação com AAT de tipo selvagem, por exemplo, conforme ensaiado por inibição de HNE. Conforme usado no presente documento, AAT heteróloga também abrange um fragmento que possui atividade funcional – por exemplo, pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100%, ou mais, atividade em comparação com AAT de tipo selvagem, por exemplo, conforme ensaiado por inibição de HNE. Conforme usado no presente documento, AAT heteróloga se refere a uma AAT, por exemplo, uma AAT funcional, útil para tratar AATD, que pode ser AAT de tipo selvagem ou uma variante da mesma útil em tratar AATD.

[045] Conforme usado no presente documento, um “gene heterólogo” se refere a um gene que foi introduzido como uma fonte exógena para um sítio dentro de um genoma de célula hospedeira (por exemplo, em um lócus genômico, tal como um lócus de porto seguro que inclui um sítio de íntron 1 de albumina). Um polipeptídeo expresso a partir de tal gene heterólogo é denominado um “polipeptídeo heterólogo”. O gene heterólogo pode ser de ocorrência natural ou modificado geneticamente, e pode ser de tipo selvagem ou uma variante. O gene heterólogo pode incluir sequências de nucleotídeos diferentes da sequência que codifica o polipeptídeo heterólogo. O gene heterólogo pode ser um gene que ocorre naturalmente no genoma hospedeiro, como um tipo selvagem ou uma variante (por exemplo, mutante). Por exemplo, embora a célula hospedeira contenha o gene de interesse (como um tipo selvagem ou como uma variante), o mesmo gene ou variante do mesmo pode ser introduzido como uma fonte exógena para, por exemplo, expressão em um lócus que é altamente expresso. O gene heterólogo também pode ser um gene que não é de ocorrência natural no genoma hospedeiro, ou que expressa um polipeptídeo heterólogo que não é de ocorrência natural no genoma hospedeiro. “Gene heterólogo”, “gene exógeno” e “transgene” são usados intercambiavelmente. Em algumas modalidades, o gene heterólogo ou transgene inclui uma sequência de ácidos nucleicos exógena, por exemplo, uma sequência de ácidos nucleicos não é endógena à célula receptora. Em determinadas

modalidades, o gene heterólogo pode incluir uma sequência de ácidos nucleicos de AAT que não é de ocorrência natural na célula receptora. Por exemplo, uma AAT heteróloga pode ser heteróloga com relação a seu sítio de inserção e com relação a sua célula receptora.

[046] Conforme usado no presente documento, “SERPINA1 mutante” ou “alelo de SERPINA1 mutante” se refere a uma sequência de SERPINA1 que tem uma mudança na sequência de nucleotídeo de SERPINA1 em comparação com a sequência de tipo selvagem (ID de Gene NCBI: 5265; NCBI NM_000295; Ensembl: Ensembl:ENSG00000197249). Em algumas modalidades, um alelo de SERPINA1 mutante codifica uma proteína de AAT não funcional e/ou não secretada.

[047] Conforme usado no presente documento, “AATD” ou “A1AD” se refere à deficiência de alfa-1 antitripsina. AATD compreende doenças e distúrbios causados por uma variedade de mutações genéticas diferentes em SERPINA1. AATD pode se referir a uma doença em que níveis diminuídos de AAT funcional são expressos (por exemplo, menos do que 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, ou 5% de expressão de gene de AAT ou proteína em comparação com uma amostra de controle, por exemplo, por nefelometria ou imunoturbidimetria, por exemplo, AAT de menos do que cerca de 100 mg/dl, 90 mg/dl, 80 mg/dl, 70 mg/dl, 60 mg/dl, 50 mg/dl, 40 mg/dl, 30 mg/dl, 20 mg/dl, 10 mg/dl ou 5 mg/dl em soro), AAT funcional não é expressa, ou uma AAT mutante ou não funcional é expressa (por exemplo, forma agregados e/ou não tem capacidade para ser secretada e/ou tem atividade de inibidor de protease diminuída). Consultar, por exemplo, Greulich e Vogelmeier, Ther Adv Respir Dis 2016. Em algumas modalidades, AATD se refere a uma doença em que AAT é agregada e/ou acumulada de modo intracelular, por exemplo, em um hepatócito, e não secretada, por exemplo, em circulação em que pode ser distribuída aos pulmões para funcionar como um inibidor de protease. Em algumas modalidades, a AATD pode ser detectada por coloração de PASD de seções de tecido de fígado, por exemplo, para medir a agregação. Em algumas modalidades, AATD pode ser detectada por inibição diminuída de elastase de neutrófilo, por exemplo, no pulmão.

[048] Conforme usado no presente documento, uma “sequência-alvo” se refere a uma sequência de ácido nucleico em um gene-alvo que tem

complementaridade com a sequência guia do gRNA. A interação da sequência-alvo e da sequência guia direciona um agente de ligação de DNA guiado por RNA para se ligar, e potencialmente cortar ou clivar (dependendo da atividade do agente), dentro da sequência-alvo.

[049] Conforme usado no presente documento, indivíduos “normais” ou “saudáveis” incluem aqueles indivíduos que não têm os alelos associados à AATD – por exemplo, alelos associados à AATD são ZZ, MZ ou SZ.

[050] Conforme usado no presente documento, “tratamento” se refere a qualquer administração ou aplicação de uma substância terapêutica para doença ou distúrbio em um indivíduo, e inclui inibir a doença, deter seu desenvolvimento, aliviar um ou mais sintomas da doença, curar a doença ou prevenir a recorrência de um ou mais sintomas da doença. AATD pode ser associada à doença de pulmão e/ou doença de fígado; sibilos ou dificuldade de respiração; risco aumentado de infecções de pulmão; doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD); bronquite, asma, dispneia; cirrose; icterícia neonatal; paniculite; tosse crônica e/ou fleuma; resfriados torácicos recorrentes; amarelamento da pele ou da parte branca dos olhos; inchaço da barriga ou pernas. Por exemplo, tratamento de AATD pode compreender aliviar sintomas de AATD, por exemplo, sintomas de fígado e/ou pulmão. Em algumas modalidades, o tratamento se refere a aumentar níveis de AAT de soro, por exemplo, para níveis protetores. Em algumas modalidades, o tratamento se refere a aumentar níveis de AAT de soro, por exemplo, dentro da faixa normal. Em algumas modalidades, o tratamento se refere a aumentar níveis de AAT de soro, por exemplo, acima 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 mg/dl, por exemplo, conforme medido com o uso de nefelometria ou imunoturbidimetria e um padrão purificado. Em algumas modalidades, tratamento se refere à melhora em AAT de soro de linha de base em comparação com controle, por exemplo, antes e após tratamento. Em algumas modalidades, o tratamento se refere a uma melhora em classificação histológica de doença de fígado associada a AATD, por exemplo, por 1, 2, 3 ou mais pontos, em comparação com controle, por exemplo, antes e após tratamento. Em algumas modalidades, o tratamento se refere à melhora em pontuação de fibrose de Ishak em comparação com controle, por exemplo, antes e após tratamento. Em algumas modalidades, o tratamento se refere à melhora em

nível de soro de genótipo, função de pulmão de AAT, teste de espirometria, raio-X torácico de pulmão, tomografia computadorizada de pulmão, teste de sangue de função de fígado e/ou ultrassom de fígado.

[051] Conforme usado no presente documento, “knockdown” se refere a uma diminuição em expressão de um produto de gene particular (por exemplo, proteína, mRNA, ou ambos). O knockdown de uma proteína pode ser medido por, por exemplo, detecção da proteína secretada por tecido ou população de células (por exemplo, em soro ou meio de célula) ou detectando-se a quantidade celular total da proteína de um tecido ou população de células de interesse. Métodos para medir knockdown de mRNA são conhecidos e incluem o sequenciamento de mRNA isolado de um tecido ou população de células de interesse. Em algumas modalidades, “knockdown” pode se referir a alguma perda de expressão de um produto de gene particular, por exemplo, uma diminuição na quantidade de mRNA transcrito ou uma diminuição na quantidade de proteína expressa ou secretada por uma população de células (incluindo populações in vivo como aquelas encontradas em tecidos). Em algumas modalidades, os métodos da divulgação “realizam knockdown” de AAT endógena em um ou mais células (por exemplo, em uma população de células incluindo populações in vivo como aquelas encontradas em tecidos). As células relevantes incluem células que têm capacidade para produzir AAT. Em algumas modalidades, os métodos da invenção realizam knockdown de um alelo de SERPINA1 mutante endógeno, e/ou um alelo de SERPINA1 de tipo selvagem endógeno (por exemplo, em um indivíduo MZ heterozigoto).

[052] Conforme usado no presente documento, “*knockout*” se refere a uma perda de expressão de uma proteína particular em uma célula. *O knockout* pode ser medido detectando-se a quantidade de secreção de proteína de um tecido ou população de células (por exemplo, em soro ou meio de célula) ou detectando-se uma quantidade celular total de uma proteína de um tecido ou uma população de células. As células relevantes incluem células que têm capacidade para produzir AAT. Em algumas modalidades, os métodos da invenção “realizam *knockout*” de AAT endógena em um ou mais células (por exemplo, em uma população de células incluindo populações in vivo como aquelas encontradas em tecidos). Em algumas modalidades, os métodos da divulgação realizam *knockout* de um alelo de

SERPINA1 mutante endógeno, e/ou um alelo de SERPINA1 de tipo selvagem endógeno (por exemplo, em um indivíduo MZ heterozigoto). Em algumas modalidades, um *knockout* é a perda completa de expressão de proteína AAT endógena em uma célula.

[053] Conforme usado no presente documento, “polipeptídeo” se refere a uma proteína de tipo selvagem ou variante (por exemplo, mutante, fragmento, fusão ou combinações dos mesmos). Um polipeptídeo variante pode ter pelo menos ou cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de atividade funcional do polipeptídeo de tipo selvagem. Em algumas modalidades, a variante é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à sequência do polipeptídeo de tipo selvagem. Em algumas modalidades, um polipeptídeo variante pode ser uma variante hiperativa. Em determinados casos, a variante tem entre cerca de 80% e cerca de 120%, 140%, 160%, 180%, 200% ou mais de uma atividade funcional do polipeptídeo de tipo selvagem.

[054] Conforme usado no presente documento, um “construto de ácido nucleico bidirecional” (intercambiavelmente denominado no presente documento ”construto bidirecional”) compreende pelo menos dois segmentos de ácido nucleico, em que um segmento (o primeiro segmento) compreende uma sequência de codificação que codifica um polipeptídeo de interesse (a sequência de codificação pode ser denominada no presente documento “transgene” ou um primeiro transgene), enquanto o outro segmento (o segundo segmento) compreende uma sequência, em que o complemento da sequência codifica um polipeptídeo de interesse, ou um segundo transgene. Isto é, os pelo menos dois segmentos podem codificar polipeptídeos idênticos ou diferentes. Quando os dois segmentos codificam o polipeptídeo idêntico, a sequência de codificação do primeiro segmento não precisa ser idêntica ao complemento da sequência do segundo segmento. Em algumas modalidades, a sequência do segundo segmento é um complemento reverso da sequência de codificação do primeiro segmento. Um construto bidirecional pode ser de fita simples ou fita dupla. O construto bidirecional divulgado no presente documento engloba um construto que tem capacidade para expressar qualquer polipeptídeo de interesse.

[055] Conforme usado no presente documento, um “complemento reverso” se refere a uma sequência que é uma sequência de complemento de uma sequência de referência, em que a sequência de complemento é gravada na orientação reversa. Por exemplo, para uma sequência hipotética 5’ CTGGACCGA 3’ (SEQ ID NO: 500), a sequência complementar “perfeita” é 3’ GACCTGGCT 5’ (SEQ ID NO: 501) e o complemento reverso “perfeito” é escrito 5’ TCGGTCCAG 3’ (SEQ ID NO: 502). Uma sequência de complemento reversa não precisa ser “perfeita” e pode ainda codificar o mesmo polipeptídeo ou um polipeptídeo similar como a sequência de referência. Devido à redundância de uso de códon, um complemento reverso pode divergir de uma sequência de referência que codifica o mesmo polipeptídeo. Conforme usado no presente documento, “complemento reverso” também inclui sequências que são, por exemplo, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idênticas à sequência de complemento reverso de uma sequência de referência.

[056] Em algumas modalidades, um construto de ácido nucleico bidirecional compreende um primeiro segmento que compreende uma sequência de codificação que codifica um primeiro polipeptídeo (um primeiro transgene), e um segundo segmento que compreende uma sequência em que o complemento da sequência codifica um segundo polipeptídeo (um segundo transgene). Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo polipeptídeos são pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idênticos. Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo polipeptídeos compreendem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica, por exemplo, através de 50, 100, 200, 500, 1.000 ou mais resíduos de aminoácido.

[057] Um lócus de “porto seguro” é um lócus dentro do genoma no qual um gene pode ser inserido sem efeitos negativos significativos na célula hospedeira, por exemplo, hepatócito, por exemplo, sem causar apoptose, necrose e/ou senescência, ou sem causar mais do que 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% ou 40% de apoptose, necrose e/ou senescência em comparação com uma célula de

controle. Consultar, por exemplo, Hsin et al., ”Hepatocyte death in liver inflammation, fibrosis, and tumorigenesis,” 2017. Em algumas modalidades, um lócus de porto seguro permite a superexpressão de um gene exógeno sem efeitos negativos significativos na célula hospedeira, por exemplo, hepatócito, sem causar apoptose, necrose e/ou senescência, ou sem causar mais do que 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% ou 40% de apoptose, necrose e/ou senescência em comparação com uma célula de controle. Em algumas modalidades, um lócus de porto seguro desejável pode ser um no qual a expressão da sequência de gene inserida não é perturbada pela expressão de leitura atenta de genes vizinhos. O porto seguro pode estar dentro de um gene de albumina, tal como um gene de albumina humano. O porto seguro pode estar dentro de uma região de íntron 1 de albumina, por exemplo, íntron 1 de albumina humano. O porto seguro pode ser um porto seguro humano, por exemplo, para um tecido hepático ou célula hospedeira de hepatócito. Em algumas modalidades, um porto seguro permite a superexpressão de um gene exógeno sem efeitos negativos significativos na célula hospedeira ou população de células, tais como hepatócitos ou células hepáticas, por exemplo, sem causar apoptose, necrose e/ou senescência, ou sem causar mais do que 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% ou 40% de apoptose, necrose e/ou senescência em comparação com uma célula de controle.

[058] Em algumas modalidades, o gene pode ser inserido em um lócus de porto seguro e usar a sequência de sinal endógena de lócus de porto seguro, por exemplo, a sequência de sinal de albumina codificada por éxon 1. Por exemplo, uma sequência de codificação de AAT pode ser inserida em íntron de albumina humana 1, de modo que esteja a jusante de e se funda à sequência de sinal de éxon de albumina humana 1.

[059] Em algumas modalidades, o gene pode compreender sua própria sequência de sinal, pode ser inserido no lócus de porto seguro, e pode usar adicionalmente a sequência de sinal endógena do lócus de porto seguro. Por exemplo, uma sequência de codificação de AAT que compreende uma sequência de sinal de AAT pode ser inserida em íntron de albumina humana 1, de modo que esteja a jusante de e se funda à sequência sinal de albumina humana codificada por éxon 1.

[060] Em algumas modalidades, o gene pode compreender sua própria sequência de sinal e um sítio de entrada ribossômico interno (IRES), pode ser inserido no lócus de porto seguro, e pode usar adicionalmente a sequência de sinal endógena do lócus de porto seguro. Por exemplo, uma sequência de codificação de AAT que compreende uma sequência de sinal de AAT e uma sequência de IRES pode ser inserida em íntron de albumina humana 1, de modo que esteja a jusante de e se funda à sequência de sinal de albumina humana codificada por éxon 1.

[061] Em algumas modalidades, o gene pode compreender sua própria sequência de sinal e IRES, pode ser inserido no lócus de porto seguro, e não usa adicionalmente a sequência de sinal endógena do lócus de porto seguro. Por exemplo, uma sequência de codificação de AAT que compreende uma sequência de sinal de AAT e uma sequência de IRES pode ser inserida em íntron de albumina humana 1 de modo que não se funda à sequência de sinal de albumina humana codificada por éxon 1. Nessas modalidades, a proteína é traduzida do sítio de IRES e não é quimérica (por exemplo, peptídeo de sinal de albumina fundido à proteína de AAT), que pode ser vantajosamente não ou pouco imunogênica. Em algumas modalidades, a proteína não é secretada e/ou transportada de modo extracelular.

[062] Em algumas modalidades, o gene pode ser inserido no lócus de porto seguro e pode compreender um IRES e não usa qualquer sequência de sinal. Por exemplo, uma sequência de codificação de AAT que compreende uma sequência de IRES e nenhuma sequência de sinal de AAT pode ser inserida em íntron de albumina humana 1 de modo que não se funda à sequência de sinal de albumina humana codificada pelo éxon 1. Em algumas modalidades, as proteínas são traduzidas do sítio de IRES sem a necessidade por qualquer sequência de sinal. Em algumas modalidades, as proteínas não são transportadas de modo extracelular.

[063] Conforme usado no presente documento, uma célula que não é submetida à divisão de célula mitótica é denominada como uma célula “sem divisão”. Uma célula “sem divisão” abrange tipos de célula que nunca ou raramente são submetidos à divisão de célula mitótica, por exemplo, muitos tipos de neurônios. Uma célula “sem divisão” também abrange células que têm capacidade para, mas sem se submeter ou estar prestes a se submeter, à divisão de célula

mitótica, por exemplo, uma célula quiescente. Células hepáticas, por exemplo, retêm a habilidade em dividir (por exemplo, quando lesionadas ou ressecadas), porém, tipicamente não se dividem. Durante a divisão celular mitótica, a recombinação homóloga é um mecanismo pelo qual o genoma é protegido e quebras de fita dupla são reparadas. Em algumas modalidades, uma célula “sem divisão” se refere a uma célula na qual a recombinação homóloga (HR) não é o mecanismo primário pelo qual quebras de DNA de fita dupla são reparadas na célula, por exemplo, em comparação com uma célula de divisão de controle. Em algumas modalidades, uma célula “sem divisão” se refere a uma célula na qual a união de extremidade não homóloga (NHEJ) é o mecanismo primário pelo qual quebras de DNA de fita dupla são reparadas na célula, por exemplo, em comparação com uma célula de divisão de controle.

[064] Tipos de célula sem divisão foram descritos na literatura, por exemplo, através de mecanismos de reparo de quebra de DNA de fita dupla de NHEJ ativos. Consultar, por exemplo, Iyama, DNA Repair (Amst.) 2013, 12(8): 620 a 636. Em algumas modalidades, a célula hospedeira inclui, porém, sem limitação, uma célula hepática, uma célula muscular ou uma célula neuronal. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é um hepatócito, tal como um hepatócito de camundongo, cino ou ser humano. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é um miócito, tal como um monócito de camundongo, cino ou ser humano. Em algumas modalidades, é fornecida no presente documento uma célula hospedeira, descrita acima, que compreende o construto bidirecional divulgado no presente documento. Em algumas modalidades, a célula hospedeira expressa o polipeptídeo de transgene codificado pelo construto bidirecional divulgado no presente documento. Em algumas modalidades, é fornecida no presente documento uma célula hospedeira produzida por um método divulgado no presente documento. Em determinadas modalidades, a célula hospedeira é produzida administrando-se ou entregando-se a uma célula hospedeira um construto de ácido nucleico bidirecional descrito no presente documento, e um sistema de edição de gene, como um sistema de ZFN, TALEN ou CRISPR/Cas9.

II. COMPOSIÇÕES

A. COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM RNA GUIA (gRNAs) DE

ALBUMINA DE PORTO SEGURO E/OU RNA GUIA (gRNAs) DE SERPINA1

[065] São fornecidas no presente documento as composições de RNA guia de albumina, composições de modelo de AAT, e métodos úteis para inserir e expressar um gene de AAT heteróloga (por exemplo, uma AAT funcional ou de tipo selvagem) em um lócus genômico como um gene de porto seguro de uma célula hospedeira. Em particular, conforme exemplificado no presente documento, o alvejamento e a inserção de um gene de AAT heteróloga no lócus de albumina (por exemplo, no íntron 1) permite que o uso de promotor endógeno da albumina acione a expressão robusta do gene de AAT heteróloga. A presente divulgação é com base, em parte, na identificação de RNAs guia de albumina que alvejam especificamente sítios dentro do íntron 1 do gene de albumina, e que fornecem a inserção e a expressão eficientes do gene de AAT heteróloga. Conforme mostrado nos Exemplos e descrito adicionalmente no presente documento, a habilidade de gRNAs identificados para mediar altos níveis de edição, conforme medido através da atividade de formação de indel, inesperadamente não se correlaciona necessariamente com o uso dos mesmos gRNAs para mediar a inserção eficiente de genes heterólogos, conforme medido através, por exemplo, da expressão do transgene de AAT. Isto é, determinados gRNAs que têm capacidade para alcançar um alto nível de edição não têm necessariamente capacidade para mediar a inserção eficiente, e por outro lado, alguns gRNAs mostrados para alcançar baixos níveis de edição podem mediar a inserção e a expressão eficiente de um transgene.

[066] Em algumas modalidades, são divulgadas no presente documento composições úteis para introduzir ou inserir um gene de AAT heteróloga (por exemplo, uma AAT funcional ou de tipo selvagem) em um lócus, como um lócus de albumina (por exemplo, íntron 1) de uma célula hospedeira, por exemplo, com o uso de um RNA guia de albumina divulgado no presente documento com um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, Cas nuclease), e um construto (por exemplo, construto doador ou modelo) que compreende um ácido nucleico de AAT heteróloga (“transgene de AAT”). Em algumas modalidades, são divulgadas no presente documento composições úteis para expressar um gene de AAT heteróloga em um lócus de albumina de uma célula hospedeira, por exemplo, com o uso de um RNA guia de albumina divulgado no presente documento com um

agente de ligação de DNA guiado por RNA, e um construto (por exemplo, doador) que compreende um ácido nucleico de AAT heteróloga. Em algumas modalidades, são divulgadas no presente documento composições úteis para expressar uma AAT heteróloga em um lócus de albumina de uma célula hospedeira, por exemplo, com o uso de um RNA guia de albumina divulgado no presente documento com um agente de ligação de DNA guiado por RNA, e um construto bidirecional que compreende um ácido nucleico de AAT heteróloga. Em algumas modalidades, são divulgadas no presente documento composições úteis para induzir uma quebra (por exemplo, quebra de fita dupla (DSB) ou quebra de fita simples (SSB ou corte)) dentro do gene de albumina de uma célula hospedeira, por exemplo, com o uso de um RNA guia de albumina divulgado no presente documento com um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, um sistema de CRISPR/Cas). As composições podem ser usadas *in vitro* ou *in vivo*, por exemplo, para tratar AATD.

[067] Em algumas modalidades, os RNAs guia de albumina divulgados no presente documento compreendem uma sequência guia que se liga, ou tem capacidade para se ligar dentro de um íntron de um lócus de albumina. Em algumas modalidades, os RNAs guia de albumina divulgados no presente documento se ligam dentro de uma região de íntron 1 do gene de albumina humana de SEQ ID NO: 1. Será reconhecido que nem toda base da sequência guia de albumina deve se ligar dentro das regiões citadas. Por exemplo, em algumas modalidades, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais bases da sequência de RNA guia de albumina se ligam nas regiões citadas. Por exemplo, em algumas modalidades, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais bases contíguas da sequência de RNA guia se ligam com as regiões citadas.

[068] Em algumas modalidades, os RNAs guia de albumina divulgados no presente documento mediam um corte de alvo específico por um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, Cas nuclease) em um sítio dentro do íntron 1 de albumina humana (SEQ ID NO: 1). Será reconhecido que, em algumas modalidades, os RNAs guia compreendem sequências guia que se ligam, ou têm capacidade para se ligaram às ditas regiões.

[069] Em algumas modalidades, os RNAs guia de albumina divulgados no presente documento compreendem uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% ou 88% idêntica a uma

sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2-33.

[070] Em algumas modalidades, os RNAs guia de albumina divulgados no presente documento compreendem uma sequência guia que tem pelo menos 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2-33.

[071] Em algumas modalidades, o RNA guia de albumina (gRNA) compreende uma sequência guia escolhida de: a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97; d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33; e) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33; f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e g) uma sequência que é complementar a 15 nucleotídeos consecutivos +/- 10 nucleotídeos das coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2-33. Em algumas modalidades, o RNA guia de albumina compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. Consultar a Tabela 1.

TABELA 1: SEQUÊNCIAS DE RNA GUIA HUMANO ALVEJADO DE ALBUMINA E COORDENADAS CROMOSSÔMICAS

ID guia	Sequência Guia	Coordenadas Genômicas	SEQ ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCU	chr4:73405113-73405133	2
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAAAUAU	chr4:73405000-73405020	3
G009852	UGCAUUUGUUUCAAAAUAUU	chr4:73404999-73405019	4
G009857	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	chr4:73404761-73404781	5
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUUUG	chr4:73404753-73404773	6
G009859	UUAAAUAAAGCAUAGUGCAA	chr4:73404727-73404747	7

G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	chr4:73404722-73404742	8
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU	chr4:73404715-73404735	9
G009866	UACUAAAACUUUAUUUUACU	chr4:73404452-73404472	10
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAAAAA	chr4:73404418-73404438	11
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGUCAAA	chr4:73405013-73405033	12
G009874	UAAUAAAAUUCAAACAUCCU	chr4:73404561-73404581	13
G012747	GCAUCUUUAAAGAAUUAUUU	chr4:73404478-73404498	14
G012748	UUUGGCAUUUAUUUCUAAAA	chr4:73404496-73404516	15
G012749	UGUAUUUGUGAAGUCUUACA	chr4:73404529-73404549	16
G012750	UCCUAGGUAAAAAAAAAAAA	chr4:73404577-73404597	17
G012751	UAAUUUUCUUUUGCGCACUA	chr4:73404620-73404640	18
G012752	UGACUGAAACUUCACAGAAU	chr4:73404664-73404684	19
G012753	GACUGAAACUUCACAGAAUA	chr4:73404665-73404685	20
G012754	UUCAUUUUAGUCUGUCUUCU	chr4:73404803-73404823	21
G012755	AUUAUCUAAGUUUGAAUAUA	chr4:73404859-73404879	22
G012756	AAUUUUUAAAAUAGUAUUCU	chr4:73404897-73404917	23
G012757	UGAAUUAUUCUUCUGUUUAA	chr4:73404924-73404944	24
G012758	AUCAUCCUGAGUUUUUCUGU	chr4:73404965-73404985	25
G012759	UUACUAAAACUUUAUUUUAC	chr4:73404453-73404473	26
G012760	ACCUUUUUUUUUUUUUACCU	chr4:73404581-73404601	27
G012761	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU	chr4:73404714-73404734	28
G012762	UGAUUCCUACAGAAAAACUC	chr4:73404973-73404993	29
G012763	UGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	chr4:73405094-73405114	30
G012764	CCUCACUCUUGUCUGGGCAA	chr4:73405107-73405127	31
G012765	ACCUCACUCUUGUCUGGGCA	chr4:73405108-73405128	32
G012766	UGAGCAACCUCACUCUUGUC	chr4:73405114-73405134	33

[072] Os RNAs guia de albumina divulgados no presente documento mediam um corte de alvo específico que resulta em uma quebra de fita dupla (DSB). Os RNAs guia de albumina divulgados no presente documento mediam um corte de alvo específico que resulta em uma quebra de fita simples (SSB ou corte).

[073] Em algumas modalidades, os RNAs guia de albumina divulgados no presente documento se ligam a uma região a montante de um motivo adjacente de

protoespaçador (PAM). Conforme seria entendido por aqueles versados na técnica, a sequência de PAM ocorre na fita oposta à fita que contém a sequência-alvo. Isto é, a sequência de PAM está na fita de complemento da fita-alvo (a fita que contém a sequência-alvo à qual o RNA guia se liga). Em algumas modalidades, o PAM é selecionado do grupo que consiste em NGG, NNGRRT, NNGRR(N), NNAGAAW, NNNNG(A/C)TT e NNNNRYAC. Em algumas modalidades, o PAM é NGG.

[074] Em algumas modalidades, as sequências de RNA guia são fornecidas no presente documento complementares a uma sequência adjacente a uma sequência de PAM.

[075] Em algumas modalidades, a sequência de RNA guia compreende uma sequência que é complementar a uma sequência dentro de uma região genômica selecionada dentre as tabelas no presente documento de acordo com coordenadas no genoma de referência humano hg38. Em algumas modalidades, a sequência de RNA guia compreende uma sequência que é complementar a uma sequência que compreende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 nucleotídeos consecutivos de dentro de uma região genômica selecionada dentre as tabelas no presente documento. Em algumas modalidades, a sequência de RNA guia compreende uma sequência que é complementar a uma sequência que compreende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 nucleotídeos consecutivos que abrangem uma região genômica selecionada dentre as tabelas no presente documento.

[076] Os RNAs guia divulgados no presente documento mediam um corte de alvo específico que resulta em uma quebra de fita dupla (DSB). Os RNAs guia divulgados no presente documento mediam um corte de alvo específico que resulta em uma quebra de fita simples (SSB ou corte).

[077] Em algumas modalidades, os RNAs guia de albumina divulgados no presente documento mediam o corte específico de alvo por um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, uma Cas nuclease, conforme divulgado no presente documento), em que um sítio de corte resultante permite a inserção de um ácido nucleico de AAT heteróloga (por exemplo, uma AAT funcional ou de tipo selvagem) no íntron 1 de um gene de albumina. Em algumas modalidades, o RNA guia e/ou sítio de corte permite entre 1 e 5%, 5 e 10%, 15 e 20%, 20 e 25%, 25 e

30%, 30 e 35%, 35 e 40%, 40 e 45%, 45 e 50%, 50 e 55%, 55 e 60%, 60 e 65%, 65 e 70%, 70 e 75%, 75 e 80%, 80 e 85%, 85 e 90%, 90 e 95%, ou 95 e 99% de inserção de um gene de AAT heteróloga. Em algumas modalidades, o RNA guia e/ou sítio de corte permite pelo menos 1%, pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% de inserção de um ácido nucleico de AAT heteróloga. Taxas de inserção podem ser medidas *in vitro* ou *in vivo*. Por exemplo, em algumas modalidades, a taxa de inserção pode ser determinada detectando e medindo-se o ácido nucleico de AAT heteróloga inserido dentro de uma população de células, e calculando-se uma porcentagem da população que contém o ácido nucleico de AAT heteróloga inserido. Os métodos para medir taxas de inserção são conhecidos e estão disponíveis na técnica. Tais métodos incluem, por exemplo, sequenciamento do sítio de inserção ou sequenciamento de mRNA isolado de um tecido ou população de células de interesse.

[078] Em algumas modalidades, o RNA guia permite entre 5 e 10%, 10 e 15%, 15 e 20%, 20 e 25%, 25 e 30%, 30 e 35%, 35 e 40%, 40 e 45%, 45 e 50%, 50 e 55%, 55 e 60%, 60 e 65%, 65 e 70%, 70 e 75%, 75 e 80%, 80 e 85%, 85 e 90%, 90 e 95%, 95 e 99% ou mais de expressão aumentada e/ou secreção de um gene de AAT heteróloga. Por exemplo, em algumas modalidades, a expressão e/ou secreção aumentada pode ser determinada detectando e medindo-se o nível de polipeptídeo de AAT e comparando-se o nível com o nível de polipeptídeo de AAT antes, por exemplo, de tratar as células ou da administração a um indivíduo. A expressão e/ou secreção aumentada de um gene de AAT heteróloga pode ser medida in vitro ou in vivo. Em algumas modalidades, a secreção e/ou expressão de AAT é medida detectando-se a proteína secretada por tecido ou população de células (por exemplo, em soro ou meio de célula) ou detectando-se a quantidade celular total da proteína de um tecido ou população de células de interesse, com o uso de, por exemplo, um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), HPLC, espectrometria de massa (por exemplo, espectrometria de massa líquida (por exemplo, LC-MS, LC-MS/MS), ou ensaio de western blot com meio de cultura e/ou célula ou extrato de tecido (por exemplo, fígado). Em algumas modalidades, a

secreção e/ou expressão de AAT é medida em hepatócitos humanos primários, por exemplo, meio ou amostras celulares. Em algumas modalidades, a secreção de AAT é medida em células HUH7, por exemplo, amostras de meio. Em algumas modalidades, a célula usada é células HUH7. Em algumas modalidades, a quantidade de AAT é comparada com a quantidade de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase GAPDH (um gene doméstico) para controlar mudanças em número de células. Em algumas modalidades, a AAT pode ser avaliada por coloração de PASD de seções de tecido de fígado, por exemplo, para medir a agregação. Em algumas modalidades, AAT pode ser avaliada medindo-se a inibição de elastase de neutrófilo, por exemplo, no pulmão.

[079] Em algumas modalidades, o RNA guia permite entre 5 e 10%, 10 e 15%, 15 e 20%, 20 e 25%, 25 e 30%, 30 e 35%, 35 e 40%, 40 e 45%, 45 e 50%, 50 e 55%, 55 e 60%, 60 e 65%, 65 e 70%, 70 e 75%, 75 e 80%, 80 e 85%, 85 e 90%, 90 e 95%, 95 e 99% ou mais de atividade aumentada que resulta da expressão de um gene de AAT heteróloga (por exemplo, uma AAT funcional ou de tipo selvagem). Por exemplo, a atividade aumentada pode ser determinada detectando e medindo-se o nível de atividade inibidora de protease e comparando-se o nível contra um nível de atividade antes, por exemplo, de tratar as células ou administração a um indivíduo. Tais métodos estão disponíveis e são conhecidos na técnica. Consultar, por exemplo, Mullins et al., “Standardized automated assay for functional alpha 1-antitrypsin”, 1984; Eckfeldt et al., “Automated assay for alpha-1-antitiypsin with N-a-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide astrypsin substrate and standardized with p-nitrophenyl-p’-guanidinobenzoateastitrant fortrypsinactivesites”, 1982.

[080] Em algumas modalidades, a sequência-alvo ou região dentro do íntron 1 de um lócus de albumina humana (da SEQ ID NO: 1) pode ser complementar à sequência guia do RNA guia de albumina. Em algumas modalidades, o grau de complementaridade ou identidade entre uma sequência guia de um RNA guia e sua sequência-alvo correspondente pode ser de pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%. Em algumas modalidades, a sequência-alvo e a sequência guia do gRNA podem ser 100% complementares ou idênticas. Em outras modalidades, a sequência-alvo e a sequência guia do

gRNA podem conter pelo menos uma disparidade. Por exemplo, a sequência-alvo e a sequência guia do gRNA podem conter 1, 2, 3 ou 4 disparidades, em que o comprimento total da sequência guia é de cerca de 20, ou 20. Em algumas modalidades, a sequência-alvo e a sequência guia do gRNA podem conter 1 a 4 disparidades, em que a sequência guia é de cerca de 20, ou 20 nucleotídeos.

[081] Conforme descrito e exemplificado no presente documento, os RNAs guia de albumina podem ser usados para inserir e expressar um gene de AAT heteróloga (por exemplo, uma AAT funcional ou de tipo selvagem) no íntron 1 de um gene de albumina, em combinação com um RNA guia de SERPINA1 para realizar *knockdown* ou *knockout* de um gene de SERPINA1 endógeno (por exemplo, um gene de SERPINA1 mutante). Assim, em algumas modalidades, a presente divulgação inclui composições que compreendem um ou mais RNAs guia (gRNA) de SERPINA1 que compreendem sequências guia que direcionam um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, Cas9) a uma sequência de DNA-alvo em SERPINA1. O gRNA pode compreender uma ou mais das sequências guia mostradas na Tabela 2. Em algumas modalidades, são fornecidos no presente documento um ou mais RNAs guia de SERPINA1 que compreendem uma sequência guia de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1.000 a 1.128.

[082] Em um aspecto, a divulgação fornece um gRNA de SERPINA1 que compreende uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% ou 88% idêntica a uma sequência selecionada das SEQ ID NOs: 1.000 a 1.128.

[083] Em outras modalidades, a composição compreende pelo menos dois gRNAs de SERPINA1 que compreendem sequências guia selecionadas de quaisquer duas ou mais das sequências guia das SEQ ID NOs: 1.000 a 1.128. Em algumas modalidades, a composição compreende pelo menos dois gRNAs que cada um é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% ou 88% idêntico a qualquer um dos ácidos nucleicos das SEQ ID NOs: 1.000 a 1.128.

[084] As composições de RNA guia de SERPINA1 da presente invenção são projetadas para reconhecer uma sequência alvo no gene de SERPINA1. Por exemplo, a sequência alvo de SERPINA1 pode ser reconhecida e clivada pelo

agente de ligação de DNA guiado por RNA fornecido. Em algumas modalidades, uma proteína Cas pode ser direcionada por um RNA guia de SERPINA1 para uma sequência-alvo do gene de SERPINA1, em que a sequência guia do RNA guia hibridiza com a sequência-alvo e a Cas proteína cliva a sequência-alvo.

[085] Em algumas modalidades, a seleção do um ou mais RNAs guia de SERPINA1 é determinada com base em sequências-alvo no gene de SERPINA1.

[086] Sem se atrelar a qualquer teoria particular, mutações em regiões críticas do gene podem ser menos toleráveis do que mutações em regiões não críticas do gene, assim a localização de uma DSB é um fator importante na quantidade ou tipo de *knockdown* ou *knockout* de proteína que pode ser resultante. Em algumas modalidades, um gRNA de SERPINA1 complementar ou que tem complementaridade com uma sequência alvo em SERPINA1 é usado para direcionar a Cas proteína a uma localização particular no gene de SERPINA1. Em algumas modalidades, gRNAs de SERPINA1 são projetados para ter sequências guia que são complementares ou têm complementaridade com sequências-alvo em éxons 2, 3, 4 ou 5 de SERPINA1.

[087] Em algumas modalidades, gRNAs de SERPINA1 são projetados para serem complementares ou terem complementaridade com sequências-alvo em éxons de SERPINA1 que codificam para a região N-terminal de AAT.

TABELA 2: NOMENCLATURA DE SEQUÊNCIA GUIA ALVEJADA E CONTROLE DE SERPINA1, COORDENADAS CROMOSSÔMICAS E SEQUÊNCIA

SEQ ID No	ID guia	Descrição	Coordenadas Cromossômicas Humanas (hg38)	Sequências Guia
1.000	CR001261	Controle 1	Chrl:55039269-55039291	GCCAGACUCCAAGUUCUGCC
1.001	CR001262	Controle 2	Chrl:55039155-55039177	UAAGGCCAGUGGAAAGAAUU
1.002	CR001263	Controle 3	Chrl:55039180-55039202	GGCAGCGAGGAGUCCACAGU
1.003	CR001264	Controle 4	Chrl:55039149-55039171	UCUUUCCACUGGCCUUAACC
1.004	CR001367	Éxon 2	Chrl4:94383211-94383233	CAAUGCCGUCUUCUGUCUCG

1.005	CR001368	Éxon 2	Chrl4:94383210-94383232	AAUGCCGUCUUCUGUCUCGU
1.006	CR001369	Éxon 2	Chrl4:94383209-94383231	AUGCCGUCUUCUGUCUCGUG
1.007	CR001370	Éxon 2	Chrl4:94383206-94383228	AUGCCCCACGAGACAGAAGA
1.008	CR001371	Éxon 2	Chrl4:94383195-94383217	CUCGUGGGGCAUCCUCCUGC
1.009	CR001372	Éxon 2	Chrl4:94383152-94383174	GGAUCCUCAGCCAGGGAGAC
1.010	CR001373	Éxon 2	Chrl4:94383146-94383168	UCCCUGGCUGAGGAUCCCCA
1.011	CR001374	Éxon 2	Chrl4:94383145-94383167	UCCCUGGGGAUCCUCAGCCA
1.012	CR001375	Éxon 2	Chrl4:94383144-94383166	CUCCCUGGGGAUCCUCAGCC
1.013	CR001376	Éxon 2	Chrl4:94383115-94383137	GUGGGAUGUAUCUGUCUUCU
1.014	CR001377	Éxon 2	Chrl4:94383114-94383136	GGUGGGAUGUAUCUGUCUUC
1.015	CR001378	Éxon 2	Chrl4:94383105-94383127	AGAUACAUCCCACCAUGAUC
1.016	CR001379	Éxon 2	Chrl4:94383097-94383119	UGGGUGAUCCUGAUCAUGGU
1.017	CR001380	Éxon 2	Chrl4:94383096-94383118	UUGGGUGAUCCUGAUCAUGG
1.018	CR001381	Éxon 2	Chrl4:94383093-94383115	AGGUUGGGUGAUCCUGAUCA
1.019	CR001382	Éxon 2	Chrl4:94383078-94383100	GGGUGAUCUUGUUGAAGGUU
1.020	CR001383	Éxon 2	Chrl4:94383077-94383099	GGGGUGAUCUUGUUGAAGGU
1.021	CR001384	Éxon 2	Chrl4:94383069-94383091	CAACAAGAUCACCCCCAACC
1.022	CR001385	Éxon 2	Chrl4:94383057-94383079	AGGCGAACUCAGCCAGGUUG
1.023	CR001386	Éxon 2	01114:94383055-94383077	GAAGGCGAACUCAGCCAGGU
1.024	CR001387	Éxon 2	Chrl4:94383051-94383073	GGCUGAAGGCGAACUCAGCC
1.025	CR001388	Éxon 2	Chrl4:94383037-94383059	CAGCUGGCGGUAUAGGCUGA

1.026	CR001389	Éxon 2	Chrl4:94383036-94383058	CUUCAGCCUAUACCGCCAGC
1.027	CR001390	Éxon 2	Chrl4:94383030-94383052	GGUGUGCCAGCUGGCGGUAU
1.028	CR001391	Éxon 2	Chrl4:94383021-94383043	UGUUGGACUGGUGUGCCAGC
1.029	CR001392	Éxon 2	Chrl 4:94383009-94383031	AGAUAUUGGUGCUGUUGGAC
1.030	CR001393	Éxon 2	Chrl 4:94383004-94383026	GAAGAAGAUAUUGGUGCUGU
1.031	CR001394	Éxon 2	Chrl 4:94382995-94383017	CACUGGGGAGAAGAAGAUAU
1.032	CR001395	Éxon 2	Chrl4:94382980-94383002	GGCUGUAGCGAUGCUCACUG
1.033	CR001396	Éxon 2	Chrl4:94382979-94383001	AGGCUGUAGCGAUGCUCACU
1.034	CR001397	Éxon 2	Chrl4:94382978-94383000	AAGGCUGUAGCGAUGCUCAC
1.035	CR001398	Éxon 2	Chrl4:94382928-94382950	UGACACUCACGAUGAAAUCC
1.036	CR001399	Éxon 2	Chrl 4:94382925-94382947	CACUCACGAUGAAAUCCUGG
1.037	CR001400	Éxon 2	Chrl 4:94382924-94382946	ACUCACGAUGAAAUCCUGGA
1.038	CR001401	Éxon 2	Chrl 4:94382910-94382932	GGUUGAAAUUCAGGCCCUCC
1.039	CR001402	Éxon 2	Chrl4:94382904-94382926	GGGCCUGAAUUUCAACCUCA
1.040	CR001403	Éxon 2	Chrl4:94382895-94382917	UUUCAACCUCACGGAGAUUC
1.041	CR001404	Éxon 2	Chrl4:94382892-94382914	CAACCUCACGGAGAUUCCGG
1.042	CR001405	Éxon 2	Chrl4:94382889-94382911	GAGCCUCCGGAAUCUCCGUG
1.043	CR001406	Éxon 2	Chrl4:94382876-94382898	CCGGAGGCUCAGAUCCAUGA
1.044	CR001407	Éxon 2	Chrl4:94382850-94382872	UGAGGGUACGGAGGAGUUCC
1.045	CR001408	Éxon 2	Chrl4:94382841-94382863	CUGGCUGGUUGAGGGUACGG
1.046	CR001409	Éxon 2	Chrl4:94382833-94382855	CUGGCUGUCUGGCUGGUUGA

1.047	CR001410	Éxon 2	Chrl4:94382810-94382832	CUCCAGCUGACCACCGGCAA
1.048	CR001411	Éxon 2	01114:94382808-94382830	GGCCAUUGCCGGUGGUCAGC
1.049	CR001412	Éxon 2	Chrl4:94382800-94382822	GAGGAACAGGCCAUUGCCGG
1.050	CR001413	Éxon 2	Chrl4:94382797-94382819	GCUGAGGAACAGGCCAUUGC
1.051	CR001414	Éxon 2	Chrl4:94382793-94382815	CAAUGGCCUGUUCCUCAGCG
1.052	CR001415	Éxon 2	Chrl4:94382792-94382814	AAUGGCCUGUUCCUCAGCGA
1.053	CR001416	Éxon 2	Chrl4:94382787-94382809	UCAGGCCCUCGCUGAGGAAC
1.054	CR001417	Éxon 2	Chrl 4:94382781-94382803	CUAGCUUCAGGCCCUCGCUG
1.055	CR001418	Éxon 2	Chrl 4:94382778-94382800	CAGCGAGGGCCUGAAGCUAG
1.056	CR001419	Éxon 2	Chrl 4:94382769-94382791	AAAACUUAUCCACUAGCUUC
1.057	CR001420	Éxon 2	Chrl4:94382766-94382788	GAAGCUAGUGGAUAAGUUUU
1.058	CR001421	Éxon 2	Chrl4:94382763-94382785	GCUAGUGGAUAAGUUUUUGG
1.059	CR001422	Éxon 2	Chrl4:94382724-94382746	UGACAGUGAAGGCUUCUGAG
1.060	CR001423	Éxon 2	Chrl4:94382716-94382738	AAGCCUUCACUGUCAACUUC
1.061	CR001424	Éxon 2	Chrl 4:94382715-94382737	AGCCUUCACUGUCAACUUCG
1.062	CR001425	Éxon 2	Chrl 4:94382713-94382735	GUCCCCGAAGUUGACAGUGA
1.063	CR001426	Éxon 2	Chrl 4:94382703-94382725	CAACUUCGGGGACACCGAAG
1.064	CR001427	Éxon 2	Chrl4:94382689-94382711	GAUCUGUUUCUUGGCCUCUU
1.065	CR001428	Éxon 2	Chrl4:94382680-94382702	GUAAUCGUUGAUCUGUUUCU
1.066	CR001429	Éxon 2	Chrl4:94382676-94382698	GAAACAGAUCAACGAUUACG
1.067	CR001430	Éxon 2	Chrl4:94382670-94382692	GAUCAACGAUUACGUGGAGA

1.068	CR001431	Éxon 2	Chrl4:94382669-94382691	AUCAACGAUUACGUGGAGAA
1.069	CR001432	Éxon 2	Chrl4:94382660-94382682	UACGUGGAGAAGGGUACUCA
1.070	CR001433	Éxon 2	Chrl4:94382659-94382681	ACGUGGAGAAGGGUACUCAA
1.071	CR001434	Éxon 2	Chrl4:94382643-94382665	UCAAGGGAAAAUUGUGGAUU
1.072	CR001435	Éxon 2	Chrl4:94382637-94382659	GAAAAUUGUGGAUUUGGUCA
1.073	CR001436	Éxon 2	Chrl 4:94382607-94382629	CAGAGACACAGUUUUUGCUC
1.074	CR001437	Éxon 3	Chrl4:94381127-94381149	UCCCCUCUCUCCAGGCAAAU
1.075	CR001438	Éxon 3	Chrl4:94381098-94381120	CUCGGUGUCCUUGACUUCAA
1.076	CR001439	Éxon 3	Chrl4:94381097-94381119	CUUUGAAGUCAAGGACACCG
1.077	CR001440	Éxon 3	Chrl4:94381080-94381102	CACGUGGAAGUCCUCUUCCU
1.078	CR001441	Éxon 3	Chrl4:94381079-94381101	CGAGGAAGAGGACUUCCACG
1.079	CR001442	Éxon 3	Chrl 4:94381073-94381095	AGAGGACUUCCACGUGGACC
1.080	CR001443	Éxon 3	Chrl 4:94381064-94381086	CGGUGGUCACCUGGUCCACG
1.081	CR001444	Éxon 3	Chrl 4:94381058-94381080	GGACCAGGUGACCACCGUGA
1.082	CR001445	Éxon 3	Chrl4:94381055-94381077	GCACCUUCACGGUGGUCACC
1.083	CR001446	Éxon 3	Chrl4:94381047-94381069	CAUCAUAGGCACCUUCACGG
1.084	CR001447	Éxon 3	Chrl4:94381036-94381058	GUGCCUAUGAUGAAGCGUUU
1.085	CR001448	Éxon 3	Chrl4:94381033-94381055	AUGCCUAAACGCUUCAUCAU
1.086	CR001449	Éxon 3	Chrl 4:94381001-94381023	UGGACAGCUUCUUACAGUGC
1.087	CR001450	Éxon 3	Chrl 4:94380995-94381017	CUGUAAGAAGCUGUCCAGCU
1.088	CR001451	Éxon 3	Chrl 4:94380974-94380996	GGUGCUGCUGAUGAAAUACC

1.089	CR001452	Éxon 3	Chrl4:94380973-94380995	GUGCUGCUGAUGAAAUACCU
1.090	CR001453	Éxon 3	Chrl4:94380956-94380978	AGAUGGCGGUGGCAUUGCCC
1.091	CR001454	Éxon 3	Chrl4:94380945-94380967	AGGCAGGAAGAAGAUGGCGG
1.092	CR001474	Éxon 5	Chrl4:94378611-94378633	GGUCAGCACAGCCUUAUGCA
1.093	CR001475	Éxon 5	Chrl4:94378581-94378603	AGAAAGGGACUGAAGCUGCU
1.094	CR001476	Éxon 5	Chrl4:94378580-94378602	GAAAGGGACUGAAGCUGCUG
1.095	CR001477	Éxon 5	Chrl4:94378565-94378587	UGCUGGGGCCAUGUUUUUAG
1.096	CR001478	Éxon 5	Chrl4:94378557-94378579	GGGUAUGGCCUCUAAAAACA
1.097	CR001483	Éxon 5	Chrl4:94378526-94378548	UGUUGAACUUGACCUCGGGG
1.098	CR001484	Éxon 5	Chrl 4:94378521-94378543	GGGUUUGUUGAACUUGACCU
1.099	CR003190	Éxon 2	Chrl4:94383131-94383153	UUCUGGGCAGCAUCUCCCUG
1.100	CR003191	Éxon 2	Chrl4:94383129-94383151	UCUUCUGGGCAGCAUCUCCC
1.101	CR003196	Éxon 2	Chrl4:94383024-94383046	UGGACUGGUGUGCCAGCUGG
1.102	CR003204	Éxon 2	Chrl4:94382961-94382983	AGCCUUUGCAAUGCUCUCCC
1.103	CR003205	Éxon 2	Chrl4:94382935-94382957	UUCAUCGUGAGUGUCAGCCU
1.104	CR003206	Éxon 2	Chrl 4:94382901-94382923	UCUCCGUGAGGUUGAAAUUC
1.105	CR003207	Éxon 2	Chrl 4:94382822-94382844	GUCAGCUGGAGCUGGCUGUC
1.106	CR003208	Éxon 2	Chrl 4:94382816-94382838	AGCCAGCUCCAGCUGACCAC
1.107	CR003217	Éxon 3	Chrl4:94380942-94380964	AUCAGGCAGGAAGAAGAUGG
1.108	CR003218	Éxon 3	Chrl4:94380938-94380960	CAUCUUCUUCCUGCCUGAUG
1.109	CR003219	Éxon 3	Chrl4:94380937-94380959	AUCUUCUUCCUGCCUGAUGA

1.110	CR003220	Éxon 3	Chrl4:94380881-94380903	CGAUAUCAUCACCAAGUUCC
1.111	CR003221	Éxon 4	Chrl 4:94379554-94379576	CAGAUCAUAGGUUCCAGUAA
1.112	CR003222	Éxon 4	Chrl 4:94379507-94379529	AUCACUAAGGUCUUCAGCAA
1.113	CR003223	Éxon 4	Chrl 4:94379506-94379528	UCACUAAGGUCUUCAGCAAU
1.114	CR003224	Éxon 4	Chrl4:94379505-94379527	CACUAAGGUCUUCAGCAAUG
1.115	CR003225	Éxon 4	Chrl4:94379453-94379475	CUCACCUUGGAGAGCUUCAG
1.116	CR003226	Éxon 4	Chrl4:94379452-94379474	UCUCACCUUGGAGAGCUUCA
1.117	CR003227	Éxon 4	Chrl4:94379451-94379473	AUCUCACCUUGGAGAGCUUC
1.118	CR003235	Éxon 5	Chrl4:94378525-94378547	UUGUUGAACUUGACCUCGGG
1.119	CR003236	Éxon 5	Chrl4:94378524-94378546	UUUGUUGAACUUGACCUCGG
1.120	CR003237	Éxon 5	Chrl4:94378523-94378545	GUUUGUUGAACUUGACCUCG
1.121	CR003238	Éxon 5	Chrl4:94378522-94378544	GGUUUGUUGAACUUGACCUC
1.122	CR003240	Éxon 5	Chrl4:94378501-94378523	UCAAUCAUUAAGAAGACAAA
1.123	CR003241	Éxon 5	Chrl4:94378500-94378522	UUCAAUCAUUAAGAAGACAA
1.124	CR003242	Éxon 5	Chrl4:94378472-94378494	UACCAAGUCUCCCCUCUUCA
1.125	CR003243	Éxon 5	Chrl4:94378471-94378493	ACCAAGUCUCCCCUCUUCAU
1.126	CR003244	Éxon 5	Chrl4:94378463-94378485	UCCCCUCUUCAUGGGAAAAG
1.127	CR003245	Éxon 5	Chrl4:94378461-94378483	CACCACUUUUCCCAUGAAGA
1.128	CR003246	Éxon 5	Chrl4:94378460-94378482	UCACCACUUUUCCCAUGAAG

[088] Cada uma das sequências guia de albumina e sequências de SERPINA1 guia mostradas na Tabela 1 nas SEQ ID NOs: 2 a 33 e Tabela 2 nas

SEQ ID Nos: 1.000 a 1.128, respectivamente, podem compreender adicionalmente nucleotídeos adicionais para formar um crRNA e/ou RNA guia, por exemplo, sendo que a seguinte sequência de nucleotídeos exemplificativa segue a sequência guia em sua extremidade 3': GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 900) na orientação 5' para 3'. No caso de um sgRNA, as sequências guia acima (as sequências guia de albumina e sequências guia de SERPINA1 mostradas na Tabela 1 nas SEQ ID NOs:2 a 33 e Tabela 2 nas SEQ ID Nos: 1000 a 1128, respectivamente) podem compreender adicionalmente nucleotídeos adicionais para formar um sgRNA, por exemplo, em que a seguinte sequência de nucleotídeos exemplificativa segue a extremidade 3' da sequência guia: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 901) na orientação 5' para 3'.

[089] O RNA guia de albumina e/ou SERPINA1 pode compreender adicionalmente um trRNA. Em cada modalidade de composição e método descrita no presente documento, o crRNA e trRNA pode ser associado como um RNA único (sgRNA) ou pode estar em RNAs separados (dgRNA). No contexto de sgRNAs, os componentes de crRNA e trRNA podem ser ligados covalentemente, por exemplo, por meio de uma ligação de fosfodiéster ou outra ligação covalente. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma ou mais ligações entre nucleotídeos que não são uma ligação de fosfodiéster.

[090] Em cada uma das modalidades de composição, uso e método descritas no presente documento, o RNA guia pode compreender duas moléculas de RNA como um "RNA guia duplo" ou "dgRNA". O dgRNA compreende uma primeira molécula de RNA que compreende um crRNA que compreende, por exemplo, uma sequência guia mostrada na Tabela 1 e/ou Tabela 2, e uma segunda molécula de RNA que compreende um trRNA. A primeira e a segunda moléculas de RNA podem não ser ligadas covalentemente, porém podem formar um duplex de RNA por meio do pareamento de base entre porções do crRNA e do trRNA.

[091] Em cada uma das modalidades de composição, uso e método descritas no presente documento, o RNA guia (gRNA de albumina e/ou gRNA de SERPINA1) pode compreender uma molécula de RNA única como um "RNA guia

único” ou “sgRNA”. O sgRNA pode compreender um crRNA (ou uma porção do mesmo) que compreende uma sequência guia mostrada na Tabela 1 ou Tabela 2 covalentemente ligada a um trRNA. O sgRNA pode compreender 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência guia mostrada na Tabela 1 ou Tabela 2. Em algumas modalidades, o crRNA e o trRNA são ligados covalentemente por meio de um ligante. Em algumas modalidades, o sgRNA forma uma estrutura de alça em formato de grampo por meio do pareamento de base entre porções do crRNA e do trRNA. Em algumas modalidades, o crRNA e o trRNA são ligados covalentemente por meio de uma ou mais ligações que não são uma ligação de fosfodiéster. Em algumas modalidades, o RNA guia compreende um sgRNA mostrado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 34 a 67 ou 120 a 163. Em algumas modalidades, o RNA guia compreende um sgRNA que compreende qualquer uma das sequências guia das SEQ ID NOs: 2 a 33, 98 a 119, 165 a 170, 172, 174 a 176, 182 a 185, 189 a 193, 195 a 193, 195 ou 196 e os nucleotídeos da SEQ ID No: 901, em que os nucleotídeos da SEQ ID No: 901 estão na extremidade 3’ da sequência guia, e em que o sgRNA pode ser modificado conforme mostrado nas Tabelas 9, 11 ou 13 ou SEQ ID NO: 300.

[092] Em algumas modalidades, o trRNA pode compreender toda ou uma porção de uma sequência de trRNA derivada de um sistema de CRISPR/Cas de ocorrência natural. Em algumas modalidades, o trRNA compreende um trRNA de tipo selvagem truncado ou modificado. O comprimento do trRNA depende do sistema de CRISPR/Cas usado. Em algumas modalidades, o trRNA compreende ou consiste em 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ou mais do que 100 nucleotídeos. Em algumas modalidades, o trRNA pode compreender determinadas estruturas secundárias, tais como, por exemplo, uma ou mais estruturas de grampo ou alça em formato de grampo, ou uma ou mais estruturas de protuberância.

[093] Em algumas modalidades, uma composição ou formulação divulgada no presente documento compreende um mRNA que compreende um quadro de leitura aberto (ORF) que codifica um agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma Cas nuclease, conforme descrito no presente documento. Em algumas modalidades, um mRNA que compreende um ORF que codifica um agente

de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma Cas nuclease, é fornecido, usado ou administrado.

C. gRNAs E mRNAs Modificados

[094] Em algumas modalidades, o gRNA divulgado no presente documento (por exemplo, gRNA de albumina ou SERPINA1) é quimicamente modificado. Um gRNA que compreende um ou mais nucleosídeos ou nucleotídeos modificados é denominado um gRNA “modificado” ou gRNA “quimicamente modificado”, para descrever a presença de um ou mais componentes de ocorrência não natural e/ou de ocorrência natural ou configurações que são usadas em vez dos resíduos A, G, C e U canônicos ou adicionalmente aos mesmos. Em algumas modalidades, um gRNA modificado é sintetizado com um nucleosídeo ou nucleotídeo não canônico, aqui o mesmo é denominado “modificado”. Nucleosídeos e nucleotídeos modificados podem incluir um ou mais dentre: (i) alteração, por exemplo, substituição, de um ou ambos dentre os oxigênios de fosfato não ligantes e/ou de um ou mais dentre os oxigênios de fosfato ligantes na ligação de cadeia principal de fosfodiéster (uma modificação de cadeia principal exemplificativa); (ii) alteração, por exemplo, substituição, de um constituinte do açúcar de ribose, por exemplo, da 2’-hidroxila no açúcar de ribose (uma modificação de açúcar exemplificativa); (iii) substituição em grande quantidade da porção química de fosfato por ligantes “defosfo” (uma modificação de cadeia principal exemplificativa); (iv) modificação ou substituição de uma nucleobase de ocorrência natural que inclui por uma nucleobase não canônica (uma modificação de base exemplificativa); (v) substituição ou modificação da cadeia principal de ribose-fosfato (uma modificação de cadeia principal exemplificativa); (vi) modificação da extremidade 3’ ou extremidade 5’ do oligonucleotídeo, por exemplo, remoção, modificação ou substituição de um grupo fosfato terminal ou conjugação de uma porção química, cap ou ligante (tal como modificações de cap 3’ ou 5’ podem compreender uma modificação de açúcar e/ou cadeia principal); e (vii) modificação ou substituição do açúcar (uma modificação de açúcar exemplificativa).

[095] Modificações químicas, tais como aquelas listadas acima, podem ser combinadas para fornecer gRNAs e/ou mRNAs modificados que compreendem nucleosídeos e nucleotídeos (coletivamente “resíduos”) que podem ter duas, três,

quatro ou mais modificações. Por exemplo, um resíduo modificado pode ter um açúcar modificado e uma nucleobase modificada. Em algumas modalidades, toda base de um gRNA é modificada, por exemplo, todas as bases têm um grupo fosfato modificado, tal como um grupo fosforotioato. Em determinadas modalidades, todos, ou substancialmente todos os grupos fosfato de uma molécula de gRNA são substituídos por grupos fosforotioato. Em algumas modalidades, gRNAs modificados compreendem pelo menos um resíduo modificado na extremidade 5' do RNA ou próximo à mesma. Em algumas modalidades, gRNAs modificados compreendem pelo menos um resíduo modificado na extremidade 3' do RNA ou próximo à mesma.

[096] Em algumas modalidades, o gRNA compreende um, dois, três ou mais resíduos modificados. Em algumas modalidades, pelo menos 5% (por exemplo, pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100%) das posições em um gRNA modificado são nucleosídeos ou nucleotídeos modificados.

[097] Ácidos nucleicos não modificados podem ser propensos à degradação, por exemplo, por nucleases intracelulares ou aquelas encontradas em soro. Por exemplo, nucleases podem hidrolisar ligações de fosfodiéster de ácido nucleico. Consequentemente, em um aspecto, os gRNAs descritos no presente documento podem conter um ou mais nucleosídeos ou nucleotídeos modificados, por exemplo, para introduzir estabilidade em direção às nucleases intracelulares ou à base de soro. Em algumas modalidades, as moléculas de gRNA modificadas descritas no presente documento podem exibir uma resposta imunológica inata reduzida quando introduzida em uma população de células, tanto *in vivo* quanto *ex vivo*. O termo "resposta imunológica inata" inclui uma resposta celular aos ácidos nucleicos exógenos, que incluem ácidos nucleicos de fita simples, que envolve a indução de expressão e liberação de citocina, particularmente os interferons, e morte celular.

[098] Em algumas modalidades de uma modificação de cadeia principal, o

grupo fosfato de um resíduo modificado pode ser modificado substituindo-se um ou mais dentre os oxigênios por um substituinte diferente. Adicionalmente, o resíduo modificado, por exemplo, resíduo modificado presente em um ácido nucleico modificado, pode incluir a substituição em grande quantidade de uma porção química de fosfato não modificada por um grupo fosfato modificado, conforme descrito no presente documento. Em algumas modalidades, a modificação de cadeia principal da cadeia principal de fosfato pode incluir alterações que resultam em um ligante não carregado ou um ligante carregado com distribuição de carga assimétrica.

[099] Exemplos de grupos fosfato modificados incluem, fosforotioato, fosforosselenatos, fosfatos de borano, ésteres de fosfato de borano, fosfonatos de hidrogênio, fosforoamidatos, fosfonatos de alquila ou arila e fosfotriésteres. O átomo de fósforo em um grupo fosfato não modificado é aquiral. No entanto, a substituição de um dos oxigênios não interligados por um dos átomos ou grupos de átomos acima pode gerar o átomo de fósforo quiral. O átomo de fósforo estereogênico pode ter a configuração “R” (no presente documento Rp) ou a configuração “S” (no presente documento Sp). A cadeia principal também pode ser modificada pela substituição de um oxigênio de interligação, (isto é, o oxigênio que liga o fosfato ao nucleosídeo), por nitrogênio (fosforoamidatos interligados), enxofre (fosforotioatos interligados) e carbono (metilenofosfonatos interligados). A substituição pode ocorrer no oxigênio ligante ou em ambos oxigênios ligantes.

[0100] O grupo fosfato pode ser substituído por conectores que não contêm fósforo em determinadas modificações de cadeia principal. Em algumas modalidades, o grupo fosfato carregado pode ser substituído por uma porção química neutra. Exemplos de porções químicas que podem substituir o grupo fosfato podem incluir, sem limitação, por exemplo, fosfonato de metila, hidroxilamino, siloxano, carbonato, carboximetila, carbamato, amida, tioéter, ligante de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenoimino, metilenometilimino, metileno-hidrazo, metilenodimetil-hidrazo e metileno-oximetilimino.

[0101] Arcabouços que podem imitar ácidos nucleicos também podem ser construídos, em que o ligante de fosfato e açúcar de ribose são substituídos por

substitutos de nucleosídeo ou nucleotídeo resistentes à nuclease. Tais modificações podem compreender modificações de cadeia principal e açúcar. Em algumas modalidades, as nucleobases podem ser pressas por uma cadeia principal substituta. Exemplos podem incluir, sem limitação, o morfolino, ciclobutila, pirrolidina e substitutos de nucleosídeo de ácido nucleico peptídico (PNA).

[0102] Os nucleosídeos modificados e nucleotídeos modificados podem incluir uma ou mais modificações no grupo açúcar, isto é, na modificação de açúcar. Por exemplo, o grupo 2’ hidroxila (OH) pode ser modificado, por exemplo substituído por diversos substituintes “oxi” ou “desóxi” diferentes. Em algumas modalidades, as modificações no grupo 2’ hidroxila podem intensificar a estabilidade do ácido nucleico desde que a hidroxila não possa mais ser desprotonada para formar um íon 2’-alcóxido.

[0103] Exemplos de modificações de grupo 2’ hidroxila podem incluir alcóxi ou arilóxi (OR, em que “R” pode ser, por exemplo, alquila, cicloalquila, arila, aralquila, heteroarila ou um açúcar); polietilenoglicóis (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$, em que R pode ser, por exemplo, H ou opcionalmente alquila substituída, e n pode ser um número inteiro de 0 a 20 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 8, de 0 a 10, de 0 a 16, de 1 a 4, de 1 a 8, de 1 a 10, de 1 a 16, de 1 a 20, de 2 a 4, de 2 a 8, de 2 a 10, de 2 a 16, de 2 a 20, de 4 a 8, de 4 a 10, de 4 a 16 e de 4 a 20). Em algumas modalidades, a modificação de grupo 2’ hidroxila pode ser 2’-O-Me. Em algumas modalidades, a modificação de grupo 2’ hidroxila pode ser uma modificação de 2’-fluoro, que substitui o grupo 2’ hidroxila por um fluoreto. Em algumas modalidades, a modificação de grupo 2’ hidroxila pode incluir ácidos nucleicos “travados” (LNA) nos quais a 2’ hidroxila pode ser conectada, por exemplo, por uma ponte de C_{1-6} alquileno ou C_{1-6} heteroalquileno, ao 4’-carbono do mesmo açúcar de ribose, em que pontes exemplificativas podem incluir pontes de metileno, propileno, éter ou amino; O-amino (em que amino pode ser, por exemplo, NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclila, arilamino, diarilamino, heteroarilamino ou di-heteroarilamino, etilenodiamina ou poliamino) e aminoalcóxi, $O(CH_2)$n-amino, (em que amino pode ser, por exemplo, NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclila, arilamino, diarilamino, heteroarilamino ou di-heteroarilamino, etilenodiamina ou poliamino). Em algumas modalidades, a

modificação de grupo 2’ hidroxila pode incluir ácidos nucleicos “destravados” (UNA) em que o anel de ribose carece da ligação C2’-C3’. Em algumas modalidades, a modificação de grupo 2’ hidroxila pode incluir o grupo metóxietila (MOE), ($OCH_2CH_2OCH_3$, por exemplo, um derivado de PEG).

[0104] Modificações de “desóxi” 2’ podem incluir hidrogênio (isto é, açúcares de desoxirribose, por exemplo, nas porções suspensas de dsRNA parciais); halo (por exemplo, bromo, cloro, fluoro, ou iodo); amino (em que amino pode ser, por exemplo, NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclila, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, di-heteroarilamino, ou aminoácido); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH2CH_2$-amino (em que amino pode ser, por exemplo, conforme descrito no presente documento), -NHC(O)R (em que R pode ser, por exemplo, alquila, cicloalquila, arila, aralquila, heteroarila ou açúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquila; tioalcóxi; e alquila, cicloalquila, arila, alquenila e alquinila, que podem ser opcionalmente substituídos por, por exemplo, um amino, conforme descrito no presente documento.

[0105] A modificação de açúcar pode compreender um grupo açúcar que também pode conter um ou mais carbonos que têm a configuração estereoquímica oposta àquela do carbono correspondente em ribose. Assim, um ácido nucleico modificado pode incluir nucleotídeos que contêm, por exemplo, arabinose, como o açúcar. Os ácidos nucleicos modificados também podem incluir açúcares abásicos. Esses açúcares abásicos também podem ser modificados adicionalmente em um ou mais dentre os átomos de açúcar constituintes. Os ácidos nucleicos modificados também podem incluir um ou mais açúcares que estão na forma L, por exemplo L-nucleosídeos.

[0106] Os nucleosídeos modificados e nucleotídeos modificados descritos no presente documento, que podem ser incorporados em um ácido nucleico modificado, podem incluir uma base modificada, também denominada uma nucleobase. Exemplos de nucleobases incluem, porém, sem limitação, adenina (A), guanina (G), citosina (C) e uracila (U). Essas nucleobases podem ser modificadas ou completamente substituídas para fornecer resíduos modificados que podem ser incorporados nos ácidos nucleicos modificados. A nucleobase do nucleotídeo pode ser independentemente selecionada dentre uma purina, uma pirimidina, um

análogo de purina ou análogo de pirimidina. Em algumas modalidades, a nucleobase pode incluir, por exemplo, derivados de ocorrência natural e sintéticos de uma base.

[0107] Em modalidades que empregam um RNA guia duplo, cada um dentre o crRNA e o tracrRNA pode conter modificações. Tais modificações podem ser em uma ou ambas extremidades do crRNA e/ou tracrRNA. Em modalidades que compreendem um sgRNA, um ou mais resíduos em uma ou ambas extremidades do sgRNA podem ser quimicamente modificados, e/ou nucleosídeos internos podem ser modificados, e/ou o sgRNA inteiro pode ser quimicamente modificado. Determinadas modalidades compreendem uma modificação de extremidade 5'. Determinadas modalidades compreendem uma modificação de extremidade 3'.

[0108] Em algumas modalidades, os RNAs guia divulgados no presente documento compreendem um dos padrões de modificação divulgados no documento nº WO2018/107028 A1, depositado em 8 de dezembro de 2017, intitulado "Chemically Modified Guide RNAs", cujo conteúdo está incorporado aqui a título de referência em sua totalidade. Em algumas modalidades, os RNAs guia divulgados no presente documento compreendem uma das estruturas/padrões de modificação divulgados no documento nº US20170114334, cujo conteúdo está incorporado aqui a título de referência em sua totalidade. Em algumas modalidades, os RNAs guia divulgados no presente documento compreendem uma das estruturas/padrões de modificação divulgados nos documentos nº WO2017/136794, WO2017004279, US2018187186, US2019048338, cujo conteúdo está incorporado aqui a título de referência em sua totalidade.

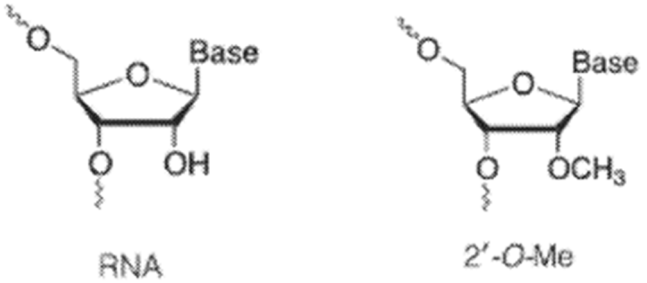
[0109] Em algumas modalidades, o sgRNA modificado compreende a seguinte sequência: mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 300), em que "N" pode ser qualquer nucleotídeo natural ou não natural, e em que a totalidade de Ns compreende uma sequência guia de íntron 1 de albumina, conforme descrito nas Tabelas 1,10 e 12; e sequências guia de

SERPINA1, conforme descrito na Tabela 2. Por exemplo, é engloba no presente documento a SEQ ID NO: 300, em que os Ns são substituídos por qualquer uma das sequências guia divulgadas no presente documento na Tabela 1 (SEQ ID NOs: 2-33) e/ou Tabela 2 (SEQ ID Nos: 1.000 a 1.128).

[0110] Qualquer uma das modificações descritas abaixo pode estar presente nos gRNAs e mRNAs descritos no presente documento.

[0111] Os termos “mA”, “mC”, “mU” ou “mG” podem ser usados para denotar um nucleotídeo que foi modificado por 2’-O-Me.

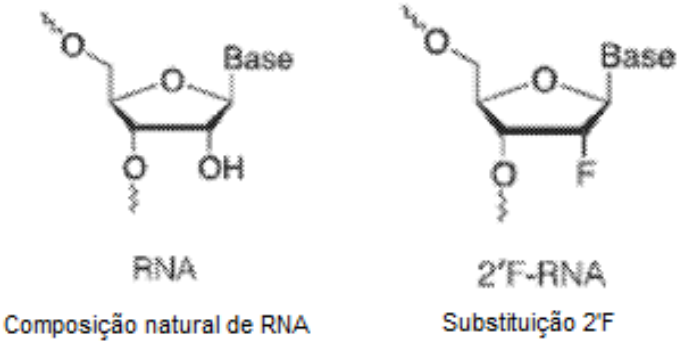
[0112] Modificação de 2’-O-metila pode ser representada como a seguir:



[0113] Outra modificação química que foi mostrada para influenciar anéis de açúcar de nucleotídeo é substituição de halogênio. Por exemplo, a substituição de 2’-fluoro (2’-F) nos anéis de açúcar de nucleotídeo podem aumentar afinidade de ligação de oligonucleotídeo e estabilidade de nuclease.

[0114] Neste pedido, os termos “fA”, “fC”, “fU” ou “fG” podem ser usados para denotar um nucleotídeo que foi substituído por 2’-F.

[0115] Substituição de 2’-F pode ser representada como a seguir:



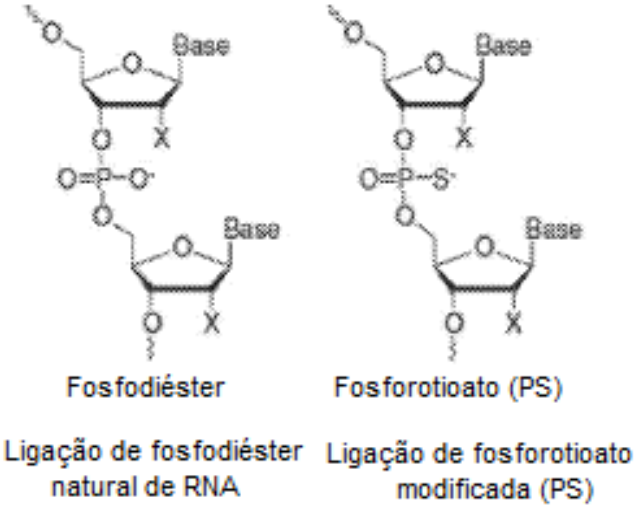
[0116] Interligação ou ligação de fosforotioato (PS) se refere a uma ligação em que um enxofre é substituído por um oxigênio de fosfato de não interligação em uma ligação fosfodiéster, por exemplo, nas ligações entre bases de nucleotídeos.

Quando fosforotioatos são usados para gerar oligonucleotídeos, os oligonucleotídeos modificados também podem ser denominados S-oligos.

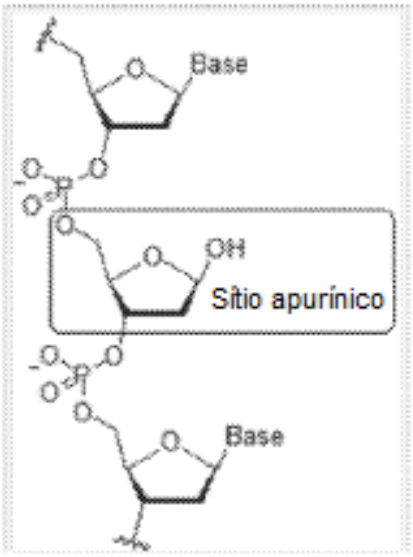
[0117] Um "*" pode ser usado para representar uma modificação de PS. Neste pedido, os termos A*, C*, U* ou G* podem ser usados para denotar um nucleotídeo que é ligado ao próximo (por exemplo, 3') nucleotídeo por uma ligação de PS.

[0118] Neste pedido, os termos "mA*", "mC*", "mU*" ou "mG*" podem ser usados para denotar um nucleotídeo que foi substituído por 2'-O-Me e que é ligado ao próximo (por exemplo, 3') nucleotídeo por uma ligação de PS.

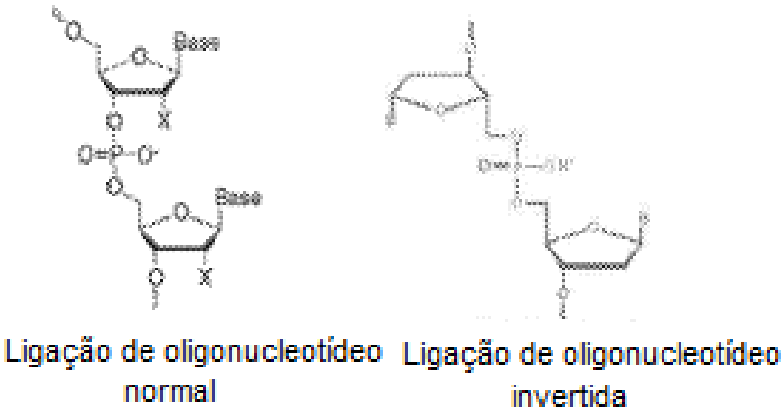
[0119] O diagrama abaixo mostra a substituição de S- em um oxigênio de fosfato de não interligação, que gera uma ligação de PS no lugar de uma ligação de fosfodiéster:



[0120] Nucleotídeos abásicos se referem àquelas que carecem de bases de nitrogenosas. A Figura abaixo representa um oligonucleotídeo com um sítio abásico (também conhecido como apurínico) que carece de uma base:



[0121] Bases invertidas se referem àquelas com ligações que são invertidas a partir da ligação de 5’ para 3’ normal (isto é, uma ligação de 5’ para 5’ ou uma ligação de 3’ para 3’). Por exemplo:



Ligação de oligonucleotídeo normal Ligação de oligonucleotídeo invertida

[0122] Um nucleotídeo abásico pode ser fixado a uma ligação invertida. Por exemplo, um nucleotídeo abásico pode ser fixado ao nucleotídeo de terminal 5’ por meio de uma ligação de 5’ para 5’, ou um nucleotídeo abásico pode ser fixado ao nucleotídeo de terminal 3’ por meio de uma ligação de 3’ para 3’. Um nucleotídeo abásico invertido no nucleotídeo de terminal 5’ ou 3’ também pode ser denominado um cap de extremidade abásica invertida.

[0123] Em algumas modalidades, um ou mais dentre os primeiros três, quatro ou cinco nucleotídeos no terminal 5’, e um ou mais dentre os últimos três, quatro ou cinco nucleotídeos no terminal 3’ são modificados. Em algumas

modalidades, a modificação é um 2’-O-Me, 2’-F, nucleotídeo abásico invertido, ligação de PS ou outra modificação de nucleotídeo bem conhecida na técnica para aumentar a estabilidade e/ou o desempenho.

[0124] Em algumas modalidades, os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5’ e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3’ são ligados às ligações de fosforotioato (PS).

[0125] Em algumas modalidades, os primeiros três nucleotídeos no terminal 5’, e os últimos três nucleotídeos no terminal 3’ compreendem um nucleotídeo modificado 2’-O-metila (2’-O-Me). Em algumas modalidades, os primeiros três nucleotídeos no terminal 5’, e os últimos três nucleotídeos no terminal 3’ compreendem um nucleotídeo modificado 2’-flúor (2’-F). Em algumas modalidades, os primeiros três nucleotídeos no terminal 5’, e os últimos três nucleotídeos no terminal 3’ compreendem um nucleotídeo abásico invertido.

[0126] Em algumas modalidades, qualquer um dos RNAs guia divulgados no presente documento compreende um sgRNA modificado. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende o padrão de modificação mostrado na SEQ ID NO: 200, em que N é qualquer nucleotídeo natural ou não natural, e em que a totalidade dos Ns compreende uma sequência guia (por exemplo, conforme mostrado na Tabela 1 ou Tabela 2) que direciona uma nuclease para uma sequência-alvo (por exemplo, em íntron de albumina humana 1 ou SERPINA1).

[0127] Conforme observado acima, em algumas modalidades, uma composição ou formulação divulgada no presente documento compreende um mRNA que compreende um quadro de leitura aberto (ORF) que codifica um agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma Cas nuclease, conforme descrito no presente documento. Em algumas modalidades, um mRNA que compreende um ORF que codifica um agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma Cas nuclease, é fornecido, usado ou administrado. Conforme descrito abaixo, o mRNA que compreende uma Cas nuclease pode compreender uma Cas9 nuclease, tal como uma Cas9 nuclease de S. pyogenes que tem clivase, nickase e/ou atividade de ligação de DNA de sítio específico. Em algumas modalidades, o ORF que codifica uma nuclease de DNA guiada por RNA é um “ORF de agente de ligação de DNA guiado por RNA modificado” ou simplesmente um “ORF

modificado” que é usado como abreviação para indicar que o ORF é modificado.

[0128] ORFs de Cas9, que incluem ORFs de Cas9 modificados, são fornecidos no presente documento e são conhecidos na técnica. Como um exemplo, o ORF de Cas9 pode ser de códon otimizado, de modo que a sequência de codificação inclua um ou mais códons alternativos para um ou mais aminoácidos. Um “códon alternativo”, conforme usado no presente documento, se refere às variações na utilização de códon para um dado aminoácido, e pode ou não ser um códon preferencial ou otimizado (códon otimizado) para um dado sistema de expressão. Uso de códon preferencial, ou códons que são bem tolerados em um dado sistema de expressão, é conhecido na técnica. As sequências codificantes de Cas9, mRNAs de Cas9 e sequências de proteínas de Cas9 dos documentos nº WO2013/176772, WO2014/065596, WO2016/106121 e WO2019/067910 são incorporadas aqui a título de referência. Em particular, os ORFs e sequências de aminoácido de Cas9 da tabela no parágrafo [0449] do documento WO2019/067910, e os mRNAs e ORFs de Cas9 dos parágrafos [0214] a [0234] do documento nº WO2019/067910 são incorporados aqui a título de referência.

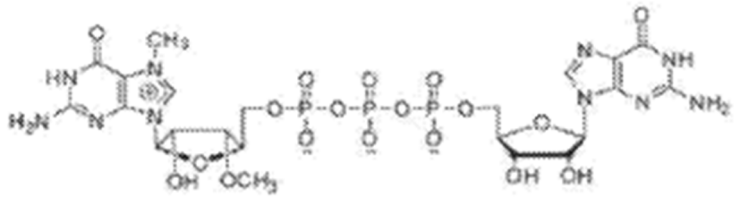
[0129] Em algumas modalidades, o ORF modificado pode compreender uma uridina modificada pelo menos em uma, em uma pluralidade de ou em todas as posições de uridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é uma uridina modificada na posição 5, por exemplo, com um halogênio, metila ou etila. Em algumas modalidades, a uridina modificada é uma pseudouridina modificada na posição 1, por exemplo, com um halogênio, metila ou etila. A uridina modificada pode ser, por exemplo, pseudouridina, N1-metil-pseudouridina, 5-metóxiuridina, 5-iodouridina ou uma combinação das mesmas. Em algumas modalidades, a uridina modificada é 5-metóxiuridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é 5-iodouridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é pseudouridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é N1-metil-pseudouridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é uma combinação de pseudouridina e N1-metil-pseudouridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é uma combinação de pseudouridina e 5-metóxiuridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é uma combinação de N1-metil-pseudouridina e 5-metóxiuridina. Em algumas

modalidades, a uridina modificada é uma combinação de 5-iodouridina e N1-metil-pseudouridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é uma combinação de pseudouridina e 5-iodouridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é uma combinação de 5-iodouridina e 5-metóxiuridina.

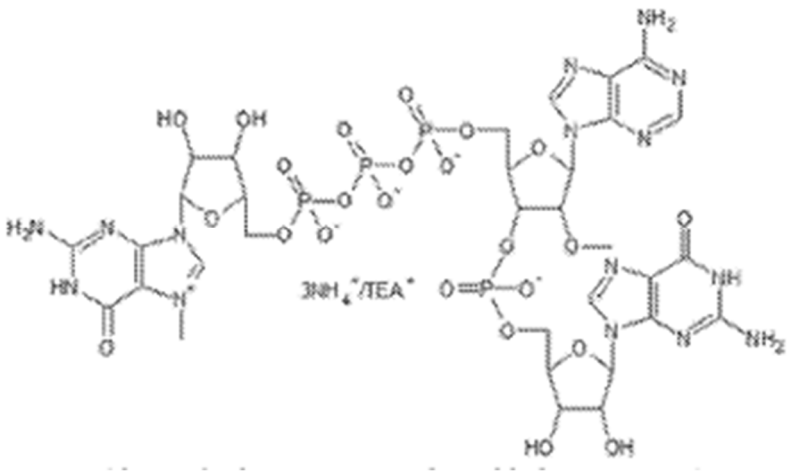
[0130] Em algumas modalidades, um mRNA divulgado no presente documento compreende um cap de 5', tal como um Cap0, Cap1 ou Cap2. Um cap de 5' é geralmente um ribonucleotídeo de 7-metilguanina (que pode ser modificado adicionalmente, conforme abordado abaixo, por exemplo, com relação ao ARCA) ligado através de um 5'-trifosfato à posição 5' do primeiro nucleotídeo da cadeia de 5' para 3' do mRNA, isto é, nucleotídeo próximo ao primeiro cap. Em Cap0, as riboses do primeiro e do segundo nucleotídeos próximos ao cap do mRNA compreendem ambas uma 2'-hidroxila. Em Cap1, as riboses do primeiro e do segundo nucleotídeos transcritos do mRNA compreendem um 2'-metóxi e uma 2'-hidroxila, respectivamente. Em Cap2, as riboses do primeiro e do segundo nucleotídeos próximos ao cap do mRNA compreendem ambas uma 2'-metóxi. Consultar, por exemplo, Katibah et al. (2014) Proc Natl Acad Sci USA 111(33):12.025 a 12.030; Abbas et al. (2017) Proc Natl Acad Sci USA 114(11):E2106 a E2115. A maioria dos mRNAs eucarióticos superiores endógenos, que incluem mRNAs de mamíferos, tais como mRNAs humanos, compreendem Cap1 ou Cap2. Cap0 e outras estruturas de cap que se diferem de Cap1 e Cap2 podem ser imunogênicos em mamíferos, tais como seres humanos, devido ao reconhecimento como "não próprio" pelos componentes do sistema imunológico inato, tal como IFIT-1 e IFIT-5, que pode resultar em níveis de citocina elevados que incluem interferon tipo I. Componentes do sistema imunológico inato, tais como IFIT-1 e IFIT-5 também podem competir com eIF4E pela ligação de um mRNA com um cap diferente de Cap1 ou Cap2, que inibe potencialmente a tradução do mRNA.

[0131] Um cap pode ser incluído cotranscricionalmente. Por exemplo, ARCA (análogo de cap antirreverso; Thermo Fisher Scientific nº de Cat. AM8045) é um análogo de cap que compreende um 3'-metoxi-5'-trifosfato de 7-metilguanina ligado à posição 5' de um ribonucleotídeo de guanina que pode ser incorporado *in vitro* em um transcrito no início. ARCA resulta em um cap Cap0 no qual a posição 2' do primeiro nucleotídeo próximo ao cap é hidroxila. Consultar, por exemplo,

Stepinski et al., (2001) “Synthesis and properties of mRNAs containing the novel’anti-reverse’ cap analogs 7-methyl(3’-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3’deoxy)GpppG”, RNA 7: 1486 a 1495. A estrutura de ARCA é mostrada abaixo.



[0132] CleanCap™ AG (m7G(5’)ppp(5’)(2’OMeA)pG; TriLink Biotechnologies nº de Cat. N-7113) ou CleanCap™ GG (m7G(5’)ppp(5’)(2’OMeG)pG; TriLink Biotechnologies nº de Cat. N-7133) pode ser usado para fornecer uma estrutura de Cap1 cotranscricionalmente. Versões 3’-O-metiladas de CleanCap™ AG e CleanCap™ GG também estão disponíveis a partir da TriLink Biotechnologies como nº de Cat. N-7413 e N-7433, respectivamente. A estrutura de CleanCap™ AG é mostrada abaixo.



[0133] Alternativamente, um cap pode ser adicionado a um RNA pós-transcricionalmente. Por exemplo, a enzima de cap de Vaccinia está comercialmente disponível (New England Biolabs nº de Cat. M2080S) e tem atividades de trifosfatase e guanililtransferase de RNA fornecidas por sua subunidade de D1, e guanina metiltransferase, fornecida por sua subunidade D12. Dessa forma, é possível adicionar uma 7-metilguanina em um RNA, de modo a gerar Cap0 na presença de S-adenosil metionina e GTP. Consultar, por exemplo, Guo, P. e Moss, B. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 87, 4.023 a 4.027; Mao, X.

e Shuman, S. (1994) J. Biol. Chem. 269, 24472 a 24479.

[0134] Em algumas modalidades, o mRNA compreende adicionalmente uma cauda poliadenilada (poli-A). Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende pelo menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 adeninas, opcionalmente até 300 adeninas. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 nucleotídeos de adenina.

D. CONSTRUTOS DOADORES

[0135] As composições e métodos descritos no presente documento incluem o uso de um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência que codifica um gene de AAT heteróloga (por exemplo, uma AAT funcional ou de tipo selvagem) a ser inserido em um sítio de corte criado por um RNA guia da presente divulgação e um agente de ligação de DNA guiado por RNA. Conforme usado no presente documento, tal construto é, por vezes, denominado um “construto doador/modelo”. Em algumas modalidades, o construto é um construto de DNA. Métodos para projetar e produzir várias modificações funcionais/estruturais em construtos doadores são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, o construto pode compreender qualquer uma ou mais dentre uma sequência de cauda de poliadenilação, uma sequência de sinal de poliadenilação, sítio de aceitante de splice ou marcador selecionável. Em algumas modalidades, a sequência de cauda de poliadenilação é codificada, por exemplo, como uma faixa “poli-A”, na extremidade 3’ da sequência de codificação. Métodos para projetar uma sequência de cauda de poliadenilação e/ou sequência de sinal de poliadenilação adequada são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, a sequência de sinal de poliadenilação AAUAAA (SEQ ID NO: 800) é normalmente usada em sistemas de mamífero, embora variantes, tais como UAUAAA (SEQ ID NO: 801) ou AU/GUAAA (SEQ ID NO: 802) tenham sido identificadas. Consultar, por exemplo, NJ Proudfoot, Genes & Dev. 25(17): 1770 a 1782, 2011.

[0136] O comprimento do construto pode variar, dependendo do tamanho do gene a ser inserido, e pode ser, por exemplo, de 200 pares de base (bp) a cerca de 5.000 bp, tal como cerca de 200 bp a cerca de 2.000 bp, tal como cerca de 500 bp a cerca de 1.500 bp. Em algumas modalidades, o comprimento do modelo doador de DNA é de cerca de 200 bp, ou é de cerca de 500 bp, ou é de cerca de

800 bp, ou é de cerca de 1.000 pares de base, ou é de cerca de 1.500 pares de base. Em outras modalidades, o comprimento do modelo doador é de pelo menos 200 bp, ou é de pelo menos 500 bp, ou é de pelo menos 800 bp, ou é de pelo menos 1.000 bp, ou é de pelo menos 1.500 bp, ou pelo menos 2.000, ou pelo menos 2.500, ou pelo menos 3.000, ou pelo menos 3.500, ou pelo menos 4.000, ou pelo menos 4.500, ou pelo menos 5.000.

[0137] O construto pode ser DNA ou RNA, de fita simples, fita dupla ou de fita parcialmente simples e parcialmente dupla e pode ser introduzido em uma célula hospedeira em forma linear ou circular (por exemplo, minicírculo). Consultar, por exemplo, as Publicações de Patente U.S. nº 2010/0047805, 2011/0281361, 2011/0207221. Caso introduzidas em forma linear, as extremidades da sequência doadora podem ser protegidas (por exemplo, de degradação exonucleolítica) por métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, um ou mais resíduos de didesoxinucleotídeo são adicionados ao terminal 3' de uma molécula linear e/ou oligonucleotídeos autocomplementares são ligados a uma ou ambas extremidades. Consultar, por exemplo, Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 84:4.959 a 4.963; Nehls et al. (1996) Science 272:886 a 889. Métodos adicionais para proteger polinucleotídeos exógenos da degradação incluem, porém, sem limitação, adição de grupo (ou grupos) amino terminal e o uso de ligações internucleotídeos modificadas, tais como, por exemplo, fosforotioatos, fosforamidatos, e resíduos de ribose de O-metila ou desoxirribose. Um construto pode ser introduzido em uma célula como parte de uma molécula de vetor que tem sequências adicionais, tais como, por exemplo, origens de replicação, promotores e genes que codificam resistência antibiótica. Um construto pode omitir elementos virais. Além disso, construtos doadores podem ser introduzidos como ácido nucleico nu, como ácido nucleico complexado com um agente, tal como um lipossoma ou poloxâmero, ou podem ser entregues por vírus (por exemplo, adenovírus, AAV, herpesvírus, retrovírus, lentivírus).

[0138] Em algumas modalidades, o construto pode ser inserido de modo que sua expressão seja acionada pelo promotor endógeno no sítio de inserção (por exemplo, o promotor de albumina endógena quando o doador é integrado no lócus de albumina da célula hospedeira). Em tais casos, o transgene pode carecer de

elementos de controle (por exemplo, promotor e/ou intensificador) que acionam sua expressão (por exemplo, um construto sem promotor). Não obstante, será aparente que, em outros casos, o construto pode compreender um promotor e/ou intensificador, por exemplo, um promotor constitutivo ou um promotor induzível ou de tecido específico (por exemplo, específico para fígado ou plaqueta) que aciona expressão da proteína funcional mediante integração. O construto pode compreender uma sequência que codifica uma proteína AAT heteróloga a jusante de uma sequência de sinal que codifica um peptídeo de sinal e operacionalmente ligada à mesma. Em algumas modalidades, o peptídeo de sinal é um peptídeo de sinal de uma proteína secretada por hepatócito. Em algumas modalidades, o peptídeo de sinal é um peptídeo de sinal de AAT. Em algumas modalidades, o peptídeo de sinal é um peptídeo de sinal de albumina. Em algumas modalidades, o peptídeo de sinal é um peptídeo de sinal de Fator IX. O construto pode compreender uma sequência que codifica uma proteína AAT heteróloga a jusante de uma sequência de sinal que codifica um peptídeo de sinal de AAT, por exemplo SEQ ID NO: 700. O construto pode compreender uma sequência que codifica uma proteína AAT heteróloga a jusante de uma sequência de sinal que codifica um peptídeo de sinal heterólogo e operacionalmente ligada à mesma. Em várias modalidades, os métodos compreendem uma sequência que codifica uma proteína AAT heteróloga a jusante de e operacionalmente ligada a uma sequência de sinal que codifica um peptídeo de sinal de albumina (SEQ ID NO: 2000). Em algumas modalidades, o construto de ácido nucleico funciona na inserção independente de homologia de um ácido nucleico que codifica uma proteína AAT. Em algumas modalidades, o construto de ácido nucleico funciona em células sem divisão, por exemplo, células nas quais nem NHEJ, nem HR, são o mecanismo primário pelo qual a quebra de DNA de fita dupla é reparada. O ácido nucleico pode ser um construto doador independente de homologia.

[0139] Em algumas modalidades, o construto doador compreende um gene de AAT heteróloga que codifica uma proteína AAT funcional. Em algumas modalidades, a proteína AAT funcional é uma sequência de proteína AAT de tipo selvagem humana de acordo com a SEQ ID NO: 700. Em algumas modalidades, a proteína AAT funcional é uma sequência de proteína AAT de tipo selvagem humana

de acordo com a SEQ ID NO: 702. O ácido nucleico que codifica AAT também foi exemplificado e divulgado no presente documento. Em algumas modalidades, o construto compreende um gene de AAT heteróloga que codifica uma variante funcional de AAT, por exemplo, uma variante que possui atividade inibidora de protease aumentada em comparação com AAT de tipo selvagem. Em algumas modalidades, o construto compreende um gene de AAT heteróloga que codifica uma variante funcional é 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% idêntica à SEQ ID NO: 700, que tem uma atividade funcional que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100%, ou mais de atividade em comparação com AAT de tipo selvagem. Em algumas modalidades, o construto compreende um gene de AAT heteróloga que codifica uma variante funcional é 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% idêntica à SEQ ID NO: 702, que tem uma atividade funcional que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% ou mais de atividade em comparação com AAT de tipo selvagem. Em algumas modalidades, o construto compreende um gene de AAT heteróloga que codifica um fragmento de proteína AAT que possui atividade funcional que é pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100%, ou mais de atividade em comparação com AAT de tipo selvagem.

[0140] Também são descritos no presente documento construtos de ácido nucleico bidirecionais que permitem inserção e expressão intensificada de um gene de AAT heteróloga. Brevemente, vários construtos bidirecionais divulgados no presente documento compreendem pelo menos dois segmentos de ácido nucleico, em que um segmento (o primeiro segmento) compreende uma sequência de codificação que codifica AAT heteróloga (por vezes intercambiavelmente denominado no presente documento “transgene”), embora o outro segmento (o segundo segmento) compreenda uma sequência em que o complemento da sequência codifica uma AAT heteróloga. Os construtos bidirecionais podem compreender pelo menos dois segmentos de ácido nucleico em cis, em que um segmento (o primeiro segmento) compreende uma sequência de codificação que codifica uma AAT heteróloga em uma orientação, embora o outro segmento (o segundo segmento) compreenda uma sequência em que seu complemento codifica uma AAT heteróloga na outra orientação. Isto é, o primeiro segmento é um

complemento do segundo segmento (não necessariamente um complemento perfeito); o complemento do segundo segmento é o complemento reverso do primeiro segmento (não necessariamente um complemento reverso perfeito enquanto ambos codifiquem uma AAT heteróloga). Um construto bidirecional pode compreender uma primeira sequência de codificação que codifica um AAT heteróloga ligado a um aceitante de splice e uma segunda sequência de codificação, em que o complemento codifica uma AAT heterólogo na outra orientação, também ligado a um aceitante de splice. Quando usado em combinação com um sistema de edição de gene (por exemplo, sistema de CRISPR/Cas; sistema de nuclease de dedo de zinco (ZFN); sistema de nuclease efetora semelhante ao ativador de transcrição (TALEN)) conforme descrito no presente documento, a bidirecionalidade dos construtos de ácido nucleico permite que o construto seja inserido em qualquer direção (não é limitada à inserção em uma direção) dentro de um sítio de inserção-alvo, que permite a expressão de AAT heteróloga de a) uma sequência de codificação de um segmento (por exemplo, o segmento esquerdo que codifica ”GFP” do construto de ssAAV esquerdo superior da Figura 1), ou 2) um complemento do outro segmento (por exemplo, o complemento do segmento direito que codifica “GFP” indicado de cabeça para baixo no construto de ssAAV esquerdo superior da Figura 1), desse modo se intensifica a eficiência de inserção e expressão, conforme exemplificado no presente documento. Vários sistemas de edição de gene conhecidos podem ser usados na prática da presente divulgação, que incluem, por exemplo, sistema de CRISPR/Cas; sistema de nuclease de dedo de zinco (ZFN); sistema de nuclease efetora semelhante ao ativador de transcrição (TALEN).

[0141] Os construtos bidirecionais divulgados no presente documento podem ser modificados para incluir qualquer recurso estrutural adequado conforme necessário para qualquer uso particular e/ou que confere uma ou mais funções desejadas. Em algumas modalidades, o construto de ácido nucleico bidirecional divulgado no presente documento não compreende um braço de homologia. Em algumas modalidades, o construto de ácido nucleico bidirecional divulgado no presente documento é um construto doador independente de homologia. Em algumas modalidades, devido, em parte, à função bidirecional do construto de ácido

nucleico, o construto bidirecional pode ser inserido em um lócus genômico em qualquer direção (orientação), conforme descrito no presente documento, para permitir inserção e/ou expressão eficiente de um polipeptídeo de interesse (por exemplo, uma AAT heteróloga).

[0142] Em algumas modalidades, o construto de ácido nucleico bidirecional não compreende um promotor que aciona a expressão de um gene de AAT heteróloga. Por exemplo, a expressão do polipeptídeo é acionada por um promotor da célula hospedeira (por exemplo, o promotor de albumina endógena quando o transgene é integrado em um lócus de albumina da célula hospedeira). Em algumas modalidades, o construto de ácido nucleico bidirecional inclui um primeiro segmento e um segundo segmento, sendo que cada um tem um aceitante de splice a montante de um transgene. Em determinadas modalidades, o aceitante de splice é compatível com a sequência doadora de splice do sítio de porto seguro da célula hospedeira, por exemplo, o doador de splice de íntron 1 de um gene de albumina humana.

[0143] Em algumas modalidades, o construto de ácido nucleico bidirecional compreende um primeiro segmento que compreende uma sequência de codificação para a AAT heteróloga e um segundo segmento que compreende um complemento reverso de uma sequência de codificação de AAT heteróloga. Assim, a sequência de codificação no primeiro segmento tem capacidade para expressar AAT heteróloga, embora o complemento do complemento reverso no segundo segmento também tem capacidade para expressar AAT heteróloga. Conforme usado no presente documento, “sequência de codificação” ao se referir ao segundo segmento que compreende uma sequência de complemento reverso se refere à fita complementar (codificação) do segundo segmento (isto é, a sequência de codificação de complemento da sequência de complemento reverso no segundo segmento).

[0144] Em algumas modalidades, a sequência de codificação que codifica AAT heteróloga no primeiro segmento é menor que 100% complementar ao complemento reverso de uma sequência de codificação que também codifica AAT heteróloga. Isto é, em algumas modalidades, o primeiro segmento compreende uma sequência de codificação (1) para AAT heteróloga, e o segundo segmento é

um complemento reverso de uma sequência de codificação (2) para AAT heteróloga, em que a sequência de codificação (1) não é idêntica à sequência de codificação (2). Por exemplo, a sequência de codificação (1) e/ou a sequência de codificação (2) que codifica o AAT heteróloga pode ser códon otimizado, de modo que a sequência de codificação (1) e o complemento reverso de sequência de codificação (2) tenham menos que 100% complementaridade. Em algumas modalidades, a sequência de codificação do segundo segmento codifica o AAT heteróloga com o uso de um ou mais códons alternativos para um ou mais aminoácidos da mesma (isto é, mesma sequência de aminoácidos) AAT heteróloga codificada pela sequência de codificação no primeiro segmento. Um “códon alternativo”, conforme usado no presente documento, se refere às variações na utilização de códon para um dado aminoácido, e pode ou não ser um códon preferencial ou otimizado (códon otimizado) para um dado sistema de expressão. Uso de códon preferencial, ou códons que são bem tolerados em um dado sistema de expressão, é conhecido na técnica.

[0145] Em algumas modalidades, o segundo segmento compreende uma sequência de complemento reverso que adota uso de códon diferente daquele da sequência de codificação do primeiro segmento de modo a reduzir formação de grampo. Tal complemento reverso forma pares de base com menos do que todos os nucleotídeos da sequência de codificação no primeiro segmento, porém, ainda codifica, opcionalmente, o mesmo polipeptídeo. Em tais casos, a sequência de codificação, por exemplo, para o Polipeptídeo A, do primeiro segmento pode ser homóloga, porém, não idêntica à sequência de codificação, por exemplo, para o Polipeptídeo A da segunda metade do construto bidirecional. Em algumas modalidades, o segundo segmento compreende uma sequência de complemento reverso que não é substancialmente complementar (por exemplo, não mais que 70% complementar) à sequência de codificação no primeiro segmento. Em algumas modalidades, o segundo segmento compreende uma sequência de complemento reverso que é altamente complementar (por exemplo, pelo menos 90% complementar) à sequência de codificação no primeiro segmento. Em algumas modalidades, o segundo segmento compreende uma sequência de complemento reverso que tem pelo menos cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de

40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97% ou cerca de 99% de complementaridade com a sequência de codificação no primeiro segmento.

[0146] Em algumas modalidades, o segundo segmento compreende uma sequência de complemento reverso que tem 100% de complementaridade com a sequência de codificação no primeiro segmento. Isto é, a sequência no segundo segmento é um complemento reverso perfeito da sequência de codificação no primeiro segmento. A título de exemplo, o primeiro segmento compreende uma sequência hipotética 5' CTGGACCGA 3' (SEQ ID NO: 500) e o segundo segmento compreende o complemento reverso da SEQ ID NO: 500 - isto é, 5' TCGGTCCAG 3' (SEQ ID NO: 502).

[0147] Em algumas modalidades, o construto de ácido nucleico bidirecional compreende um primeiro segmento que compreende uma sequência de codificação para um polipeptídeo ou agente (por exemplo, um primeiro polipeptídeo) e um segundo segmento que compreende um complemento reverso de uma sequência de codificação de um polipeptídeo ou agente (por exemplo, um segundo polipeptídeo). Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo são iguais, conforme descrito acima. Em algumas modalidades, o primeiro agente terapêutico e o segundo agente terapêutico são iguais, conforme descrito acima. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo e o segundo polipeptídeo são diferentes. Em algumas modalidades, o primeiro agente terapêutico e o segundo agente terapêutico são diferentes. Por exemplo, o primeiro polipeptídeo é Polipeptídeo A e o segundo polipeptídeo é Polipeptídeo B. Como um exemplo adicional, o primeiro polipeptídeo é Polipeptídeo A e o segundo polipeptídeo é uma variante (por exemplo, um fragmento (como um fragmento funcional), mutante, fusão (incluindo a adição de um mínimo de um aminoácido em um terminal de polipeptídeo), ou combinações dos mesmos) de Polipeptídeo A.

[0148] Uma sequência de codificação que codifica um polipeptídeo pode compreender, opcionalmente, uma ou mais sequências adicionais, tais como sequências que codificam sequências de aminoácidos de terminal amino ou carbóxi, tal como uma sequência de sinal, sequência de marcação ou sequência

funcional heteróloga (por exemplo, sequência de localização nuclear (NLS)) ligada ao polipeptídeo. Uma sequência de codificação que codifica um polipeptídeo pode compreender, opcionalmente, sequências que codificam uma ou mais sequências de peptídeo de sinal de terminal amino. Cada uma dessas sequências adicionais pode ser igual ou diferente no primeiro segmento e no segundo segmento do construto.

[0149] O construto bidirecional descrito no presente documento pode ser usado para expressar AAT conforme descrito no presente documento.

[0150] Em algumas modalidades, o construto de ácido nucleico bidirecional é linear. Por exemplo, o primeiro e o segundo segmentos são unidos de uma maneira linear através de uma sequência de ligante. Em algumas modalidades, a extremidade 5' do segundo segmento que compreende uma sequência de complemento reverso é ligada à extremidade 3' do primeiro segmento. Em algumas modalidades, a extremidade 5' do primeiro segmento é ligada à extremidade 3' do segundo segmento que compreende uma sequência de complemento reverso. Em algumas modalidades, a sequência de ligante tem cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1.000, 1.500, 2.000 ou mais nucleotídeos em comprimento. Conforme seria reconhecido por aqueles versados na técnica, outros elementos estruturais adicionais a uma sequência de ligante ou no lugar da mesma, podem ser inseridos entre o primeiro e o segundo segmentos.

[0151] Os construtos divulgados no presente documento podem ser modificados para incluir qualquer recurso estrutural adequado conforme necessário para qualquer uso particular e/ou que confere uma ou mais funções desejadas. Em algumas modalidades, o construto de ácido nucleico bidirecional divulgado no presente documento não compreende um braço de homologia. Em algumas modalidades, devido, em parte, à função bidirecional do construto de ácido nucleico, o construto bidirecional pode ser inserido em um lócus genômico em qualquer direção, conforme descrito no presente documento, para permitir inserção e/ou expressão eficiente de um polipeptídeo de interesse.

[0152] Em algumas modalidades, um ou ambos dentre o primeiro e o segundo segmentos compreendem uma sequência de cauda de poliadenilação

e/ou uma sequência de sinal de poliadenilação a jusante de um quadro de leitura aberto. Em algumas modalidades, a sequência de cauda de poliadenilação é codificada, por exemplo, como uma faixa “poli-A”, na extremidade 3’ do primeiro e/ou do segundo segmento. Em algumas modalidades, uma sequência de cauda de poliadenilação é fornecida cotranscricionalmente como um resultado de uma sequência de sinal de poliadenilação que é codificada na extremidade 3’ ou próxima à mesma, do primeiro e/ou do segundo segmento. Métodos para projetar uma sequência de cauda de poliadenilação e/ou sequência de sinal de poliadenilação adequada são bem conhecidos na técnica. Sequências de aceitante de splice adequadas são divulgadas e exemplificadas no presente documento, que incluem sítios de aceitante de splice de albumina de camundongo e FIX humano. Em algumas modalidades, a sequência de sinal de poliadenilação AAUAAA (SEQ ID NO: 800) é normalmente usada em sistemas de mamífero, embora variantes, tais como UAUAAA (SEQ ID NO: 801) ou AU/GUAAA (SEQ ID NO: 802) tenham sido identificadas. Consultar, por exemplo, NJ Proudfoot, Genes & Dev. 25(17):1.770 a 1.782, 2011. Em algumas modalidades, uma sequência de cauda poliA é incluída.

[0153] Em algumas modalidades, os construtos divulgados no presente documento podem ser DNA ou RNA, de fita simples, de fita dupla ou de fita parcialmente simples e parcialmente dupla. Por exemplo, os construtos podem ser DNA de fita simples ou dupla. Em algumas modalidades, o ácido nucleico pode ser modificado (por exemplo, com o uso de análogos de nucleosídeo), conforme descrito no presente documento.

[0154] Em algumas modalidades, os construtos divulgados no presente documento compreendem um sítio de aceitante de splice em qualquer uma das ou ambas as extremidades do construto, por exemplo, 5’ de um quadro de leitura aberto no primeiro e/ou no segundo segmentos, ou 5’ de uma ou ambas as sequências de transgene. Em algumas modalidades, o sítio de aceitante de splice compreende NAG. Em modalidades adicionais, o sítio de aceitante de splice consiste em NAG. Em algumas modalidades, o aceitante de splice é um aceitante de splice de albumina, por exemplo, um aceitante de splice de albumina usado no splicing em conjunto de éxons 1 e 2 de albumina. Em algumas modalidades, o aceitante de splice é derivado do gene de albumina humana. Em algumas

modalidades, o aceitante de splice é derivado do gene de albumina de camundongo. Em algumas modalidades, o aceitante de splice é um aceitante de splice de albumina de camundongo, por exemplo, o aceitante de splice de albumina de camundongo usado no splicing em conjunto de éxons 1 e 2 de albumina. Em algumas modalidades, o aceitante de splice é derivado do gene de albumina humana. Sítios de aceitante de splice adequados adicionais úteis em eucariontes, que incluem aceitantes de splice artificiais, são conhecidos e podem ser derivados da técnica. Consultar, por exemplo, Shapiro, et al., 1987, Nucleic Acids Res., 15, 7.155 a 7.174, Burset, et al, 2001, Nucleic Acids Res., 29, 255 a 259.

[0155] Em algumas modalidades, os construtos divulgados no presente documento podem ser modificados em qualquer uma ou ambas as extremidades para incluir um ou mais recursos estruturais adequados conforme necessário, e/ou para conferir um ou mais benefícios funcionais. Por exemplo, modificações estruturais podem variar dependendo do método (ou métodos) usado para entregar os construtos divulgados no presente documento a uma célula hospedeira - por exemplo, uso de entrega de vetor viral ou acondicionamento em nanopartículas lipídicas para entrega. Tais modificações incluem, sem limitação, por exemplo, estruturas de terminal, tais como estruturas de repetições de terminal invertidas (ITR), grampo, laços e outras, tais como toroide. Em algumas modalidades, os construtos divulgados no presente documento compreendem uma, duas ou três ITRs. Em algumas modalidades, os construtos divulgados no presente documento compreendem não mais que duas ITRs. Vários métodos de modificações estruturais são conhecidos na técnica.

[0156] Em algumas modalidades, uma ou ambas as extremidades do construto podem ser protegidas (por exemplo, da degradação exonucleolítica) através de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, um ou mais resíduos de didesoxinucleotídeo são adicionados ao terminal 3’ de uma molécula linear e/ou oligonucleotídeos autocomplementares são ligados a uma ou ambas extremidades. Consultar, por exemplo, Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 84:4.959 a 4.963; Nehls et al. (1996) Science 272:886 a 889. Métodos adicionais para proteger os construtos da degradação incluem, porém, sem limitação, adição de grupo (ou grupos) amino terminal e o uso de ligações internucleotídeos

modificadas, tais como, por exemplo, fosforotioatos, fosforamidatos, e resíduos de ribose de O-metila ou desoxirribose.

[0157] Em algumas modalidades, os construtos divulgados no presente documento podem ser introduzidos em uma célula como parte de um vetor que tem sequências adicionais, tais como, por exemplo, origens de replicação, promotores e genes que codificam resistência antibiótica. Em algumas modalidades, os construtos podem ser introduzidos como ácido nucleico nu, como ácido nucleico complexado com um agente, tal como um lipossoma, polímero ou poloxâmero, ou podem ser entregues por vetores virais (por exemplo, adenovírus, AAV, herpesvírus, retrovírus, lentivírus).

[0158] Em algumas modalidades, embora não sejam necessários para a expressão, os construtos divulgados no presente documento também podem incluir sequências reguladoras transcricionais ou translacionais, por exemplo, promotores, intensificadores, isolantes, sítios de entrada de ribossomo internos, sequências que codificam peptídeos e/ou sinais de poliadenilação.

[0159] Em algumas modalidades, os construtos que compreendem uma sequência de codificação para um polipeptídeo de interesse podem incluir uma ou mais dentre as seguintes modificações: otimização de códon (por exemplo, para códons humanos) e/ou adição de um ou mais sítios de glicosilação. Consultar, por exemplo, McIntosh et al. (2013) Blood (17):3.335 a 3.344.

E. SISTEMA DE EDIÇÃO DE GENE

[0160] Vários sistemas de edição de gene conhecidos podem ser usados para a inserção alvejada de um gene de AAT heteróloga na prática da presente divulgação, que incluem, por exemplo, sistema de CRISPR/Cas; sistema de nuclease de dedo de zinco (ZFN); e sistema de nuclease efetora semelhante ao ativador de transcrição (TALEN). Geralmente, os sistemas de edição de gene envolvem o uso de sistemas de clivagem modificados geneticamente para induzir uma quebra de fita dupla (DSB) ou um corte (por exemplo, uma quebra de fita simples, ou SSB) em uma sequência de DNA-alvo. Clivagem ou corte pode ocorrer através do uso de nucleases específicas, tais como ZFN modificada geneticamente, TALENs ou com o uso do sistema de CRISPR/Cas com um RNA guia modificado geneticamente para guiar clivagem ou corte específico de uma sequência de DNA-

alvo. Adicionalmente, nucleases alvejadas têm sido, e nucleases adicionais são, por exemplo desenvolvidas com base no sistema Argonauta (por exemplo, de T. thermophilus, conhecido como 'TtAgo', consultar Swarts et al (2014) Nature 507(7491): 258 a 261), que também pode ter o potencial para usos em edição de genoma e terapia de gene.

[0161] Será reconhecido que, para os métodos que usam os RNAs guia para uma Cas nuclease, como uma Cas9 nuclease divulgada no presente documento, os métodos incluem o uso do sistema de CRISPR/Cas (e qualquer construto doador divulgado no presente documento que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga). Também será verificado que a presente divulgação contempla métodos de inserção alvejada e expressão de uma AAT heteróloga com o uso dos construtos bidirecionais divulgados no presente documento, que podem ser realizados com ou sem os RNAs guia de albumina divulgados no presente documento (por exemplo, com o uso de um sistema de ZFN para causar uma quebra em uma sequência de DNA-alvo, que cria um sítio para inserção do construto bidirecional).

[0162] Em algumas modalidades, um sistema de CRISPR/Cas (por exemplo, um RNA guia e agente de ligação de DNA guiado por RNA) pode ser usado para criar um sítio de inserção em um lócus desejado dentro de um genoma hospedeiro, nesse sítio um construto doador (por exemplo, construto bidirecional) que compreende uma sequência que codifica a AAT heteróloga divulgada no presente documento pode ser inserido para expressar a AAT heteróloga. Em algumas modalidades, a AAT heteróloga transgene pode ser heteróloga com relação a seu sítio de inserção, por exemplo inserida em um lócus de porto seguro, conforme descrito no presente documento. Em algumas modalidades, um RNA guia descrito no presente documento (SEQ ID NO: 2 a 33) que alveja um lócus de albumina humana (por exemplo, íntron 1) pode ser usado de acordo com os presentes métodos com um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, Cas nuclease) para criar um sítio de inserção, nesse sítio um construto doador (por exemplo, construto bidirecional) que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga pode ser inserido para expressar uma AAT heteróloga. Os RNAs guia que compreendem sequências guia para inserção

alvejada de um gene de AAT heteróloga no íntron 1 do lócus de albumina humana são exemplificados e descritos no presente documento (consultar, por exemplo, a Tabela 1).

[0163] Métodos para usar vários agentes de ligação de DNA guiados por RNA, por exemplo, uma nuclease, tal como uma Cas nuclease, por exemplo, Cas9, também são bem conhecidos na técnica. Será reconhecido que, dependendo do contexto, o agente de ligação de DNA guiado por RNA pode ser fornecido como um ácido nucleico (por exemplo, DNA ou mRNA) ou como uma proteína. Em algumas modalidades, o presente método pode ser praticado em uma célula hospedeira que já expressa um agente de ligação de DNA guiado por RNA.

[0164] Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma Cas9 nuclease, tem atividade de clivase, que também pode ser denominada atividade de endonuclease de fita dupla. Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma Cas9 nuclease, tem atividade de nickase, que também pode ser denominada atividade de endonuclease de fita simples. Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA compreende uma Cas nuclease. Exemplos de Cas9 nucleases incluem aqueles dos sistemas de CRISPR de tipo II de S. pyogenes, S. aureus e outros procariontes (consultar, por exemplo, a lista no próximo parágrafo) e versões mutantes (por exemplo, manipulado ou outra variante) das mesmas. Consultar, por exemplo, documentos nº US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1.

[0165] Espécies exemplificativas sem limitação das quais a Cas nuclease pode ser derivada incluem Streptococcus pyogenes, Streptococcus thermophilus, Streptococcus sp., Staphylococcus aureus, Listeria innocua, Lactobacillus gasseri, Francisella novicida, Wolinella succinogenes, Sutterella wadsworthensis, Gammaproteobacterium, Neisseria meningitidis, Campylobacter jejuni, Pasteurella multocida, Fibrobacter succinogene, Rhodospirillum rubrum, Nocardiopsis dassonvillei, Streptomyces pristinaespiralis, Streptomyces viridochromogenes, Streptomyces viridochromogenes, Streptosporangium roseum, Streptosporangium roseum, Alicyclobacillus acidocaldarius, Bacillus pseudomycoides, Bacillus selenitireducens, Exiguobacterium sibiricum, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus buchneri, Treponema denticola, Microscilla

marina, Burkholderiales bacterium, Polaromonas naphthalenivorans, Polaromonas sp., Crocosphaera watsonii, Cyanothece sp., Microcystis aeruginosa, Synechococcus sp., Acetohalobium arabaticum, Ammonifex degensii, Caldicelulosiruptor becscii, Candidatus Desulforudis, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Finegoldia magna, Natranaerobius thermophilus, Pelotomaculum thermopropionicum, Acidithiobacillus caldus, Acidithiobacillus fierrooxidans, Allochromatium vinosum, Marinobacter sp., Nitrosococcus halophilus, Nitrosococcus watsoni, Pseudoalteromonas haloplanktis, Ktedonobacter racemifer, Methanohalobium evestigatum, Anabaena variabilis, Nodularia spumigena, Nostoc sp., Arthrospira maxima, Arthrospira platensis, Arthrospira sp., Lyngbya sp., Microcoleus chthonoplastes, Oscillatoria sp., Petrotoga mobilis, Thermosipho africanus, Streptococcus pasteurianus, Neisseria cinerea, Campylobacter lari, Parvibaculum lavamentivorans, Corynebacterium diphtheria, Acidaminococcus sp., Lachnospiraceae bacterium ND2006, e Acaryochloris marina.

[0166] Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cas9 nuclease de Streptococcus pyogenes. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cas9 nuclease de Streptococcus thermophilus. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cas9 nuclease de Neisseria meningitidis. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cas9 nuclease de Staphylococcus aureus. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cpf1 nuclease de Francisella novicida. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cpf1 nuclease de Acidaminococcus sp. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cpf1 nuclease de Lachnospiraceae bacterium ND2006. Em modalidades adicionais, a Cas nuclease é a Cpf1 nuclease de Francisella tularensis, Lachnospiraceae bacterium, Butyrivibrio proteoclasticus, Peregrinibacteria bacterium, Parcubacteria bacterium, Smithella, Acidaminococcus, Candidatus Methanoplasma termitum, Eubacterium eligens, Moraxella bovoculi, Leptospira inadai, Porphyromonas crevioricanis, Prevotella disiens ou Porphyromonas macacae. Em determinadas modalidades, a Cas nuclease é uma Cpf1 nuclease de um Acidaminococcus ou Lachnospiraceae.

[0167] Em algumas modalidades, o gRNA juntamente com um agente de ligação de DNA guiado por RNA é denominado um complexo de ribonucleoproteína

(RNP). Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA é uma Cas nuclease. Em algumas modalidades, o gRNA juntamente com uma Cas nuclease é denominado uma RNP de Cas. Em algumas modalidades, a RNP compreende componentes de Tipo I, Tipo II ou Tipo III. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a proteína Cas9 do sistema de CRISPR/Cas de Tipo II. Em algumas modalidades, o gRNA juntamente com Cas9 é denominado uma RNP de Cas9.

[0168] Cas9 de tipo selvagem tem dois domínios de nuclease: RuvC e HNH. O domínio RuvC cliva a fita de DNA não-alvo, e o domínio HNH cliva a fita-alvo de DNA. Em algumas modalidades, a proteína de Cas9 compreende mais que um domínio RuvC e/ou mais que um domínio HNH. Em algumas modalidades, a proteína Cas9 é uma Cas9 de tipo selvagem. Em cada uma das modalidades de composição, uso e método, a Cas induz uma quebra de fita dupla no DNA-alvo.

[0169] Em algumas modalidades, Cas nucleases quiméricas são usadas, quando um domínio ou região da proteína é substituído por uma porção de uma proteína diferente. Em algumas modalidades, um domínio de Cas nuclease pode ser substituído por um domínio de uma nuclease diferente, tal como Fok1. Em algumas modalidades, uma Cas nuclease pode ser uma nuclease modificada.

[0170] Em outras modalidades, a Cas nuclease pode ser de um sistema de CRISPR/Cas de Tipo I. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ser um componente do complexo em Cascata de um sistema de CRISPR/Cas de Tipo I. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ser uma proteína Cas3. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ser de um sistema de CRISPR/Cas de Tipo III. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ter uma atividade de clivagem de RNA.

[0171] Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA tem atividade de nickase de fita simples, isto é, pode cortar uma fita de DNA para produzir uma quebra de fita simples, também conhecida como um “corte”. Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA compreende uma Cas nickase. Uma nickase é uma enzima que cria um corte em dsDNA, isto é, corta uma fita, porém, não a outra da hélice dupla de DNA. Em algumas modalidades, uma Cas nickase é uma versão de uma Cas nuclease (por exemplo,

uma Cas nuclease abordada acima) na qual um sítio ativo endonucleolítico é inativado, por exemplo, através de uma ou mais alterações (por exemplo, mutações pontuais) em um domínio catalítico. Consultar, por exemplo, o documento de Patente nº U.S. 8.889.356 para a discussão de Cas nickases e alterações de domínio catalítico exemplificativo. Em algumas modalidades, uma Cas nickase, tal como uma Cas9 nickase tem um domínio RuvC ou HNH inativado.

[0172] Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA é modificado para conter apenas um domínio de nuclease funcional. Por exemplo, a proteína de agente pode ser modificada de modo que um dos domínios de nuclease sofra mutação ou seja completa ou parcialmente deletado para reduzir sua atividade de clivagem de ácido nucleico. Em algumas modalidades, uma nickase é usada com um domínio RuvC com atividade reduzida. Em algumas modalidades, uma nickase é usada com um domínio RuvC inativo. Em algumas modalidades, uma nickase é usada com um domínio HNH com atividade reduzida. Em algumas modalidades, uma nickase é usada com um domínio HNH inativo.

[0173] Em algumas modalidades, um aminoácido conservado dentro de um domínio de nuclease de proteína Cas é substituído para reduzir ou alterar a atividade de nuclease. Em algumas modalidades, uma Cas nuclease pode compreender uma substituição de aminoácido no domínio de nuclease semelhante a RuvC ou RuvC. Substituições de aminoácido exemplificativas no domínio de nuclease semelhante a RuvC ou RuvC incluem D10A (com base na proteína Cas9 de S. pyogenes). Consultar, por exemplo, Zetsche et al. (2015) Cell Oct 22:163(3): 759-771. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode compreender uma substituição de aminoácido no domínio de nuclease semelhante a HNH ou HNH. Substituições de aminoácido exemplificativas no domínio de nuclease semelhante a HNH ou HNH incluem E762A, H840A, N863A, H983A e D986A (com base na proteína Cas9 de S. pyogenes). Consultar, por exemplo, Zetsche et al. (2015). Substituições de aminoácido exemplificativas adicionais incluem D917A, E1006A e D1255A (com base na sequência de Francisella novicida U112 Cpf1 (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN)).

[0174] Em algumas modalidades, uma nickase é fornecida em combinação com um par de RNAs guia que são complementares às fitas de sentido e antissenso

da sequência-alvo, respectivamente. Nessa modalidade, os RNAs guia direcionam a nickase a uma sequência-alvo e introduzem uma DSB gerando-se um corte em fitas opostas da sequência-alvo (isto é, corte duplo). Em algumas modalidades, uma nickase é usada juntamente com dois RNAs guia separados que alvejam fitas opostas de DNA para produzir um corte duplo no DNA-alvo. Em algumas modalidades, uma nickase é usada juntamente com dois RNAs guia separados que são selecionados de modo a estarem em proximidade estreita para produzir um corte duplo no DNA-alvo.

[0175] Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA compreende um ou mais domínios funcionais heterólogos (por exemplo, é ou compreende um polipeptídeo de fusão).

[0176] Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode facilitar o transporte do agente de ligação de DNA guiado por RNA para o núcleo de uma célula. Por exemplo, o domínio funcional heterólogo pode ser um sinal de localização nuclear (NLS). Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA pode ser fundido com 1 a 10 NLS (ou NLSs). Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA pode ser fundido com 1 a 5 NLS (ou NLSs). Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA pode ser fundido com um NLS. Quando um NLS é usado, o NLS pode ser ligado no terminal N ou no terminal C da sequência de agente de ligação de DNA guiado por RNA. O mesmo também pode ser inserido na sequência de agente de ligação de DNA guiado por RNA. Em outras modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA pode ser fundido com mais de um NLS. Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA pode ser fundido com 2, 3, 4 ou 5 NLSs. Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA pode ser fundido com dois NLSs. Em determinadas circunstâncias, os dois NLSs podem ser iguais (por exemplo, dois NLSs de SV40) ou diferentes. Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA é fundido com duas sequências de NLS de SV40 ligadas no terminal carbóxi. Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA pode ser fundido com dois NLSs, um ligado no terminal N e um no terminal C. Em algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA pode ser fundido com 3 NLSs. Em

algumas modalidades, o agente de ligação de DNA guiado por RNA pode não ser fundido com NLS. Em algumas modalidades, o NLS pode ser uma sequência de monopartida, tal como, por exemplo, o NLS de SV40, PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) ou PKKKRRV (SEQ ID NO: 601). Em algumas modalidades, o NLS pode ser uma sequência bipartida, tal como o NLS de nucleoplasmina, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 602). Em uma modalidade específica, um único NLS de PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) pode ser ligado no terminal C do agente de ligação de DNA guiado por RNA. Um ou mais ligantes são opcionalmente incluídos no sítio de fusão.

III. MÉTODOS DE ENTREGA

[0177] O RNA guia (gRNA de albumina; gRNA de SERPINA1), agentes de ligação de DNA guiados por RNA (por exemplo, Cas nuclease) e construtos de ácido nucleico (por exemplo, construto bidirecional) divulgados no presente documento podem ser entregues a uma célula hospedeira ou indivíduo, *in vivo* ou *ex vivo*, com o uso de vários métodos conhecidos e adequados disponíveis na técnica. O RNA guia, agentes de ligação de DNA guiados por RNA e construtos de ácido nucleico podem ser entregues individualmente ou em conjunto em qualquer combinação, com o uso dos métodos de entrega iguais ou diferentes, conforme apropriado.

[0178] Métodos de entrega de gene com base viral e não viral convencionais podem ser usados para introduzir o RNA guia divulgado no presente documento, assim como o agente de ligação de DNA guiado por RNA e construto doador em células (por exemplo, células de mamíferos) e tecidos-alvo. Conforme fornecido adicionalmente no presente documento, ácidos nucleicos de sistemas de entrega de vetor não viral, tais como vetores não virais, vetores de plasmídeo e, por exemplo, ácido nucleico nu, e ácido nucleico complexado com um veículo de entrega, tal como um lipossoma, nanopartícula lipídica (LNP) ou poloxâmero. Sistemas de entrega de vetor viral incluem vírus de DNA e RNA.

[0179] Métodos e composições para entrega não viral de ácidos nucleicos incluem eletroporação, lipofecção, microinjeção, biolística, virossomas, lipossomas, imunolipossomas, LNPs, policação ou conjugados de ácido nucleico de lipídio, ácido nucleico nu (por exemplo, DNA/RNA nu), vírions artificial vírions e absorção

de DNA intensificada por agente. Sonoporação com o uso, por exemplo, do sistema Sonitron 2000 (Rich-Mar) também pode ser usada para a entrega de ácidos nucleicos.

[0180] Sistemas de entrega de ácido nucleico exemplificativos adicionais incluem aqueles fornecidos por AmaxaBiosystems (Colônia, Alemanha), Maxcyte, Inc. (Rockville, Md.), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, Ma.) e Copernicus Therapeutics Inc., (consultar, por exemplo, o documento de Patente nº U.S. 6.008.336). Lipofecção é descrita, por exemplo, nos documentos de Patente nº U.S. 5.049.386; 4.946.787; e 4.897.355) e reagentes de lipofecção são vendidos comercialmente (por exemplo, Transfectam™ e Lipofectin™). A preparação de complexos de ácido nucleico de lipídio, que inclui lipossomas alvejados, tais como complexos imunolipídicos, é bem conhecida na técnica, e conforme descrito no presente documento.

[0181] Vários sistemas de entrega (por exemplo, vetores, lipossomas, LNPs) que contêm os RNAs guia, agente de ligação de DNA guiado por RNA e construto doador, individualmente ou em combinação, também podem ser administrados a um organismo para entrega em células *in vivo* ou administrados a uma célula ou cultura de célula *ex vivo*. Administração ocorre através de qualquer uma das rotas normalmente usadas para introduzir uma molécula em contato final com o sangue, fluido ou células que incluem, porém, sem limitação, injeção, infusão, aplicação tópica e eletroporação. Métodos para administrar tais ácidos nucleicos adequados estão disponíveis e são bem conhecidos por aqueles versados na técnica.

[0182] Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece vetores de DNA ou RNA que codificam qualquer uma ou mais das composições divulgadas no presente documento – por exemplo, um RNA guia (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1) que compreende qualquer uma ou mais das sequências guia descritas no presente documento; um construto (por exemplo, construto bidirecional) que compreende uma sequência que codifica AAT heteróloga; ou uma sequência que codifica um agente de ligação de DNA guiado por RNA. Em determinadas modalidades, a invenção compreende vetores de DNA ou RNA que codificam qualquer uma ou mais dentre as composições descritas no

presente documento, ou em qualquer combinação. Em algumas modalidades, os vetores compreendem adicionalmente, por exemplo, promotores, intensificadores e sequências reguladoras. Em algumas modalidades, o vetor que compreende um construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica a AAT heteróloga não compreende um promotor que aciona a expressão de AAT heteróloga. Em algumas modalidades, o vetor que compreende um RNA guia que compreende qualquer uma ou mais das sequências guia descritas no presente documento (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1) também compreende uma ou mais sequência (ou sequências) de nucleotídeos que codifica um crRNA, a trRNA, ou um crRNA e trRNA, conforme divulgado no presente documento.

[0183] Em algumas modalidades, o vetor compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um RNA guia (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1) descrito no presente documento. Em algumas modalidades, o vetor compreende uma cópia de um RNA guia. Em outras modalidades, o vetor compreende mais que uma cópia de um RNA guia. Em modalidades com mais que um RNA guia, os RNAs guia podem ser não idênticos de modo que alvejem sequências-alvo diferentes, ou podem ser idênticos pelo fato de que alvejam a mesma sequência-alvo. Em algumas modalidades, quando os vetores compreendem mais que um RNA guia, cada RNA guia pode ter outras propriedades diferentes, tal como atividade ou estabilidade dentro de um complexo com uma nuclease de DNA guiada por RNA, tal como um complexo de RNP de Cas. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o RNA guia pode ser operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de controle transcricional ou translacional, tal como um promotor, uma UTR de 3’ ou uma UTR de 5’. Em uma modalidade, o promotor pode ser um promotor de tRNA, por exemplo, $tRNA^{Lys3}$, ou uma quimera de tRNA. Consultar Mefferd et al., RNA. 2015 21:1.683 a 1.689; Scherer et al., Nucleic Acids Res. 2007 35: 2.620 a 2.628. Em algumas modalidades, o promotor pode ser reconhecido por RNA polimerase III (Pol III). Exemplos sem limitação de promotores de Pol III incluem os promotores U6 e H1. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o RNA guia pode ser operacionalmente ligada a um promotor U6 de camundongo ou ser humano. Em outras modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o RNA

guia pode ser operacionalmente ligada a um promotor H1 de camundongo ou ser humano. Em modalidades com mais que um RNA guia, os promotores usados para acionar a expressão podem ser iguais ou diferentes. Em algumas modalidades, o nucleotídeo que codifica o crRNA do RNA guia e o nucleotídeo que codifica o trRNA do RNA guia podem ser fornecidos no mesmo vetor. Em algumas modalidades, o nucleotídeo que codifica o crRNA e o nucleotídeo que codifica o trRNA podem ser acionados pelo mesmo promotor. Em algumas modalidades, o crRNA e trRNA podem ser transcritos em um único transcrito. Por exemplo, o crRNA e trRNA podem ser processados a partir do único transcrito para formar um RNA guia de molécula dupla. Alternativamente, o crRNA e trRNA podem ser transcritos em um RNA guia de molécula única (sgRNA). Em outras modalidades, o crRNA e o trRNA podem ser acionados por seus promotores correspondentes no mesmo vetor. Em ainda outras modalidades, o crRNA e o trRNA podem ser codificados por diferentes vetores.

[0184] Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o RNA guia (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1) pode estar localizada no mesmo vetor que compreende a sequência de nucleotídeos que codifica um agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma proteína Cas. Em algumas modalidades, um ou mais gRNAs de albumina e/ou um ou mais gRNAs de SERPINA1 podem estar localizados no mesmo vetor. Em algumas modalidades, um ou mais gRNAs de albumina e/ou um ou mais gRNAs de SERPINA1 podem estar localizados no mesmo vetor com a sequência de nucleotídeo que codifica um agente de ligação de DNA guiado por RNA, como uma Cas proteína. Em algumas modalidades, a expressão do RNA guia e do agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma proteína Cas pode ser acionada por seus próprios promotores correspondentes. Em algumas modalidades, a expressão do RNA guia pode ser acionada pelo mesmo promotor que aciona a expressão do agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma proteína Cas. Em algumas modalidades, o RNA guia e o agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como um transcrito de proteína Cas, podem estar contidos em um transcrito único. Por exemplo, o RNA guia pode estar dentro de uma região não traduzida (UTR) do agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como um transcrito de proteína Cas. Em algumas

modalidades, o RNA guia pode estar dentro da UTR de 5’ do transcrito. Em outras modalidades, o RNA guia pode estar dentro da UTR de 3’ do transcrito. Em algumas modalidades, a meia-vida intracelular do transcrito pode ser reduzida contendo-se o RNA guia dentro de sua UTR de 3’ e, desse modo, se encurta o comprimento de sua UTR de 3’. Em modalidades adicionais, o RNA guia pode estar dentro de um íntron do transcrito. Em algumas modalidades, sítios de splice adequados podem ser adicionados no íntron dentro do qual o RNA guia está localizado, de modo que o RNA guia sofra, apropriadamente, splice fora do transcrito. Em algumas modalidades, a expressão do agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma proteína Cas e o RNA guia do mesmo vetor em proximidade temporal estreita pode facilitar a formação mais eficiente do complexo de RNP de CRISPR.

[0185] Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o RNA guia (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1) e/ou agente de ligação de DNA guiado por RNA pode estar localizada no mesmo vetor que compreende o construto que compreende um gene de AAT heteróloga. Em algumas modalidades, a proximidade do construto que compreende o gene de AAT e o RNA guia (e/ou o agente de ligação de DNA guiado por RNA) no mesmo vetor pode facilitar a inserção mais eficiente do construto em um sítio de inserção criado pelo RNA guia/agente de ligação de DNA guiado por RNA.

[0186] Em algumas modalidades, o vetor compreende uma ou mais sequências de nucleotídeos que codificam um sgRNA (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1) e um mRNA que codifica um agente de ligação de DNA guiado por RNA, que pode ser uma proteína Cas, tal como Cas9 ou Cpf1. Em algumas modalidades, o vetor compreende uma ou mais sequências de nucleotídeos que codificam um crRNA, um trRNA e um mRNA que codifica um agente de ligação de DNA guiado por RNA, que pode ser uma proteína Cas, tal como Cas9 ou Cpf1. Em uma modalidade, o Cas9 é de Streptococcus pyogenes (isto é, Spy Cas9). Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o crRNA, trRNA ou crRNA e trRNA (que pode ser um sgRNA) compreende ou consiste em uma sequência guia flanqueada por toda ou uma porção de uma sequência de repetição de um sistema de CRISPR/Cas de ocorrência natural. O ácido nucleico que compreende ou consiste em crRNA, trRNA ou crRNA e trRNA

pode compreender adicionalmente uma sequência de vetor, em que a sequência de vetor compreende ou consiste em ácidos nucleicos que não são encontrados na natureza juntamente com o crRNA, trRNA ou crRNA e trRNA.

[0187] Em algumas modalidades, o crRNA e o trRNA são codificados por ácidos nucleicos não contíguos dentro de um vetor. Em outras modalidades, o crRNA e o trRNA podem ser codificados por um ácido nucleico contíguo. Em algumas modalidades, o crRNA e o trRNA são codificados por fitas opostas de um ácido nucleico único. Em outras modalidades, o crRNA e o trRNA são codificados pela mesma fita de um ácido nucleico único.

[0188] Em algumas modalidades, o vetor compreende um construto doador (por exemplo, o construto de ácido nucleico bidirecional) que compreende uma sequência que codifica a AAT heteróloga, conforme divulgado no presente documento. Em algumas modalidades, além do construto doador (por exemplo, construto de ácido nucleico bidirecional) divulgado no presente documento, o vetor pode compreender adicionalmente ácidos nucleicos que codificam os RNAs guia de albumina descritos no presente documento e/ou ácido nucleico que codificam um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, uma Cas nuclease, tal como Cas9). Em algumas modalidades, um ácido nucleico que codifica um RNA guia de albumina e/ou um ácido nucleico que codifica um agente de ligação de DNA guiado por RNA estão cada um ou ambos em um vetor separado de um vetor que compreende o construto doador (por exemplo, construto bidirecional) divulgado no presente documento. Em qualquer uma das modalidades, o vetor pode incluir outras sequências que incluem, porém, sem limitação, promotores, intensificadores, sequências reguladoras, conforme descrito no presente documento. Em algumas modalidades, o promotor não aciona a expressão de AAT heteróloga do construto doador (por exemplo, construto bidirecional). Em algumas modalidades, o vetor compreende uma ou mais sequências de nucleotídeos que codificam um crRNA, um trRNA ou um crRNA e trRNA. Em algumas modalidades, o vetor compreende uma ou mais sequências de nucleotídeos que codificam um sgRNA e um mRNA que codifica uma nuclease de DNA guiada por RNA, que pode ser uma Cas nuclease (por exemplo, Cas9). Em algumas modalidades, o vetor compreende uma ou mais sequências de nucleotídeos que codificam um crRNA,

um trRNA e um mRNA que codifica uma nuclease de DNA guiada por RNA, que pode ser uma Cas nuclease, tal como, Cas9. Em algumas modalidades, a Cas9 é de Streptococcus pyogenes (isto é, Spy Cas9). Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o crRNA, trRNA ou crRNA e trRNA (que pode ser um sgRNA) compreende ou consiste em uma sequência guia flanqueada por toda ou uma porção de uma sequência de repetição de um sistema de CRISPR/Cas de ocorrência natural. O ácido nucleico que compreende ou consiste em crRNA, trRNA ou crRNA e trRNA pode compreender adicionalmente uma sequência de vetor, em que a sequência de vetor compreende ou consiste em ácidos nucleicos que não são encontrados na natureza juntamente com o crRNA, trRNA ou crRNA e trRNA.

[0189] Em algumas modalidades, o vetor pode ser circular. Em outras modalidades, o vetor pode ser linear. Em algumas modalidades, o vetor pode ser envolvido em uma nanopartícula lipídica, lipossoma, nanopartícula não lipídica ou capsídeo viral. Vetores exemplificativos sem limitação incluem plasmídeos, fagomídeos, cosmídeos, cromossomos artificiais, minicromossomos, transposões, vetores virais e vetores de expressão.

[0190] Em algumas modalidades, o vetor pode ser um vetor viral. Em algumas modalidades, o vetor viral pode ser geneticamente modificado a partir de sua contrapartida de tipo selvagem. Por exemplo, o vetor viral pode compreender uma inserção, deleção ou substituição de um ou mais nucleotídeos para facilitar a clonagem ou de modo que uma ou mais propriedades do vetor sejam alteradas. Tais propriedades podem incluir capacidade de acondicionamento, eficiência de transdução, imunogenicidade, integração de genoma, replicação, transcrição e tradução. Em algumas modalidades, uma porção do genoma viral pode ser deletada de modo que o vírus tenha capacidade para acondicionar sequências exógenas que têm um tamanho maior. Em algumas modalidades, o vetor viral pode ter uma eficiência de transdução intensificada. Em algumas modalidades, a resposta imunológica induzida pelo vírus em um hospedeiro pode ser reduzida. Em algumas modalidades, os genes virais (tais como, por exemplo, integrase) que promovem a integração da sequência viral em um genoma hospedeiro podem sofrer mutação de modo que os vírus se tornem não integrados. Em algumas

modalidades, o vetor viral pode ser deficiente de replicação. Em algumas modalidades, o vetor viral pode compreender sequências de controle transcricional ou translacional exógenas para acionar a expressão de sequências codificantes no vetor. Em algumas modalidades, o vírus pode ser dependente de auxiliar. Por exemplo, o vírus pode precisar de um ou mais vírus auxiliares para fornecer componentes virais (tais como, por exemplo, proteínas virais) necessários para amplificar e acondicionar os vetores em partículas virais. Em um tal caso, um ou mais componentes auxiliares, que incluem um ou mais vetores que codificam os componentes virais, podem ser introduzidos em uma célula hospedeira juntamente com o sistema de vetor descrito no presente documento. Em outras modalidades, o vírus pode ser isento de auxiliar. Por exemplo, o vírus pode ter capacidade para amplificar e acondicionar os vetores sem um vírus auxiliar. Em algumas modalidades, o sistema de vetor descrito no presente documento também pode codificar os componentes virais necessários para a amplificação e acondicionamento de vírus.

[0191] Vetores virais exemplificativos sem limitação incluem vetor de adenovírus associado (AAV), vetores de lentivírus, vetores de adenovírus, vetores adenovirais dependentes auxiliares (HDAd), vetores de vírus herpes simplex (HSV-1), bacteriófago T4, vetores de baculovírus e vetores de retrovírus. Em algumas modalidades, o vetor viral pode ser um vetor de AAV. Em outras modalidades, o vetor viral pode se um vetor de lentivírus.

[0192] Em algumas modalidades, “AAV” se refere a todos os serotipos, subtipos e AAV de ocorrência natural, assim como AAV recombinante. “AAV” pode ser usado para se referir ao próprio vírus ou um derivado do mesmo. O termo “AAV” inclui 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, AAV 12, rh10, e híbridos dos mesmos, AAV aviário, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV primata, AAV não primata e AAV ovino. As sequências genômicas de vários serotipos de AAV, assim como as sequências das repetições terminais nativas (TRs), proteínas Rep e subunidades de capsídeo são conhecidas na técnica. Tais sequências podem ser encontradas na literatura ou em bancos de dados públicos, tais como GenBank. Um “vetor de

AAV", conforme usado no presente documento, se refere a um vetor de AAV que compreende uma sequência heteróloga que não é de origem AAV (isto é, uma sequência de ácidos nucleicos heteróloga ao AAV) que compreende, tipicamente, uma sequência que codifica um polipeptídeo heterólogo de interesse (por exemplo, AAT). O construto pode compreender um 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, e híbridos dos mesmos, AAV aviário, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV primata, AAV não primata e sequência de capsídeos de AAV ovino. Em geral, a sequência de ácidos nucleicos heteróloga (o transgene) é flanqueada por pelo menos uma, pelo menos duas ou pelo menos três sequências de repetição terminal (ITRs) invertidas de AAV. Um vetor de AAV pode ser de fita simples (ssAAV) ou autocomplementar (scAAV).

[0193] Em algumas modalidades, o lentivírus pode ser não integrado. Em algumas modalidades, o vetor viral pode ser um vetor de adenovírus. Em algumas modalidades, o adenovírus pode ser um adenovírus com alta capacidade para clonagem ou "sem coragem", em que todas as regiões virais codificantes separadas das repetições de terminal invertidas (ITRs) de 5' e 3' e o sinal de acondicionamento (T) são deletadas do vírus para aumentar sua capacidade de acondicionamento. Em ainda outras modalidades, o vetor viral pode ser um vetor de HSV-1. Em algumas modalidades, o vetor à base de HSV-1 é dependente de auxiliar, e em outras modalidades é independente de auxiliar. Por exemplo, um vetor de amplicon que retém apenas a sequência de acondicionamento exige um vírus auxiliar com componentes estruturais para acondicionamento, enquanto um vetor de HSV-1 de 30kb deletado que remove funções virais não essenciais não exige o vírus auxiliar. Em modalidades adicionais, o vetor viral pode ser bacteriófago T4. Em algumas modalidades, o bacteriófago T4 pode ter capacidade para acondicionar quaisquer moléculas de DNA ou RNA lineares ou circulares quando a cabeça do vírus é esvaziada. Em modalidades adicionais, o vetor viral pode ser um vetor de baculovírus. Em modalidades adicionais, o vetor viral pode ser um vetor de retrovírus. Em modalidades que usam vetores de AAV ou lentivirais, que têm capacidade de clonagem menor, pode ser necessário usar mais de um vetor para

entregar todos os componentes de um sistema de vetor, conforme divulgado no presente documento. Por exemplo, um vetor de AAV pode conter sequências que codificam um agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma proteína Cas (por exemplo, Cas9), enquanto um segundo vetor de AAV pode conter uma ou mais sequências guia.

[0194] Em algumas modalidades, o sistema de vetor pode ter capacidade para acionar expressão de um ou mais sequências de codificação em uma célula. Em algumas modalidades, o vetor não compreende um promotor que aciona expressão de uma ou mais sequências codificadoras uma vez que o mesmo está integrado em uma célula (por exemplo, usa o promotor endógeno da célula hospedeira, tal como quando inserido no íntron 1 de um lócus de albumina, conforme exemplificado no presente documento). Em algumas modalidades, a célula pode ser uma célula procariótica, como, por exemplo, uma célula bacteriana. Em algumas modalidades, a célula pode ser uma célula eucariótica, tal como, por exemplo, uma levedura, planta, inseto ou célula de mamífero. Em algumas modalidades, a célula eucariótica pode ser uma célula de mamífero. Em algumas modalidades, a célula eucariótica pode ser uma célula de roedor. Em algumas modalidades, a célula eucariótica pode ser uma célula de ser humano. Promotores adequados para acionar a expressão em tipos diferentes de células são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, o promotor pode ser de tipo selvagem. Em outras modalidades, o promotor pode ser modificado para expressão mais eficiente ou eficaz. Em ainda outras modalidades, o promotor pode ser truncado, porém, pode reter sua função. Por exemplo, o promotor pode ter um tamanho normal ou um tamanho reduzido que é adequado para acondicionamento apropriado do vetor em um vírus.

[0195] Em algumas modalidades, o vetor pode compreender uma sequência de nucleotídeos que codifica um agente de ligação de DNA guiado por RNA, tal como uma proteína Cas (por exemplo, Cas9) descrita no presente documento. Em algumas modalidades, a nuclease codificada pelo vetor pode ser uma proteína Cas. Em algumas modalidades, o sistema de vetor pode compreender uma cópia da sequência de nucleotídeos que codifica a nuclease. Em outras modalidades, o sistema de vetor pode compreender mais de uma cópia da

sequência de nucleotídeos que codifica a nuclease. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica a nuclease pode ser operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de controle transcricional ou translacional. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica a nuclease pode ser operacionalmente ligada a pelo menos um promotor.

[0196] Em algumas modalidades, o vetor pode compreender qualquer um ou mais dentre os construtos que compreendem um gene de AAT heteróloga descrito no presente documento. Em algumas modalidades, o gene de AAT heteróloga pode ser operacionalmente ligado a pelo menos uma sequência de controle transcricional ou translacional. Em algumas modalidades, o gene de AAT heteróloga pode ser operacionalmente ligado a pelo menos um promotor. Em algumas modalidades, o gene heterólogo não é ligado a um promotor que aciona a expressão do gene heterólogo.

[0197] Em algumas modalidades, o promotor pode ser constitutivo, induzível ou de tecido específico. Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor constitutivo. Promotores constitutivos exemplificativos sem limitação incluem promotor iniciais imediatos de citomegalovírus (CMV), promotor de vírus símio (SV40), promotor tardio principal de adenovírus (MLP), promotor de vírus Rous sarcoma (RSV), promotor de vírus tumoral mamário de camundongo (MMTV), promotor de fosfoglicerato quinase (PGK), promotor de fator alfa de alongamento (EF1a), promotores de ubiquitina, promotores de actina, promotores de tubulina, promotores de imunoglobulina, um fragmento funcional dos mesmos, ou uma combinação de qualquer um dos supracitados. Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor de CMV. Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor de CMV truncado. Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor de EF1a. Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor induzível. Promotores induzíveis exemplificativos sem limitação incluem aqueles induzíveis por choque térmico, luz, produtos químicos, peptídeos, metais, esteroides, antibióticos ou álcool. Em algumas modalidades, o promotor induzível pode ser um que tem um baixo nível de expressão basal (não induzida), tal como, por exemplo, o promotor Tet-On® (Clontech).

[0198] Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor de

tecido específico, por exemplo, um promotor específico para expressão no fígado.

[0199] Em algumas modalidades, as composições compreendem um sistema de vetor. Em algumas modalidades, o sistema de vetor pode compreender um vetor único. Em outras modalidades, o sistema de vetor pode compreender dois vetores. Em modalidades adicionais, o sistema de vetor pode compreender três vetores. Quando RNAs guia diferentes são usados para multiplexação, ou quando múltiplas cópias do RNA guia são usadas, o sistema de vetor pode compreender mais de três vetores.

[0200] Em algumas modalidades, o sistema de vetor pode compreender promotores induzíveis para começar a expressão apenas após o mesmo ser entregue a uma célula-alvo. Promotores induzíveis exemplificativos sem limitação incluem aqueles induzíveis por choque térmico, luz, produtos químicos, peptídeos, metais, esteroides, antibióticos ou álcool. Em algumas modalidades, o promotor induzível pode ser um que tem um baixo nível de expressão basal (não induzida), tal como, por exemplo, o promotor Tet-On® (Clontech).

[0201] Em modalidades adicionais, o sistema de vetor pode compreender promotores de tecido específico para começar a expressão apenas após o mesmo ser entregue em um tecido específico.

[0202] O vetor que compreende: um ou mais RNAs guia (gRNA de albumina e/ou gRNA de SERPINA1), agente de ligação de DNA de ligação de RNA, ou construto doador que compreende uma sequência que codifica uma proteína AAT heteróloga, individualmente ou em qualquer combinação, pode ser entregue pelo lipossoma, uma nanopartícula, um exossoma ou uma microvesícula. O vetor também pode ser entregue por uma nanopartícula lipídica (LNP). Um ou mais dentre RNA guia (gRNA de albumina e/ou gRNA de SERPINA1), agente de ligação de DNA de ligação de RNA (por exemplo mRNA), ou construto doador que compreende uma sequência que codifica uma proteína AAT heteróloga, individualmente ou em qualquer combinação, podem ser entregues por lipossoma, uma nanopartícula, um exossoma ou uma microvesícula. Um ou mais dentre RNA guia (gRNA de albumina e/ou gRNA de SERPINA1), agente de ligação de DNA de ligação de RNA (por exemplo mRNA), ou construto doador que compreende uma sequência que codifica uma proteína AAT heteróloga, individualmente ou em

qualquer combinação, podem ser entregues por LNP.

[0203] Nanopartículas lipídicas (LNPs) são um meio bem conhecido para entrega de carga de nucleotídeo e proteína, e podem ser usados para entrega de qualquer um dos RNAs guia (por exemplo, gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1), agente de ligação de DNA guiado por RNA e/ou construto doador (por exemplo, construto bidirecional) divulgados no presente documento. Em algumas modalidades, os LNPs entregam as composições na forma de ácido nucleico (por exemplo, DNA ou mRNA), ou proteína (por exemplo, Cas nuclease), ou ácido nucleico juntamente com proteína, conforme apropriado.

[0204] Em algumas modalidades, é fornecido no presente documento um método para entregar qualquer um dos RNAs guia descritos no presente documento (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1) e/ou construto doador (por exemplo, construto bidirecional) divulgado no presente documento, sozinho ou em combinação com uma célula hospedeira ou indivíduo, em que qualquer um ou mais dentre os componentes está associado a uma LNP. Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, Cas9 ou uma sequência que codifica Cas9).

[0205] Em algumas modalidades, é fornecida no presente documento uma composição que compreende qualquer um dos RNAs guia descritos no presente documento (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1) e/ou construto doador (por exemplo, construto bidirecional) divulgado no presente documento, sozinho ou em combinação com uma LNP. Em algumas modalidades, a composição compreende adicionalmente um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, Cas9 ou uma sequência de ácidos nucleicos que codifica Cas9).

[0206] Em algumas modalidades, as LNPs compreendem lipídios ionizáveis biodegradáveis. Em algumas modalidades, as LNPs compreendem octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propila, também denominado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato) ou outro lipídio ionizável. Consultar, por exemplo, lipídios dos documentos nº PCT/US2018/053559 (depositado em 28 de setembro de 2018), WO/2017/173054,

WO2015/095340, e WO2014/136086, assim como referências fornecidas nos mesmos. Em algumas modalidades, o termo catiônico e ionizável no contexto de lipídios LNP é intercambiável, por exemplo, em que lipídios ionizáveis são catiônicos dependendo do pH.

[0207] Em algumas modalidades, LNPs associadas ao construto bidirecional são divulgadas no presente documento para uso na preparação de um medicamento para tratar uma doença ou distúrbio. A doença ou distúrbio pode ser uma doença associada uma deficiência de alfa-1 antitripsina (AATD).

[0208] Em algumas modalidades, qualquer um dentre os RNAs guia descritos no presente documento, agentes de ligação de DNA guiados por RNA descritos no presente documento e/ou construto doador (por exemplo, construto bidirecional) divulgados no presente documento, sozinho ou em combinação, seja nu ou como parte de um vetor, é formulado em uma nanopartícula lipídica ou administrado por meio da mesma; consultar, por exemplo, o documento nº WO/2017/173054 cujo conteúdo está incorporado aqui a título de referência em sua totalidade.

[0209] Será aparente que qualquer um ou mais RNAs guias divulgados no presente documento (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1), um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, Cas nuclease ou um ácido nucleico que codifica uma Cas nuclease), e um construto doador (por exemplo, construto bidirecional) que compreende uma sequência que codifica a AAT heteróloga pode ser entregue com o uso de sistemas iguais ou diferentes. Por exemplo, o RNA guia, agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, Cas nuclease) e construto podem ser carregados pelo mesmo vetor (por exemplo, AAV). Alternativamente, o agente de ligação de DNA guiado por RNA tal como uma Cas nuclease (como uma proteína ou mRNA) e/ou gRNA (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1) podem ser carregados por um plasmídeo ou LNP, enquanto o construto doador pode ser carregado por um vetor, tal como AAV. O uso de qualquer uma dentre a variedade de combinações será guiado por, por exemplo, a praticalidade e eficiência de seu uso. Ademais, os sistemas de entrega diferentes podem ser administrados por rotas iguais ou diferentes (por exemplo, através de infusão; através de injeção, tal como injeção intramuscular, injeção de veia caudal

ou outra injeção intravenosa; através de administração intraperitoneal e/ou injeção intramuscular).

[0210] Os sistemas de entrega diferentes podem ser entregues *in vitro* ou *in vivo* simultaneamente ou em qualquer ordem sequencial. Em algumas modalidades, o construto doador, RNA guia (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1) e Cas nuclease podem ser entregues *in vitro* ou *in vivo* simultaneamente, por exemplo, em um vetor, dois vetores, três vetores, vetores individuais, uma LNP, duas LNPs, três LNPs, LNPs individuais ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o construto doador pode ser entregue *in vivo* ou *in vitro*, como um vetor e/ou associado a uma LNP, antes de (por exemplo, cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou mais dias) entregar o RNA guia de albumina e/ou Cas nuclease, como um vetor e/ou associado a uma LNP individualmente ou em conjunto como uma ribonucleoproteína (RNP). Em algumas modalidades, o construto doador pode ser entregue em múltiplas administrações, por exemplo, todo dia, a cada dois dias, a cada três dias, a cada quatro dias, toda semana, a cada duas semanas, a cada três semanas ou a cada quatro semanas. Em algumas modalidades, o construto doador pode ser entregue em intervalos de uma semana, por exemplo, na semana 1, semana 2 e semana 3, etc. Como um exemplo adicional, o RNA guia de albumina e a Cas nuclease, como um vetor e/ou associados a uma LNP individualmente ou em conjunto como uma ribonucleoproteína (RNP), podem ser entregues *in vivo* ou *in vitro*, antes de (por exemplo, cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ou mais dias) entregar o construto como um vetor e/ou associado a uma LNP. Em algumas modalidades, o RNA guia de albumina pode ser entregue em múltiplas administrações, por exemplo, todo dia, a cada dois dias, a cada três dias, a cada quatro dias, toda semana, a cada duas semanas, a cada três semanas ou a cada quatro semanas. Em algumas modalidades, o RNA guia de albumina pode ser entregue em intervalos de uma semana, por exemplo, na semana 1, semana 2 e semana 3, etc. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ser entregue em múltiplas administrações, por exemplo, pode ser entregue todo dia, a cada dois dias, a cada três dias, a cada quatro dias, toda semana, a cada duas semanas, a cada três semanas ou a cada quatro semanas. Em algumas modalidades, a Cas nuclease

pode ser distribuída em intervalos de uma semana, por exemplo, na semana 1, semana 2 e semana 3, etc.

[0211] Em algumas modalidades, a presente divulgação também fornece formulações farmacêuticas para administrar qualquer um dos RNAs guia (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1) divulgados no presente documento. Em algumas modalidades, a formulação farmacêutica inclui um agente de ligação de DNA guiado por RNA (por exemplo, Cas nuclease) e um construto doador que compreende uma sequência de codificação de uma AAT heteróloga, conforme divulgado no presente documento. Formulações farmacêuticas adequadas para entrega em um indivíduo (por exemplo, indivíduo humano) são bem conhecidas na técnica.

IV. MÉTODOS DE USO

[0212] O gene que codifica a AAT está localizado no cromossomo 14q32.1 e é parte do lócus de Inibidor de Protease (Pi). AAT normal pode ser denominada PiM. A mutação de PiZ pode causar sintomas de fígado e/ou pulmão, incluindo em indivíduos homozigotos (ZZ) e heterozigotos (MZ ou SZ). A mutação de PiS pode causar redução mais amena em AAT de soro e risco mais baixa para doença de pulmão. Várias outras mutações alélicas são conhecidas na técnica. Consultar, por exemplo, Greulich et al. “Alpha-1-antitrypsin deficiency: increasing awareness and improving diagnosis,” Ther Adv Respir Dis. 2016.

[0213] AATD pode ser diagnosticada por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, pela presença de um ou mais sintomas fisiológicos, testes sanguíneos e/ou testes genéticos para uma ou mais das 150+ mutações de AAT conhecidas relatadas até o presente. Consultar, por exemplo, id. Exemplos de sangue e/ou testes incluem, mas sem limitação, ensaiar níveis de AAT de soro, detectar mutações por reação em cadeia da polimerase (PCR) e/ou sequenciamento de próxima geração (NGS), focalização isoelétrica (IEF) com ou sem immunoblotting, sequenciamento de lócus de gene de AAT e cartões separadores de soro (ensaio de fluxo lateral para detectar a proteína Z).

[0214] Em algumas modalidades, os níveis de soro de AAT podem ser considerados normais na faixa de 150 a 350 mg/dl com o uso de métodos de imunodifusão (que podem superestimar níveis de soro). Nessas modalidades, um

nível de 80 mg/dl pode ser considerado protetor, por exemplo, risco diminuído de um ou mais sintomas, por exemplo, enfisema, apesar de ser mais baixo do que a faixa normal.

[0215] Em algumas modalidades, níveis de soro de AAT podem ser considerados normais na faixa de 90 a 200 mg/dl com o uso de nefelometria ou imunoturbidimetria e um padrão purificado. Nessas modalidades, um nível de 50 mg/dl pode ser considerado protetor, por exemplo, risco diminuído de um ou mais sintomas, por exemplo, enfisema, apesar de ser mais baixo do que a faixa normal.

[0216] Em algumas modalidades, os níveis de soro de AAT de menos do que cerca de 130 mg/dl, 125 mg/dl, 120 mg/dl, 115 mg/dl, 110 mg/dl, 105 mg/dl ou 100 mg/dl indica baixa probabilidade de uma mutação de AAT homozigota e o teste genético adicional pode não ser necessário. Em algumas modalidades, os níveis de soro de AAT de cerca de 104 mg/dl indica baixa probabilidade de PiS homozigota e 113 mg/dl indica baixa probabilidade de PiZ homozigota. Em algumas modalidades, níveis de soro de AAT podem fornecer informações de exclusão limitadas para carreadores heterozigotos e o teste genético adicional pode ser necessário, devido ao fato de que níveis de soro de AAT de cerca de 150 mg/dl indicam baixa probabilidade de PiMZ de carreador heterozigoto, e níveis de soro de AAT de cerca de 220 mg/dl indicam baixa probabilidade de piMS heterozigota.

[0217] Exemplos de sintomas fisiológicos detectáveis incluem, mas sem limitação, doença de pulmão e/ou doença de fígado; sibilos ou dificuldade de respiração; risco aumentado de infecções de pulmão; doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD); bronquite, asma, dispneia; cirrose; icterícia neonatal; paniculite; tosse crônica e/ou fleuma; resfriados torácicos recorrentes; amarelamento da pele ou da parte branca dos olhos; inchaço da barriga ou pernas. Em algumas modalidades, os indivíduos podem ser submetidos a testes sanguíneos e/ou genéticos se os mesmos são pacientes de COPD, pacientes asmáticos não responsivos, pacientes com bronquiectasia de etiologia desconhecida, indivíduos com cirrose criptogênica/doença de fígado, granulomatose com poliangiite, paniculite necrosante e/ou parentes de primeiro grau de pacientes/portadores com AATD. Em algumas modalidades, o teste de função pulmonar (PFT), capacidade residual funcional (RFC), e/ou perda de densidade de pulmão em capacidade de

pulmão total (TLC) pode ser realizado.

[0218] Em algumas modalidades, os indivíduos a serem tratados incluem indivíduos com soro de AAT abaixo da faixa normal. Em algumas modalidades, os indivíduos a serem tratados incluem indivíduos com qualquer combinação de mutação alélica, por exemplo, ZZ, MZ, MS. Em algumas modalidades, os indivíduos a serem tratados incluem indivíduos com pós-broncodilatador FEV1 de pelo menos 30%, 40%, 50%, 60% de valor normal previsto. Em algumas modalidades, os indivíduos a serem tratados incluem indivíduos elegíveis para broncoscopia. Em algumas modalidades, os indivíduos a serem tratados incluem indivíduos com função hepática e renal adequada, não fumantes, indivíduos que não tiveram lobectomia de pulmão ou fígado, transplante, indivíduos que não tiveram cirurgia de redução de volume de pulmão, indivíduos que não tiveram infecção de trato respiratório aguda ou exacerbação de COPD imediatamente antes do tratamento, e/ou indivíduos que não tiveram cor pulmonale instável.

[0219] Conforme descrito no presente documento, a presente divulgação fornece composições e métodos para expressar AAT heteróloga (por exemplo, uma AAT funcional ou de tipo selvagem) em um sítio de porto seguro humano, como um sítio de porto seguro de albumina para permitir a secreção da proteína. Em algumas modalidades, os métodos assim aliviam os efeitos negativos de AATD no pulmão. A presente divulgação também fornece composições e métodos para realizar *knockout* do gene de SERPINA1 endógeno assim eliminando a produção de formas mutantes de AAT associada à polimerização de proteína AAT e agregação em hepatócitos de fígado, que leva aos sintomas de fígado em pacientes com AATD. Consultar o documento nº WO/2018/119182, incorporado a título de referência em sua totalidade. Consequentemente, as composições e métodos divulgados no presente documento tratam AATD aliviando-se os efeitos negativos do distúrbio no pulmão assim como no fígado.

[0220] AAT é primariamente sintetizada e secretada por hepatócitos e funciona para inibir a atividade de elastase de neutrófilo no pulmão. Sem quantidades suficientes de AAT funcional, a elastase de neutrófilo é descontrolada e danifica alvéolos no pulmão. Assim, mutações em SERPINA1 que resultam em níveis diminuídos de AAT ou níveis diminuídos de AAT funcional de modo

apropriado, levam à patologia de pulmão, incluindo, por exemplo, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), bronquite ou asma.

[0221] Os gRNAs de albumina, construto doador (por exemplo, construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga funcional) e agentes de ligação de DNA guiados por RNA descritos no presente documento são úteis para introduzir um ácido nucleico de AAT heteróloga em uma célula hospedeira, *in vivo* ou *in vitro*. Em algumas modalidades, os gRNAs de albumina, construto doador (por exemplo, construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga) e agentes de ligação de DNA guiados por RNA descritos no presente documento são úteis para expressar uma AAT heteróloga funcional em uma célula hospedeira, ou em um indivíduo que necessita dos mesmos. Em algumas modalidades, os gRNAs de albumina, construto doador (por exemplo, construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga), e agentes de ligação de DNA guiados por RNA descritos no presente documento são úteis para tratar AATD em um indivíduo que necessita dos mesmos. Em algumas modalidades, o tratamento de AATD expressando-se AAT heteróloga em um lócus de albumina intensifica a secreção de AAT funcional (por exemplo, tipo selvagem) e alivia um ou mais sintomas de AATD, por exemplo, efeitos negativos nos pulmões. Por exemplo, a expressão de AAT heteróloga pode aliviar a doença de pulmão e/ou doença de fígado; sibilos ou dificuldade de respiração; risco aumentado de infecções de pulmão; COPD; bronquite, asma, dispneia; cirrose; icterícia neonatal; paniculite; tosse crônica e/ou fleuma; resfriados torácicos recorrentes; amarelamento da pele ou da parte branca dos olhos; inchaço da barriga ou pernas. A administração de qualquer um ou mais dos gRNAs de albumina, construto doador (por exemplo, construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica AAT heteróloga) e agentes de ligação de DNA guiados por RNA descritos no presente documento leva a um aumento em expressão de gene de AAT funcional (por exemplo, tipo selvagem), níveis de proteína AAT (por exemplo, níveis de circulação, soro ou plasma) e/ou níveis de atividade de AAT (por exemplo, inibição de tripsina) (por exemplo, maior do que 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% de expressão de gene de AAT ou níveis de proteína em comparação com um

controle não tratado, por exemplo, por nefelometria ou imunoturbidimetria, por exemplo, AAT maior do que cerca de 40 mg/dl, 45 mg/dl, 50 mg/dl, 60 mg/dl, 70 mg/dl, 80 mg/dl, 90 mg/dl, 100 mg/dl ou 110 mg/dl em soro). Em algumas modalidades, a eficiência do tratamento pode ser avaliada medindo-se a atividade de AAT em soro ou plasma, em que um aumento no nível e/ou atividade de AAT no soro ou plasma do indivíduo indica a eficiência do tratamento. Em algumas modalidades, a eficiência do tratamento pode ser avaliada medindo-se níveis de atividade e/ou proteína de AAT em soro ou plasma, em que um aumento no nível e/ou atividade de AAT no soro ou plasma do indivíduo indica a eficiência do tratamento. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento pode ser avaliada por coloração de PASD de seções de tecido de fígado, por exemplo, para medir a agregação. Em algumas modalidades, eficácia do tratamento pode ser avaliada medindo-se a inibição de elastase de neutrófilo, por exemplo, no pulmão. Em algumas modalidades, eficácia do tratamento pode ser avaliada por nível de soro de genótipo, função de pulmão de AAT, teste de espirometria, raio-X torácico de pulmão, tomografia computadorizada de pulmão, teste de sangue de função de fígado e/ou ultrassom de fígado.

[0222] Em algumas modalidades, o tratamento se refere a aumentar níveis de AAT de soro, por exemplo, para níveis protetores. Em algumas modalidades, o tratamento se refere a aumentar níveis de AAT de soro, por exemplo, dentro da faixa normal. Em algumas modalidades, o tratamento se refere a aumentar níveis de AAT de soro, por exemplo, acima 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 mg/dl, por exemplo, conforme medido com o uso de nefelometria ou imunoturbidimetria e um padrão purificado.

[0223] Em algumas modalidades, o tratamento se refere a aumentar níveis de AAT de soro, por exemplo, para níveis protetores. Em algumas modalidades, o tratamento se refere a aumentar níveis de AAT de soro, por exemplo, dentro da faixa normal. Em algumas modalidades, o tratamento se refere a aumentar níveis de AAT de soro, por exemplo, acima 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 mg/dl, por exemplo, conforme medido com o uso de nefelometria ou imunoturbidimetria e um padrão purificado. Em algumas modalidades, tratamento se refere à melhora em AAT de soro de linha de base em comparação com controle, por exemplo, antes e

após tratamento. Em algumas modalidades, o tratamento se refere a uma melhora em classificação histológica de doença de fígado associada a AATD, por exemplo, por 1, 2, 3 ou mais pontos, em comparação com controle, por exemplo, antes e após tratamento. Em algumas modalidades, o tratamento se refere à melhora em pontuação de fibrose de Ishak em comparação com controle, por exemplo, antes e após tratamento.

[0224] Em indivíduos normais ou saudáveis (por exemplo, indivíduos que não possuem o alelo ZZ, MZ ou SZ), níveis de AAT variam entre cerca de 500 µg/ml a cerca de 3.000 µg/ml no soro. Clinicamente, o nível de AAT de circulação pode ser medido por ensaio enzimológico e/ou imunológico (por exemplo, ELISA), cujos métodos são bem conhecidos na técnica. Consultar, por exemplo, Stoller J. e Aboussouan (2005), Alphal-antitrypsin deficiency. Lancet 365: 2.225 a 2.236; Kanakoudi F, Drossou V, Tzimouli V, et al: Serum concentrations of 10 acute-phase proteins in healthy term and pre-term infants from birth to age 6 months. Clin Chem 1995;41:605 a 608; Morse JO: Alpha-1-antitrypsin deficiency. N Engl J Med 1978;299:1.045 a 1.048, 1.099 a 1.105; Cox DW: Alpha-1-antitrypsin deficiency. In The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. Vol. 3. Sétima edição. Editado por CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle. Nova Iorque, McGraw-Hill Book Company, 1995, páginas 4.125 a 4.158.

[0225] Consequentemente, em algumas modalidades, as composições e métodos divulgados no presente documento são úteis para aumentar níveis de soro ou plasma de AAT (por exemplo, AAT funcional ou AAT de tipo selvagem) em um indivíduo que tem AATD (por exemplo, indivíduos que possuem o alelo ZZ, MZ ou SZ) ou com risco de desenvolver AATD (por exemplo, indivíduos que possuem o alelo ZZ, MZ ou SZ) a cerca de 500 µg/ml, ou mais. Em algumas modalidades, as composições e métodos divulgados no presente documento são úteis para aumentar níveis de proteína de AAT a cerca de 1.500 µg/ml. Em algumas modalidades, as composições e métodos divulgados no presente documento são úteis para aumentar níveis de proteína AAT a cerca de 1.000 µg/ml a cerca de 1.500 µg/ml, cerca de 1.500 µg/ml a cerca de 2000 µg/ml, cerca de 2.000 µg/ml a cerca de 2.500 µg/ml, cerca de 2.500 µg/ml a cerca de 3.000 µg/ml, ou mais. Por exemplo, as composições e métodos divulgados no presente documento são úteis para

aumentar os níveis de soro ou plasma de AAT em um indivíduo que tem uma AATD a cerca de 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.100, 2.200, 2.300, 2.400, 2.500, 2.600, 2.700, 2.800, 2.900, 3.000, µg/ml ou mais.

[0226] Em algumas modalidades, as composições e métodos divulgados no presente documento são úteis para aumentar níveis de soro ou plasma de AAT em um indivíduo que tem AATD (por exemplo, indivíduos que possuem o alelo ZZ, MZ ou SZ) ou com risco de desenvolver AATD (por exemplo, indivíduos que possuem o alelo ZZ, MZ ou SZ) em cerca de 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200% ou mais, em comparação com o nível de soro ou plasma de AAT do indivíduo antes da administração.

[0227] Em algumas modalidades, as composições e métodos divulgados no presente documento são úteis para aumentar a atividade de proteína de AAT funcional e/ou AAT em uma célula hospedeira em cerca de 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200% ou mais em comparação com um nível de AAT antes da administração na célula hospedeira, por exemplo, um nível normal. Em algumas modalidades, a célula é uma célula de fígado.

[0228] Em algumas modalidades, a célula (célula hospedeira) ou população de células tem capacidade para expressar AAT, por exemplo, células que se originam do tecido de quaisquer um ou mais dentre fígado, pulmão, órgão gástrico, rim, estômago, intestino delgado distal e proximal, pâncreas, glândulas adrenais ou cérebro.

[0229] Em algumas modalidades, o método compreende administrar um RNA guia e um agente de ligação de DNA guiado por RNA (tal como um mRNA

que codifica uma Cas9 nuclease) em uma LNP. Em modalidades adicionais, o método compreende administrar um construto de ácido nucleico de AAV que codifica uma proteína de AAT, tal como um construto de AAT bidirecional. LNP de CRISPR/Cas9 que compreende RNA guia e um mRNA que codifica uma Cas9, pode ser administrada por via intravenosa. Construto doador de AAT de AAV pode ser administrado por via intravenosa. Dosagem exemplificativa de LNP de CRISPR/Cas9 inclui cerca de 0,1, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 ou 10 mpk (RNA). As unidades mg/kg e mpk são usadas intercambiavelmente no presente documento. A dosagem exemplificativa de AAV que compreende um ácido nucleico que codifica uma proteína de AAT inclui uma MOI de cerca de 10^{11}, 10^{12}, 10^{13} e 10^{14} vg/kg, opcionalmente a MOI pode ser cerca de $1x10^{13}$ a $1x10^{14}$ vg/kg.

[0230] Em algumas modalidades, o método compreende expressar uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína de AAT. Em algumas modalidades, o método compreende alcançar um nível terapeuticamente eficaz de atividade de coagulação de AAT de circulação em um indivíduo. Em modalidades particulares, o método compreende alcançar a atividade de AAT de pelo menos cerca de 5% a cerca de 50% do normal. O método pode compreender alcançar a atividade de AAT de pelo menos cerca de 50% a cerca de 150% do normal. Em determinadas modalidades, o método compreende alcançar um aumento na atividade de AAT sobre a atividade de AAT de linha de base do paciente de pelo menos cerca de 1% a cerca de 50% da atividade de AAT normal, ou pelo menos cerca de 5% a cerca de 50% da atividade de AAT normal, ou pelo menos cerca de 50% a cerca de 150% da atividade de AAT normal.

[0231] Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente alcançar um efeito durável, por exemplo, efeito de pelo menos 1 mês, 2 meses, 6 meses, 1 ano ou 2 anos. Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente alcançar o efeito terapêutico de uma maneira durável e prolongada, por exemplo, efeito de pelo menos 1 mês, 2 meses, 6 meses, 1 ano ou 2 anos. Em algumas modalidades, o nível de atividade e/ou nível de AAT de circulação é estável por pelo menos 1 mês, 2 meses, 6 meses, 1 ano ou mais. Em algumas modalidades, uma atividade e/ou nível de estado estável de proteína de AAT é alcançado por pelo menos 7 dias, pelo menos 14 dias, ou pelo menos 28 dias. Em

modalidades adicionais, o método compreende manter atividade e/ou níveis de AAT após uma dose única por pelo menos 1, 2, 4 ou 6 meses, ou pelo menos 1, 2, 3, 4 ou 5 anos.

[0232] Em modalidades adicionais que envolvem a inserção no lócus de albumina, os níveis de albumina de circulação do indivíduo são normais. O método pode compreender manter os níveis de albumina de circulação do indivíduo dentro de ±5%, ±10%, ±15%, ±20% ou ±50% dos níveis de albumina de circulação normais. Em determinadas modalidades, os níveis de albumina do indivíduo estão inalterados em comparação com os níveis de albumina de indivíduos não tratados pelo menos pela semana 4, semana 8, semana 12 ou semana 20. Em determinadas modalidades, os níveis de albumina do indivíduo caem transitoriamente e, então, retornam aos níveis normais. Em particular, os métodos podem compreender a não detecção de nenhuma alteração significativa em níveis de albumina no plasma.

[0233] Em algumas modalidades, a invenção compreende um método ou uso de modificação de (por exemplo, criação de uma quebra de fita dupla em) um gene de albumina, tal como um gene de albumina humana, que compreende administrar ou entregar a uma célula hospedeira ou população de células hospedeiras qualquer um ou mais dentre os gRNAs, construto doador (por exemplo, construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica o AAT), e agentes de ligação de DNA guiados por RNA (por exemplo, Cas nuclease) descritos no presente documento. Em algumas modalidades, a invenção compreende um método ou uso de modificação de (por exemplo, criação de uma quebra de fita dupla em) uma região de íntron 1 de albumina, tal como um íntron 1 de albumina humana, que compreende administrar ou entregar a uma célula hospedeira ou população de células hospedeiras qualquer um ou mais dentre os gRNAs, construto doador (por exemplo, construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica o AAT), e agentes de ligação de DNA guiados por RNA (por exemplo, Cas nuclease) descritos no presente documento. Em algumas modalidades, a invenção compreende um método ou uso de modificação de (por exemplo, criação de uma quebra de fita dupla em) um porto seguro humano, tal como tecido hepático ou célula hospedeira de hepatócito, que compreende administrar ou entregar a uma célula hospedeira ou população de células

hospedeiras qualquer um ou mais dentre os gRNAs, construto doador (por exemplo, construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica o AAT), e agentes de ligação de DNA guiados por RNA (por exemplo, Cas nuclease) descritos no presente documento. Inserção em um lócus de porto seguro, tal como um lócus de albumina, permite a superexpressão do gene de SERPINA1 sem efeitos prejudiciais significativos na célula hospedeira ou população de células, tais como hepatócitos ou células hepáticas.

[0234] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método ou uso de modificação de (por exemplo, criação de uma quebra de fita dupla em) íntron 1 de um lócus de albumina humana, que compreende administrar ou entregar a uma célula hospedeira qualquer um ou mais dentre os gRNAs de albumina, construto doador (por exemplo, construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga), e agentes de ligação de DNA guiados por RNA (por exemplo, Cas nuclease) descritos no presente documento. Em algumas modalidades, o RNA guia de albumina compreende uma sequência guia que contém pelo menos 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos que têm capacidade para ligar a uma região dentro do íntron 1 de lócus de albumina humana (SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades, o RNA guia de albumina compreende pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2-33. Em algumas modalidades, o RNA guia de albumina compreende uma sequência que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% ou 88% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2-33. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende uma sequência guia que compreende uma sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs.: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 ou 31. Em algumas modalidades, a administração é *in vitro*. Em algumas modalidades, a administração é *in vivo*. Em algumas modalidades, o construto doador é um construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula hepática.

[0235] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método ou uso para introduzir um ácido nucleico de AAT heteróloga (por exemplo,

AAT funcional ou de tipo selvagem) em uma célula hospedeira que compreende administrar ou entregar qualquer um ou mais dentre os gRNAs de albumina, construto doador (por exemplo, construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga), e agentes de ligação de DNA guiados por RNA (por exemplo, Cas nuclease) descritos no presente documento. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende uma sequência guia que contém pelo menos 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos que têm capacidade para ligar a uma região dentro do íntron 1 de lócus de albumina humana (SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades, o RNA guia de albumina compreende pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2-33. Em algumas modalidades, o RNA guia de albumina compreende uma sequência que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% ou 88% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2-33. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende uma sequência guia que compreende uma sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs.: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 ou 31. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina que compreende uma sequência escolhida de: a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 ou 33; b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 ou 33; c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 ou 97; d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33; e) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33; f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e g) uma sequência que é complementar a 15 nucleotídeos consecutivos +/- 10 nucleotídeos das coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2-33. Em algumas modalidades, a administração é *in vitro*. Em algumas modalidades, a administração é *in vivo*. Em algumas modalidades, o construto doador é um

construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga (por exemplo, AAT funcional ou de tipo selvagem). Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula hepática.

[0236] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método ou uso para expressar uma AAT heteróloga (por exemplo, AAT funcional ou de tipo selvagem) em uma célula hospedeira que compreende administrar ou entregar qualquer um ou mais dentre os gRNAs de albumina, construto doador (por exemplo, construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica o AAT heteróloga), e agentes de ligação de DNA guiados por RNA (por exemplo, Cas nuclease) descritos no presente documento. Em algumas modalidades, o indivíduo que necessita do mesmo está entre o nascimento e 2 anos de idade; entre 2 a 12 anos de idade; ou entre 12 a 21 anos de idade. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende uma sequência guia que contém pelo menos 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos que têm capacidade para ligar a uma região dentro do íntron 1 de lócus de albumina humana (SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende uma sequência que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% ou 88% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende uma sequência guia que compreende uma sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 ou 31. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina que compreende uma sequência escolhida de: a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 ou 33; b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 ou 33; c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 ou 97; d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33; e) pelo

menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33; f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e g) uma sequência que é complementar a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 nucleotídeos consecutivos dentro de ou que abrangem as coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2 a 33. Em algumas modalidades, a administração é *in vitro*. Em algumas modalidades, a administração é *in vivo*. Em algumas modalidades, o construto doador é um construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula hepática.

[0237] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método ou uso para tratar AATD que compreende, administrar ou entregar quaisquer um ou mais dos gRNAs de albumina, construto doador (por exemplo, construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga) e agentes de ligação de DNA guiados por RNA (por exemplo, Cas nuclease) descritos no presente documento a um indivíduo que necessita do mesmo. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende uma sequência guia que contém pelo menos 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos que têm capacidade para ligar a uma região dentro do íntron 1 de lócus de albumina de camundongo ou humana (SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende uma sequência que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% ou 88% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende uma sequência guia que compreende uma sequência de qualquer uma das SEQ ID NO: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 ou 31. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina que compreende uma sequência escolhida de: a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma

sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97; d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33; e) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33; f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e g) uma sequência que é complementar a 15 nucleotídeos consecutivos +/- 10 nucleotídeos das coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2 a 33. Em algumas modalidades, o construto doador é um construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula hepática.

[0238] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece um método ou uso para aumentar a secreção de AAT funcional de uma célula de fígado que compreende, administrar ou entregar qualquer um ou mais dentre os gRNAs de albumina, construto doador (por exemplo, construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica o AAT heteróloga), e agentes de ligação de DNA guiados por RNA (por exemplo, Cas nuclease) descritos no presente documento. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende uma sequência guia que contém pelo menos 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos que têm capacidade para ligar a uma região dentro do íntron 1 de lócus de albumina de camundongo ou humana (SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende uma sequência que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% ou 88% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33. Em algumas modalidades, o gRNA de albumina compreende uma sequência guia que compreende uma sequência de qualquer uma das SEQ ID NO: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 ou 31. Em algumas modalidades, a administração é *in vitro*. Em algumas modalidades, a administração

é *in vivo*. Em algumas modalidades, o construto doador é um construto bidirecional que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula hepática.

[0239] Conforme descrito no presente documento, o construto doador (por exemplo, construto bidirecional) que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga, gRNA de albumina e agente de ligação de DNA guiado por RNA pode ser entregue com o uso de qualquer sistema de entrega adequado e método conhecido na técnica. As composições podem ser entregues *in vitro* ou *in vivo* simultaneamente ou em qualquer ordem sequencial. Em algumas modalidades, o construto doador, gRNA de albumina e Cas nuclease podem ser entregues *in vitro* ou *in vivo* simultaneamente, por exemplo, em um vetor, dois vetores, vetores individuais, uma LNP, duas LNPs, LNPs individuais ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o construto doador pode ser entregue *in vivo* ou *in vitro*, como um vetor e/ou associado a uma LNP, antes de (por exemplo, cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou mais dias) entregar o gRNA de albumina e/ou Cas nuclease, como um vetor e/ou associado a uma LNP individualmente ou em conjunto como uma ribonucleoproteína (RNP). Como um exemplo adicional, o RNA guia e a Cas nuclease, como um vetor e/ou associados a uma LNP individualmente ou em conjunto como uma ribonucleoproteína (RNP), podem ser entregues *in vivo* ou *in vitro*, antes de (por exemplo, cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ou mais dias) entregar o construto como um vetor e/ou associado a uma LNP. Em algumas modalidades, o RNA guia e Cas nuclease estão associados a uma LNP e são entregues à célula hospedeira ou antes da entrega do construto doador.

[0240] Em algumas modalidades, o construto doador compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga, em que a sequência de AAT é AAT de tipo selvagem, por exemplo, SEQ ID NO: 700 ou 702. Em algumas modalidades, a sequência codifica uma variante funcional de AAT. Por exemplo, a variante tem atividade de inibição de tripsina aumentada em relação à AAT de tipo selvagem. Em algumas modalidades, a sequência codifica uma AAT variante que é 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% idêntica a SEQ ID NO: 702, que tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% ou mais de atividade em comparação

com AAT de tipo selvagem. Em algumas modalidades, a sequência codifica um fragmento funcional de AAT, em que o fragmento tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% ou mais de atividade em comparação com AAT de tipo selvagem.

[0241] Em algumas modalidades, o construto doador (por exemplo, construto bidirecional) é administrado em um vetor de ácido nucleico, tal como um vetor de AAV, por exemplo, AAV8. Em algumas modalidades, o construto doador não compreende um braço de homologia.

[0242] Em algumas modalidades, o indivíduo é um mamífero. Em algumas modalidades, o indivíduo é humano. Em algumas modalidades, o indivíduo é vaca, porco, macaco, ovelha, cão, gato, peixe ou aves.

[0243] Em algumas modalidades, o construto doador (por exemplo, construto bidirecional) que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga, gRNA de albumina e agente de ligação de DNA guiado por RNA são administrados por via intravenosa. Em algumas modalidades, o construto doador (por exemplo, construto bidirecional) que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga, gRNA de albumina e agente de ligação de DNA guiado por RNA são administrados na circulação hepática.

[0244] Em algumas modalidades, uma administração única de um construto doador (por exemplo, construto bidirecional) que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga, gRNA de albumina e agente de ligação de DNA guiado por RNA é suficiente para aumentar a expressão e secreção de AAT a um nível desejável. Em outras modalidades, mais que uma administração de uma composição que compreende um construto doador (por exemplo, construto bidirecional) que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga, gRNA de albumina e agente de ligação de DNA guiado por RNA pode ser benéfica para maximizar os efeitos terapêuticos.

[0245] Em algumas modalidades, múltiplas administrações de um construto doador (por exemplo, construto bidirecional) que compreende uma sequência que codifica uma AAT heteróloga, gRNA de albumina e agente de ligação de DNA guiado por RNA são usados para aumentar a expressão e secreção de AAT a um nível desejável e/ou maximizar a edição por meio de efeitos cumulativos. Em

algumas modalidades, múltiplas administrações de um RNA guia de albumina são usadas para aumentar a expressão e secreção de AAT a um nível desejável e/ou maximizar a edição por meio de efeitos cumulativos. Em algumas modalidades, múltiplas administrações de Cas nuclease são usadas para aumentar a expressão e secreção de AAT a um nível desejável e/ou maximizar a edição por meio de efeitos cumulativos. Em algumas modalidades, o construto doador, RNA guia de albumina e/ou Cas nuclease pode ser entregue todo dia, a cada dois dias, a cada três dias, a cada quatro dias, toda semana, a cada duas semanas, a cada três semanas ou a cada quatro semanas. Em algumas modalidades, um método para tratar AATD inclui adicionalmente administrar um RNA guia de SERPINA1 que compreende qualquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID Nos: 1.000 a 1.128. Em algumas modalidades, gRNAs de SERPINA1 que compreendem quaisquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID Nos: 1.000 a 1.128 administradas para tratar AATD. Os RNAs guia de SERPINA1 podem ser administrados junto com uma proteína Cas ou um mRNA ou vetor que codifica uma proteína Cas, como, por exemplo, Cas9.

[0246] Em algumas modalidades, um método para tratar AATD inclui reduzir ou impedir o acúmulo de AAT (por exemplo, AAT não funcional mutante) no soro, fígado, tecido de fígado, células de fígado e/ou hepatócitos de um indivíduo é fornecido que compreende administrar um RNA guia de SERPINA1 que compreende quaisquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID NOs: 1.000 a 1.128. Em algumas modalidades, gRNAs de SERPINA1 que compreendem quaisquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID NOs: 1.000 a 1.128 são administrados para reduzir ou impedir o acúmulo de AAT (por exemplo, AAT não funcional mutante) no fígado, tecido de fígado, células de fígado e/ou hepatócitos. Os gRNAs podem ser administrados junto com um agente de ligação de DNA guiado por RNA como uma proteína Cas ou um mRNA ou vetor que codifica uma proteína Cas, como, por exemplo, Cas9.

[0247] Em algumas modalidades, os gRNAs de SERPINA1 que compreendem as sequências guia da Tabela 3 junto com uma proteína Cas induzem DSBs e união de extremidade não homóloga (NHEJ) durante o reparo leva a uma mutação no gene de SERPINA1. Em algumas modalidades, NHEJ leva a

uma deleção ou inserção de um nucleotídeo (ou nucleotídeos), que induz a um deslocamento de quadro ou mutação sem sentido no gene de SERPINA1. Em algumas modalidades, os gRNAs que compreendem as sequências guia de Tabela 2 junto com uma proteína Cas induzem DSBs e reparo de NHEJ mediam a inserção do construto de ácido nucleico de modelo. Em algumas modalidades, a inserção do ácido nucleico de modelo aumenta níveis de proteína AAT secretada. Em algumas modalidades, a inserção do ácido nucleico de modelo aumenta os níveis de proteína AAT heteróloga secretada. Em algumas modalidades, a inserção do ácido nucleico de modelo aumenta níveis de proteína AAT de sangue, soro e/ou plasma.

[0248] Em algumas modalidades, administrar os RNAs guia de SERPINA1 divulgados no presente documento reduz os níveis de alfa-1 antitripsina (AAT) que sofreu mutação produzidos pelo indivíduo e, portanto, impede o acúmulo e agregação de AAT no fígado.

[0249] Em algumas modalidades, uma administração única do RNA guia de SERPINA1 divulgada no presente documento é suficiente para realizar *knockdown* da expressão da proteína mutante. Em algumas modalidades, uma administração única do RNA guia de SERPINA1 divulgado no presente documento é suficiente para realizar *knockdown* ou *knockout* de expressão da proteína mutante. Em outras modalidades, mais do que uma administração do RNA guia de SERPINA1 divulgado no presente documento pode ser benéfica para maximizar a edição por meio de efeitos cumulativos.

[0250] Em algumas modalidades, administrar os RNAs guia de inserção divulgados no presente documento aumenta os níveis de alfa-1 antitripsina (AAT) de circulação produzida pelo indivíduo e, portanto, impede danos associados à alta atividade de elastase de neutrófilo.

[0251] Em algumas modalidades, uma administração única ou múltiplas administrações de um RNA guia de inserção divulgado no presente documento é suficiente para aumentar a expressão de uma proteína AAT funcional. Em algumas modalidades, uma administração única ou múltiplas administrações do RNA guia de inserção divulgada no presente documento é suficiente para suplementar ou restaurar a expressão da atividade de proteína AAT. Em algumas modalidades, o RNA guia de inserção resulta em níveis de soro de AAT aumentados, por exemplo,

para níveis protetores (por exemplo, em ou acima de 80 mg/dl conforme medido por imunodifusão, em ou acima de 50 mg/dl conforme medido com o uso de nefelometria ou imunoturbidimetria e um padrão purificado). Em algumas modalidades, o RNA guia de inserção resulta em níveis de soro de AAT aumentados, por exemplo, para níveis normais (por exemplo, 150 a 350 mg/dl, conforme medido por imunodifusão, 90 a 200 mg/dl conforme medido com o uso de nefelometria ou imunoturbidimetria e um padrão purificado). Em algumas modalidades, o RNA guia de inserção resulta em melhora em classificação histológica de doença de fígado associada a AATD, por exemplo, por 1, 2, 3 ou mais pontos, em comparação com controle, por exemplo, antes e após tratamento. Em algumas modalidades, o RNA guia de inserção resulta em melhora de pontuação de fibrose de Ishak em comparação com controle, por exemplo, antes e após tratamento. Em algumas modalidades, uma administração única melhora as medidas de doença de pulmão, por exemplo, conforme ensaiado por teste de função pulmonar (PFT), capacidade residual funcional (RFC), e/ou perda de densidade de pulmão em capacidade de pulmão total (TLC). Em outras modalidades, mais do que uma administração do RNA guia de inserção divulgado no presente documento pode ser benéfica para maximizar a edição por meio de efeitos cumulativos.

[0252] Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento com as composições fornecidas no presente documento é vista em 1 ano, 2 anos, 3 anos, 4 anos, 5 anos ou 10 anos após entrega.

[0253] Em algumas modalidades, o tratamento atrasa ou impede a progressão de doença de pulmão associada a AATD. Em algumas modalidades, o tratamento melhora as medidas de doença de pulmão. Em algumas modalidades, a doença de pulmão é medida por mudanças em estrutura de pulmão, função de pulmão ou sintomas no indivíduo. Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento é medida por tempo de sobrevivência aumentado do indivíduo.

[0254] Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento é medida pelo atraso de desenvolvimento de indicações pulmonares. Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento é medida por melhora clínica em quaisquer um ou mais COPD, enfisema ou dispneia. Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento

é medida por melhora em quaisquer um ou mais dentre tosse, produção de esputo ou sibilos.

[0255] Em algumas modalidades, o tratamento atrasa ou impede a progressão de doença de fígado. Em algumas modalidades, o tratamento melhora as medidas de doença de fígado. Em algumas modalidades, a doença de fígado é medida por mudanças em estrutura de fígado, função de fígado ou sintomas no indivíduo.

[0256] Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento é medida pela capacidade e atrasar ou evitar um transplante de fígado no indivíduo. Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento é medida por tempo de sobrevivência aumentado do indivíduo.

[0257] Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento é medida por redução em enzimas de fígado em sangue. Em algumas modalidades, as enzimas de fígado são alanina transaminase (ALT) ou aspartato transaminase (AST).

[0258] Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento é medida atrasando-se o desenvolvimento de tecido de cicatriz ou diminuição em tecido de cicatriz no fígado com base em resultados de biópsia.

[0259] Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento é medida com o uso de resultados relatados pelo paciente, como fadiga, fraqueza, coceira, perda de apetite, perda de peso, náusea ou inchaço. Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento é medida por diminuições em edema, ascite ou icterícia. Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento é medida por diminuições em hipertensão portal. Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento é medida por diminuições em taxas de câncer de fígado.

[0260] Em algumas modalidades, a eficácia de tratamento é medida com o uso de métodos de imageamento. Em algumas modalidades, os métodos de imageamento são ultrassom, tomografia computadorizada, imagem por ressonância magnética ou elastografia.

[0261] Em algumas modalidades, o níveis de AAT de soro e/ou fígado (por exemplo, AAT não funcional mutante) são reduzidos em 40 a 50%, 50 a 60%, 60 a 70%, 70 a 80%, 80 a 90%, 90 a 95%, 95 a 98%, 98 a 99% ou 99 a 100% em comparação com níveis de soro e/ou fígado de AAT (por exemplo, AAT não

funcional mutante) antes da administração da composição.

[0262] Em algumas modalidades, a porcentagem de edição do gene de SERPINA1 está entre 30 e 99%. Em algumas modalidades, a porcentagem de edição está entre 30 e 35%, 35 e 40%, 40 e 45%, 45 e 50%, 50 e 55%, 55 e 60%, 60 e 65%, 65 e 70%, 70 e 75%, 75 e 80%, 80 e 85%, 85 e 90%, 90 e 95% ou 95 e 99%.

[0263] Em algumas modalidades, o uso de qualquer um ou mais RNAs guia (gRNA de albumina; e/ou gRNA de SERPINA1) que compreende qualquer uma ou mais das sequências guia na Tabela 1 ou Tabela 2 ou Tabela 3 (por exemplo, em uma composição fornecida no presente documento) é fornecido para a preparação de um medicamento para tratar um indivíduo humano que tem AATD.

[0264] Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece terapias de combinação que compreendem qualquer um ou mais do sgRNAs que compreendem qualquer uma ou mais das sequências guia divulgadas na Tabela 1 ou Tabela 2 junto com uma terapia de aumento adequada para aliviar os sintomas de pulmão de AATD. Em algumas modalidades, a terapia de aumento para doença de pulmão é terapia intravenosa com AAT purificada de plasma humano, conforme descrito em Turner, BioDrugs dezembro de 2013; 27(6): 547 a 558. Em algumas modalidades, a terapia de aumento é com Prolastin®, Zemaira®, Aralast® ou Kamada®.

[0265] Em algumas modalidades, a terapia de combinação compreende qualquer um ou mais dos gRNAs que compreende qualquer uma ou mais das sequências guia divulgadas na Tabela 1 ou Tabela 2, junto com um siRNA que alveja ATT ou ATT mutante. Em algumas modalidades, o siRNA é qualquer siRNA com capacidade para reduzir adicionalmente ou eliminar a expressão de AAT de tipo selvagem ou mutante. Em algumas modalidades, o siRNA é administrado após qualquer um ou mais dos gRNAs que compreende qualquer uma ou mais das sequências guia divulgadas na Tabela 1 ou Tabela 2. Em algumas modalidades, o siRNA é administrado de modo regular após o tratamento com qualquer uma das composições de gRNA fornecidas no presente documento.

[0266] Em algumas modalidades, a terapia de combinação compreende qualquer um ou mais dos gRNAs que compreende qualquer uma ou mais das

sequências guia divulgadas na Tabela 1 ou Tabela 2 junto com um ou mais tratamentos para cessação do tabagismo, vacinações preventivas, broncodilatadores, oxigênio suplementar quando indicado e reabilitação física em um programa similar àquele projetado para pacientes com COPD relacionada ao tabagismo.

[0267] Esta descrição e modalidades exemplificativas não devem ser tomadas como limitantes. Para os fins deste relatório descritivo e modalidades anexas, a menos que seja indicado de outra forma, todos os números que expressam quantidades, porcentagens ou proporções, e outros valores numéricos usados no relatório descritivo e nas modalidades, devem ser entendidos como modificados em todos os casos pelo termo “cerca de”, na medida em que os mesmos não estão ainda modificados assim. Consequentemente, a menos que seja indicado o contrário, os parâmetros numéricos apresentados no seguinte relatório descritivo e modalidades anexas são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas a serem obtidas. Pelo menos, e sem tentar limitar a aplicação da doutrina de equivalentes ao escopo das modalidades, cada parâmetro numérico deve ao menos ser interpretado à luz do número de dígitos significativos apresentados e aplicando-se as técnicas comuns de arredondamento.

[0268] Sequência de Proteínas de AAT Humana (SEQ ID NO: 700) NCBI Ref: NP_000286:

MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLAEDPQGDAAQKTDTSHHDQDHPTFNKITPNLAEF
AFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIH
EGFQELLRTLNQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDKFLEDVKKLYHSEAFTVNFGDT
EEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDTVFALVNYIFFKGKWERPFEVKDTEEED
FHVDQVTTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQH
LENELTHDIITKFLENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVFSNGADLSGV
TEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNT
KSPLFMGKVVNPTQK

[0269] Sequência de Nucleotídeo de AAT Humana (SEQ ID NO: 701) NCBI Ref: NM_000295):

ACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGC
GTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTG
TTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCC
CGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCC
TCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCTTCT
GTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCCT
GGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCCACCATGA
TCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTC
AGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCC
CAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACAC
TCACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGC
TCAGATCCATGAAGGCTTCCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGC
CAGCTCCAGCTGACCACCGGCAATGGCCTGTTCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTA
GTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTG
TCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGA
AGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAG
TTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGA
AGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAA
GGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTG
TCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCC
TGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATGAACTCACCCACGATATCA
TCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACCCA
AACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCCTGGGTCAACTGGGCAT
CACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACC

CCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGG
GACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCCC
GAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGT
CTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAAAATAACTGCCTCTCGC
TCCTCAACCCCTCCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGAAGG
GTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCATGTTTTCTCTGAG
TCTCCCTTTGCCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTAACAGTGCTGTCTTCG
GGCCCCCTGAACTGTGTTCATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTT
GAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGG
AGGGCTCCAGTCTTCCTTGTCCTGTCTTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGG
AGGAACCAGATACCAGCCATGACCCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCCC
TGCTCATCCCCCACTCCCCCCCCACCCAGAGTTGCTCATCCTGCCAGGGCTGGCTG
TGCCCACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAACTGCCTGATCGTGCCGTG
GCCCAGTTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCCTCCTCTT
GACCCGCTGTCACCTAACCAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACTTCTGGAA
AATGACTGAGGCAGATTCTTCCTGAAGCCCATTCTCCATGGGGCAACAAGGACA
CCTATTCTGTCCTTGTCCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTT
TAGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTCT
ATCTCCTCCTCAGACTTGACCAGGCCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCCTAT
ATCCCTTCTCCTCCCTAGTCACATGGCCATAGGCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGC
CATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGCACATCACCCATTGACCCCC
GCAACCCCTCCCTTTCCTCCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACT
TCTTTGTGCCTGTTGCTGTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTG
CCACGGCAGGAGGCTGTTCCTGAATAGCCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCC
TTCCATCCTCCAAGGCCCTGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCCTGGGC
CCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTCTACCAGGAATGGCCTTGTCCT
ATGGAAGGCACTGCCCCATCCCAAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAACCACTCA
CTGTCATGAATGTGTACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAAATAGTGATTTC
GATAGTTCAAAATGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTCAGTCTAATCAATGGA
TACCGACTGTTTCCCACACAAGTCTCCTGTTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCC
TTTCACTCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCATCACCAAGCCCCCTAGGATG
ACACCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCTGA
CAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTGCTA
GTAAGACCTGCCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTAT
ACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCTTGCA

[0270] Polipeptídeo de alfa 1-antitripsina codificado por P00450 (SEQ ID NO: 702):

EDPQGDAAQKTDTSHHDQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIA
TAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNQPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVDKFLEDVKKLYHSEAFTVNFGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLV
KELDRDTVFALVNYIFFKGKWERPFEVKDTEEEDFHVDQVTTVKVPMMKRLGMFNI
QHCKKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLENEDRRSASL
HLPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKG
TEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK

[0271] Sequência de Sinal de Proteínas de AAT Humana (SEQ ID NO: 1.129)

MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLA

EXEMPLOS

[0272] Os seguintes exemplos são fornecidos para ilustrar determinadas modalidades divulgadas e não devem ser interpretadas como limitantes do escopo desta divulgação de maneira alguma.

EXEMPLO 1- MATERIAIS E MÉTODOS

CLONAGEM E PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO

[0273] Um construto de inserção bidirecional flanqueado por suas ITRs de AAV2 foi sintetizado e clonado em pUC57-Kan por um fornecedor comercial. O construto resultante (P00147) foi usado como o vetor de clonagem parental para outros vetores. Os outros construtos de inserção (sem ITRs) também foram comercialmente sintetizados e clonados em pUC57. O plasmídeo purificado foi digerido com a enzima de restrição BglII (New England BioLabs, nº de cat R0144S), e os construtos de inserção foram clonados no vetor parental. Plasmídeo foi propagado em E. coli Quimicamente Competente Stbl3™ (Thermo Fisher, nº de cat C737303).

PRODUÇÃO DE AAV

[0274] A tripla transfecção em células HEK293 foi usada para acondicionar genomas com construtos de interesse para produção de AAV8 e AAV-DJ e vetores resultantes foram purificados tanto a partir de células lisadas quanto de meio de cultura através do método de ultracentrifugação de gradiente de iodixanol (Consultar, por exemplo, Lock et al, Hum Gene Ther. outubro de 2010;21(10):1.259 a 1.271). Os plasmídeos usados na transfecção tripla que conteve o genoma com construtos de interesse são citados nos Exemplos por um número “PXXXX”, consultar também, por exemplo, a Tabela 14. AAV isolado foi dialisado em tampão de armazenamento (PBS com 0,001% de Pluronic F68). O titulador de AAV foi determinado por qPCR com o uso de iniciadores/sonda localizados dentro da região de ITR.

TRANSCRIÇÃO *IN VITRO* (“IVT”) DE MRNA NUCLEASE

[0275] mRNA de Cas9 de Streptococcus pyogenes (“Spy”) com cap e poliadenilado que contém pseudo-U de N1-metila foi gerado por transcrição *in vitro*

com o uso de um modelo de DNA de plasmídeo linearizado e RNA polimerase de T7. De modo geral, DNA de plasmídeo que contém um promotor T7 e uma região de 100 nt poli (A/T) foi linearizado incubando-se a 37 °C com Xbal para completar a digestão seguida por inativação térmica de Xbal a 65 °C por 20 min. O plasmídeo linearizado foi purificado a partir de sais de enzima e tampão. A reação de IVT para gerar mRNA modificado por Cas9 foi incubada a 37 °C por 4 horas nas seguintes condições: 50 ng/µl de plasmídeo linearizado; 2 mM cada de GTP, ATP, CTP e pseudo-UTP de N1-metila (Trilink); 10 mM de ARCA (Trilink); 5 U/µl de RNA polimerase de T7 (NEB); 1 U/µl de inibidor de RNase Murino (NEB); 0,004 U/µl de pirofosfatase de E. coli inorgânica (NEB); e 1x tampão de reação. TURBO DNase (ThermoFisher) foi adicionada a uma concentração final de 0,01 U/µl, e a reação foi incubada por mais 30 minutos para remover o modelo de DNA. O mRNA de Cas9 foi purificado com o uso de um kit de Limpeza de Transcrição MegaClear de acordo com o protocolo do fabricante (ThermoFisher). Alternativamente, o mRNA de Cas9 foi purificado com o uso de precipitação de LiCl, precipitação de acetato de amônia e precipitação de acetato de sódio ou com o uso de um método de precipitação de LiCl seguido por purificação adicional através de filtragem de fluxo tangencial. A concentração de transcrito foi determinada medindo-se a absorção de luz em 260 nm (Nanodrop), e a transcrição foi analisada por eletroforese capilar pelo Bioanalyzer (Agilent).

[0276] Os mRNAs de Cas9 abaixo compreendem ORF de Cas9, SEQ ID NO: 288 ou uma sequência da Tabela 24 do documento nº PCT/US2019/053423 (que é incorporado aqui a título de referência).

SEQ ID NO: 288:

ATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGTTGG
GCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGG
AACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGAC
TCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTAC
ACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATG
GCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGG
AGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAGTGG
CGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACT
CAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAA
ATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTG
GATAAGCTTTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAAAACC
CAATCAATGCTAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAA
GTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACG
GACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCC
AATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGAC
GACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCC
TTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAA
CACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGA
GCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGA
AAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACAT
CGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGA
AAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCT
CCGGAAACAGAGAACCTTTGACAACGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGG
TGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGAC
AACCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGC
CCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAA
ACCATCACTCCTTGGAATTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAA
AGCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTG
CTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTA
AAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAAC
AGAAGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCA

AGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAA
TCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCT
GAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCT
GGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGA
GAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACTCAA
GCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATT
CGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCCTCAAATCGGATGGCTTCG
CTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGA
CATCCAAAAAGCACAAGTGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGC
GAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACTGTGAAGGT
GGTCGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGAT
TGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTCCCGCG
AAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTG
AAAGAGCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTAC
TATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGG
TTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACT
CGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATA
ATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCC
TGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGC
GCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCG
AGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGGACTCCCGCATGAACA
CTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGA
AAAGCAAACTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGA
AATCAACAACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGTACC
GCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTAC
AAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAA
AGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACTGAA
ATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGA
GAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCAAA
GTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGC
GGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCA
CGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTC
GCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCTC
AAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGAG
AAGAACCCGATTGATTTCCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGAT
CTGATCATCAAACTCCCCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGC
GCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTA
GCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAAAAACTCAAAGGGTC
ACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCT
GGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGAC
GCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATC
AGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACCCTGACTAACCTGGGAGCC
CCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCA
CCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACG
AAACTAGGATCGATCTGTCGCAGCTGGGTGGCGAT

FORMULAÇÕES LIPÍDICAS PARA ENTREGA DE mRNA E gRNA de Cas9

[0277] mRNA e gRNA de Cas9 foram entregues às células e animais com o uso de formulações lipídicas que compreendem lipídio ionizável octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-

(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propila, também denominado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato), colesterol, DSPC e PEG2k-DMG.

[0278] Para experimentos que utilizam formulações lipídicas pré-misturadas (denominadas no presente documento “pacotes de lipídio”), os componentes foram reconstituídos em 100% de etanol em uma razão molar de lipídio ionizável:colesterol:DSPC:PEG2k-DMG de 50:38:9:3, antes de serem misturados com cargas de RNA (por exemplo, mRNA e gRNA de Cas9) em uma razão molar de amina de lipídio para fosfato de RNA (N:P) de cerca de 6,0, conforme descrito adicionalmente no presente documento.

[0279] Para experimentos que utilizam os componentes formulados como nanopartículas lipídicas (LNPs), os componentes foram dissolvidos em 100% de etanol em várias razões molares. As cargas de RNA (por exemplo, mRNA e gRNA de Cas9) foram dissolvidas em 25 mM de citrato, 100 mM de NaCl, pH 5,0, que resulta em uma concentração de carga de RNA de aproximadamente 0,45 mg/ml.

[0280] As LNPs foram preparadas com o uso de uma técnica de fluxo cruzado que utiliza mistura por jato de colisão do lipídio em etanol com dois volumes de soluções de RNA e um volume de água. O lipídio em etanol foi misturado através de uma mistura cruzada com os dois volumes de solução de RNA. Uma quarta corrente de água foi misturada com a corrente de saída do cruzamento através de uma baliza em linha (Consultar o documento nº WO2016010840 Figura 2). As LNPs foram mantidas por 1 hora em temperatura ambiente, e diluídas adicionalmente com água (aproximadamente 1:1 em v/v). LNPs diluídas foram concentradas com o uso de filtragem de fluxo tangencial em um cartucho de folha plana (Sartorius, 100 kD de MWCO) e, então, o tampão trocado através de diafiltração em 50 mM de Tris, 45 mM de NaCl, 5% (em p/v) de sacarose, pH 7,5 (TSS). Alternativamente, a troca de tampão final em TSS foi completada com colunas de dessalinização PD-10 (GE). Caso necessário, as formulações foram concentradas por centrifugação com filtros centrífugos de 100 kDa da Amicon (Millipore). A mistura resultante foi, então, filtrada com o uso de um filtro estéril de 0,2 μM. A LNP final foi armazenada a 4 °C ou -80 °C até o uso posterior. As LNPs foram formuladas em uma razão

molar de lipídio ionizável:colesterol:DSPC:PEG2k-DMG de 50:38:9:3, com uma razão molar de amina de lipídio para fosfato de RNA (N:P) de cerca de 6,0 e uma razão de gRNA para mRNA de 1:1 em peso.

CULTURA CELULAR E ENTREGA IN VITRO DE mRNA de Cas9, gRNA E CONSTRUTOS DE INSERÇÃO HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS

[0281] Hepatócitos de camundongo primários (PMH), hepatócitos de rato primários (PRH) e hepatócitos de humano primários (PHH) foram descongelados e ressuspensos em meio de descongelamento de hepatócito com complementos (ThermoFisher) seguido por centrifugação. O sobrenadante foi descartado, e as células peletizadas ressuspensas em meio de plaqueamento de hepatócito mais pacote de complemento (ThermoFisher). Células foram contadas e colocadas em placa em placas de 96 poços revestidas com colágeno I Bio-coat em uma densidade de 33.000 células/poço para PHH, 50.000 células/poço para PRH, 35.000 células/poço para PRH e 15.000 células/poço para PMH. Permitiu-se que células em placa assentassem e aderissem por 6 horas em uma incubadora de cultura de tecido a 37 °C e atmosfera de 5% de CO_2. Após incubação, as células foram verificadas para formação de monocamada e foram lavadas duas vezes com manutenção de hepatócito antes e incubadas a 37 °C.

[0282] Para experimentos com a utilização de entrega de MessengerMax, 100 ng de mRNA de Cas9 e gRNA 25 nM foram, cada um, separadamente diluídos em meio Opti-MEM. O reagente MessengerMAX foi diluído em Opti-MEM e incubado por 10 min antes de adicionar em cada tubo que contém mRNA de Cas9 ou gRNA. O mesmo foi incubado por 5 min antes de ser ajustado para 50 ul com meio de manutenção de hepatócito. O meio foi aspirado das células antes da transfecção de 50 ul de mistura de MessengerMAX/mRNA de Cas9 e mistura de MessengerMAX/gRNA para as células, seguido por adição de AAV (diluído em meio de manutenção) em uma MOI de 1e5 para PMH ou 1e6 para PRH. O meio foi coletado 72 horas depois do tratamento para análise e células foram coletadas para análise adicional, conforme descrito no presente documento.

[0283] Para experimentos com a utilização de entrega de LNP, vários volumes de LNP contendo a concentração desejável de Cas9/sgRNA foram diluídos com meio de manutenção de hepatócito suplementado com 3% de FBS e

incubados a 37 graus por 10 min. O meio foi aspirado das células antes da adição de 100 ul de mistura de LNP/meio às células, seguido por adição de AAV (diluído em meio de manutenção) em uma MOI de 1e5 para PMH ou 1e6 para PRH. O meio foi coletado 72 horas depois do tratamento para análise e células foram coletadas para análise adicional, conforme descrito no presente documento. Para experimentos que utilizam entrega de pacote de lipídio, mRNA e gRNA de Cas9 foram, cada um, separadamente diluídos em 2 mg/ml no meio de manutenção e 2,9 µl de cada um foram adicionados aos poços (em uma placa de Eppendorf de 96 poços) que contêm 12,5 µl de 50 mM de citrato de sódio, 200 mM de cloreto de sódio a pH 5 e 6,9 µl de água. 12,5 µl de formulação de pacote de lipídio foram, então, adicionados, seguido por 12,5 µl de água e 150 µl de TSS. Cada poço foi diluído em 20 ng/µl (com relação ao teor de RNA total) com o uso de meio de manutenção de hepatócito e, então, diluído em 10 ng/µl (com relação ao teor de RNA total) com 6% de soro de camundongo fresco. O meio foi aspirado das células antes da transfecção e 40 µl das misturas de pacote de lipídio/RNA foram adicionados às células, seguido pela adição de AAV (diluído em meio de manutenção) em uma MOI de 1e5. O meio foi coletado 72 horas depois do tratamento para análise e células foram coletadas para análise adicional, conforme descrito no presente documento.

ENSAIOS DE LUCIFERASE

[0284] Para experimentos que envolvem detecção de NanoLuc em meio celular, um volume de Substrato de Ensaio de Luciferase Nano-Glo® foi combinado com 50 volumes de Tampão de Ensaio de Luciferase Nano-Glo®. O ensaio foi executado em um executador Promega Glomax em um tempo de integração de 0,5 segundo com o uso de 50 ul de amostras ou 1:10 de diluição de amostras (50 µl de reagente + 40 µl de água + 10 µl de meio de célula). Para experimentos que envolvem a detecção da marcação HiBit em meio celular, Proteína LgBiT e Substrato Extracelular de HiBiT Nano-GloR foram diluídos em 1:100 e 1:50, respectivamente, em Tampão Extracelular de HiBiT Nano-GloR em temperatura ambiente. O ensaio foi executado em um executador Promega Glomax em um tempo de integração de 1,0 segundo com o uso de diluição de 1:10 de amostras (50 µl de reagente + 40 µl de água + 10 µl de meio celular).

A ENTREGA IN VIVO DE LNP E/OU AAV

[0285] Camundongos e ratos foram dosados com AAV, LNP, tanto AAV quanto LNP ou veículo (PBS + 0,001% de Plurônico para veículo de AAV, TSS para veículo de LNP) por meio da veia caudal lateral. AAV foi administrado em um volume de 0,1 ml por animal com quantidades (genomas vetoriais/camundongo, “vg/ms”) conforme descrito no presente documento. LNPs foram diluídas em TSS e administradas em quantidades, conforme indicado no presente documento, em cerca de 5 µl/grama de peso corporal. Tipicamente, camundongos foram injetados primeiro com AAV e, então, com LNP, caso aplicável. Em vários pontos no tempo depois do tratamento, soro e/ou tecido hepático foi coletado para determinadas análises conforme descrito adicionalmente abaixo.

SEQUENCIAMENTO DE PRÓXIMA GERAÇÃO (“NGS”) E ANÁLISE PARA EFICIÊNCIA DE CLIVAGEM NO ALVO

[0286] O sequenciamento profundo foi utilizado para identificar a presença de inserções e deleções introduzidas pela edição de gene, por exemplo, dentro do íntron 1 de albumina. Iniciadores de PCR foram projetados ao redor do sítio-alvo e a área genômica de interesse foi amplificada. Projeto de sequência iniciadora foi realizado como é padrão no campo.

[0287] PCR adicional foi realizada de acordo com os protocolos do fabricante (Illumina) para adicionar química para sequenciamento. Os amplicons foram sequenciados em um instrumento Illumina MiSeq. As leituras foram alinhadas ao genoma de referência após eliminação daqueles que têm baixa pontuação de qualidade. Os arquivos resultantes que contêm as leituras foram mapeados para o genoma de referência (arquivos BAM), quando as leituras que sobrepuseram a região-alvo de interesse foram selecionadas e o número de leituras de tipo selvagem contra o número de leituras que contêm uma inserção ou deleção (“indel”) foi calculado.

[0288] A porcentagem de edição (por exemplo, a “eficiência de edição” ou “percentual de edição”) é definida como o número total de leituras de sequência com inserções ou deleções (“indels”) sobre o número total de leituras de sequência, que incluem tipo selvagem.

ANÁLISE ELISA DE ALFA 1-ANTITRIPSINA HUMANA (hA1AT)

[0289] Para estudos *in vivo*, o sangue foi coletado e o soro foi isolado, conforme indicado. Os níveis de alfa 1-antitripsina humana total foram determinados com o uso de um Kit ELISA de Alfa 1-Antitripsina (Human) (Aviva Biosystems, nº de cat OKIA00048 ou Abeam, nº de cat ab 108799) de acordo com o protocolo do fabricante. Níveis de hA1AT em soro foram quantificados a partir de uma curva padrão com o uso de ajuste logístico de 4 parâmetros e expressos como µg/ml de soro.

ANÁLISE LC-MS/MS DE ALFA 1-ANTITRIPSINA HUMANA (hA1AT)

[0290] Para estudos *in vivo*, o sangue foi coletado e o soro foi isolado, conforme indicado. Os níveis de hA1AT total foram determinados com o uso de cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS). hA1AT nativa liofilizada purificada derivada de plasma humano foi obtida de Athens Research & Technology. hA1AT liofilizada foi dissolvida em soro de bezerro fetal na concentração apropriada para padrões e controles de qualidade. As amostras de soro foram diluídas 10 vezes em soro de bezerro fetal. 10 µl de padrões internos marcados estáveis 1.900 ng/ml foram adicionados a 10 µl das amostras, padrões e controles de qualidade diluídos em soro de bezerro fetal. As amostras foram, então, desnaturadas com 25 µl de trifluoroetanol, diluídas com 25 µl de bicarbonato de amônio 50 mM imediatamente antes de 5 µl de DTT 200 mM serem adicionados e incubados por 30 min a 55 °C. As amostras reduzidas foram tratadas com 10 µl de iodacetamida 200 mM e incubadas por uma hora em temperatura ambiente no escuro com agitação. As amostras foram diluídas com 400 µl de bicarbonato de amônio 50 mM e tratadas com 20 µl de tripsina 1 g/l e incubadas de um dia para o outro a 37 °C. A digestão foi terminada com 10 µl de ácido fórmico.

IDENTIFICAÇÃO DE TIPO SELVAGEM OU PEPTÍDEOS DEhA1AT MUTANTES:

[0291] O digerido de A1AT puro foi analisado por LC-MS/MS e peptídeos de assinatura que continham os alelos mutantes e de tipo selvagem foram identificados. Especificamente, a hA1AT mutante (Glu342Lys) foi detectada com o uso de peptídeo específico mutante marcado pesado (AVLTIDK (SEQ ID NO: 1130)), e a hA1AT de tipo selvagem foi detectada com o uso de um peptídeo específico de tipo selvagem marcado pesado diferente (AVLTIDEK (SEQ ID NO:

1131)). A concentração de hA1AT de tipo selvagem e mutante combinada foi detectada com o uso de um terceiro peptídeo marcado pesado (SASLHLPK (SEQ ID NO: 1132)). Cada um desses peptídeos foi sintetizado por incorporação de uma $^{13}C_6{}^{15}N$-leucina única na posição observada por sublinhado em negrito nas SEQ ID NOs: 1.130 a 1.132).

DETERMINAR NÍVEIS DE hA1AT DE SORO COM O USO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA:

[0292] O soro foi digerido de acordo com os métodos descritos acima. Após a digestão, o soro digerido foi carregado na coluna e analisado por LC-MS/MS conforme descrito abaixo. A identificação de e níveis de hA1AT de tipo selvagem e mutante mais tipo selvagem combinado foi obtida por comparação com uma curva de calibração. Os níveis de hA1AT mutantes foram obtidos por calibração interna de ponto único.

CONDIÇÕES DE LC-MS/MS:

[0293] A análise de LC-MS/MS foi realizada com uma coluna C8 de 2,1 x 50 mm. A fase móvel A consistiu em 0,1% de ácido fórmico em água e a fase móvel B consistiu em 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. Uma lavagem de agulha consistiu em 0,1% de ácido fórmico, 1% de dimetilsulfoxido em Metanol: Água (35:65). A análise do digerido de A1AT foi realizada em um espectrômetro de massa com os seguintes parâmetros: (a) Fonte Iônica: Turbo Spray IonDrive; (b) Gás de Cortina: 35,0; (c) Gás de Colisão: Meio; (d) Tensão de Aspersão Iônica: 5.500; (e) Temperatura: 500 °C; (f) Gás de Fonte Iônica 1: 50; e (g) Gás de Fonte Iônica 2: 50.

EXEMPLO 2 - EXAME IN VITRO DE UM CONSTRUTO BIDIRECIONAL ATRAVÉS DE SÍTIOS-ALVO EM HEPATÓCITOS DE CAMUNDONGO PRIMÁRIOS

[0294] O experimento descrito nesse Exemplo testou a inserção de hSERPINA1 em um painel de sítios-alvo que utiliza 20 diferentes gRNAs que alvejam íntron 1 de albumina murina em hepatócitos de camundongo primários (PMH).

[0295] Os materiais de entrega de pacote de ssAAV e lipídio testados nesse Exemplo foram preparados e entregues aos PMH, conforme descrito no Exemplo

1, com o AAV em uma MOI de 1e5. Depois do tratamento, meio de DNA e célula genômico isolado foi coletado para análise de edição e expressão de transgene, respectivamente. O vetor-repórter compreendeu um ORF de NanoLuc (além de GFP) que pode ser medido através da detecção de fluorescência à base de luciferase, conforme descrito no Exemplo 1, plotada na Figura 1C como unidades de luciferase relativa (“RLU”). Um esquema do vetor testado é fornecido na Figura 1A. Os gRNAs testados são mostrados nas Figuras 1B e 1C, com o uso de um número encurtado para aqueles listados na Tabela 11 (por exemplo, quando os zeros iniciais são omitidos, por exemplo, quando “G551” corresponde a “G000551” na Tabela 11).

[0296] Conforme mostrado na Figura 1B e na Tabela 31, níveis variados de edição foram detectados. Entretanto, conforme mostrado na Figura 1C e na Tabela 31, altos níveis de edição não necessariamente resultaram em expressão mais eficiente dos transgenes.

TABELA 31 - FORMAÇÃO DE INDEL EM LÓCUS DE MALBUMINA E EXPRESSÃO DE GFP DENanoLuc

ID guia	P00415		P00415	
	Indel Médio (%)	Desvio Padrão de Indel (%)	Luciferase Média (RLU)	Desvio Padrão de Luciferase (RLU)
G000551	66,73	4,90	78.633,33	20.274,70
G000552	90,37	1,01	205.333,33	30.664,86
G000553	80,50	0,85	471.666,67	134.001,00
G000554	70,60	2,91	232.666,67	67.002,49
G000555	40,47	4,75	155.666,67	15.947,83
G000666	65,90	3,99	313.000,00	15.394,80
G000667	31,67	2,29	153.000,00	30.805,84
G000668	68,30	4,90	429.000,00	120.751,80
G000669	18,70	1,25	46.466,67	6.543,19
G000670	51,97	2,06	424.666,67	36.473,73
G011722	4,20	0,26	24.000,00	8.915,16
G011723	5,93	0,15	26.100,00	8.109,87
G011724	7,13	1,27	30.933,33	3.365,02
G011725	2,53	0,65	20.366,67	13.955,05

G011726	12,43	1,33	14.950,00	8.176,03
G011727	16,20	2,69	86.700,00	5.023,94
G011728	15,50	1,56	38.166,67	13.829,08
G011729	6,00	1,01	26.966,67	16.085,50
G011730	7,33	0,59	41.233,33	25.687,03
G011731	24,87	1,01	20.756,67	13.096,20
AAV Apenas	0,10	0,00	207,00	1,41

EXEMPLO 3- EXAME *IN VITRO* DE CONSTRUTOS BIDIRECIONAIS ATRAVÉS DE SÍTIOS-ALVO EM HEPATÓCITOS CINOMOLGOS PRIMÁRIOS E HUMANOS PRIMÁRIOS

[0297] Nesse Exemplo, vetores de ssAAV que compreendem um construto bidirecional foram testados através de um painel de sítios-alvo que utilizam gRNAs que alvejam íntron 1 de albumina cinomolga (“cino”) e humana em hepatócitos cinos primários (PCH) e humanos primários (PHH), respectivamente.

[0298] Os materiais de entrega de pacote de ssAAV e lipídio testados nesse Exemplo foram preparados e entregues em PCH e PHH, conforme descrito no Exemplo 1. Depois do tratamento, meio de DNA e célula genômico isolado foi coletado para análise de edição e expressão de transgene, respectivamente. Cada um dos vetores compreendeu um repórter que pode ser medido através da detecção de fluorescência à base de luciferase, conforme descrito no Exemplo 1 (derivado de plasmídeo P00415), plotado nas Figuras 2B e 3B como unidades de luciferase relativa (“RLU”). Por exemplo, os vetores de AAV contiveram o ORF de NanoLuc (além de GFP). Esquemas dos vetores testados são fornecidos nas Figuras 2B e 3B. Os gRNAs testados são mostrados em cada uma das Figuras com o uso de um número encurtado para aqueles listados na Tabela 9 e Tabela 13.

[0299] Conforme mostrado na Figura 2A para PCH e Figura 3A para PHH, níveis variados de edição foram detectados para cada uma das combinações testadas (dados de edição para algumas combinações testadas no experimento de PCH não são relatados na Figura 2A e na Tabela 3 devido à falha de determinados pares iniciadores usados para o sequenciamento à base de amplicon). Os dados de edição mostrados nas Figuras 2A e 3A graficamente, são reproduzidos numericamente na Tabela 3 e Tabela 4 abaixo. Entretanto, conforme mostrado nas

Figuras 2B, 2C e Figuras 3B e 3C, altos níveis de edição não necessariamente resultaram em expressão mais eficiente dos transgenes, indicando pouca correlação entre edição e inserção/expressão dos construtos bidirecionais em PCH e PHH, respectivamente.

Tabela 3: Dados de edição de íntron 1 de albumina para sgRNAs entregues aos hepatócitos cinomolgos primários

ID GUIA	% de Edição Média	Desvio Padrão de % de Edição
G009867	25,05	0,21
G009866	18,7	3,96
G009876	14,85	4,88
G009875	12,85	2,33
G009874	28,25	6,01
G009873	42,65	5,59
G009865	59,15	0,21
G009872	48,15	3,46
G009871	46,5	5,23
G009864	33,2	8,34
G009863	54,8	12,45
G009862	44,6	7,21
G009861	28,65	0,21
G009860	33,2	7,07
G009859	0,05	0,07
G009858	14,65	1,77
G009857	23	0,99
G009856	14,8	0,99
G009851	1,5	0,42
G009868	12,15	2,47
G009850	63,45	13,93
G009849	57,55	8,27
G009848	33	5,37
G009847	66,75	7
G009846	61,85	5,02
G009845	54,4	7,5

G009844	47,15	2,05

Tabela 4: Dados de edição de íntron 1 de albumina para sgRNAs entregues aos hepatócitos humanos primários		
ID GUIA	% de Edição Média	Desvio Padrão de % de Edição
G009844	19,07	2,07
G009851	0,43	0,35
G009852	47,20	3,96
G009857	0,10	0,14
G009858	8,63	9,16
G009859	3,07	3,50
G009860	18,80	4,90
G009861	10,27	2,51
G009866	13,60	13,55
G009867	12,97	3,04
G009868	0,63	0,32
G009874	49,13	0,60
G012747	3,83	0,23
G012748	1,30	0,35
G012749	9,77	1,50
G012750	42,73	4,58
G012751	7,77	1,16
G012752	32,93	2,27
G012753	21,20	2,95
G012754	0,60	0,10
G012755	1,10	0,10
G012756	2,17	0,40
G012757	1,07	0,25
G012758	0,90	0,10
G012759	2,60	0,35
G012760	39,10	6,58
G012761	36,17	2,43
G012762	8,50	0,57

G012763	47,07	3,07
G012764	44,57	5,83
G012765	19,90	1,68
G012766	8,50	0,28

EXEMPLO 4 – INSERÇÃO IN VIVO DE hSERPINA1 NO LÓCUS DE mAlbumina

[0300] A eficácia de várias sequências guia na facilitação da inserção de hSERPINA1 no lócus de albumina de camundongo foi testada. O ssAAV e as LNPs testados nesse Exemplo foram preparados e entregues aos camundongos, conforme descrito no Exemplo 1. Os soros coletados nas semanas 1 e 2 depois da dose foram assumidos para medir a expressão de soro de alfa-1 antitripsina humana (hA1AT). Quatro semanas depois da dose, os animais sofreram eutanásia e o tecido hepático e os soros foram coletados para edição e expressão de soro de hA1AT, respectivamente. Os níveis de A1AT humana no soro foram determinados por ELISA (Aviva Biosystems, nº de cat OKIA00048).

[0301] Oito diferentes formulações de LNP que contêm 8 diferentes gRNAs que alvejam íntron 1 de albumina foram entregues aos camundongos juntamente com ssAAV derivado de P00450. O AAV e a LNP foram entregues em 1e12 vg/camundongo e 1,0 mg/kg (com relação ao teor de carga de RNA total), respectivamente. Os gRNAs testados nesse experimento são mostrados na Figura 4A e Figura 4B, com o uso de um número encurtado para aqueles listados na Tabela 11. Os resultados de edição no lócus de albumina de camundongo são mostrados na Figura 4A e na Tabela 5. Os níveis de hA1AT de soro são mostrados na Figura 4B e na Tabela 6 em 1, 2 e 4 semanas depois da dose. A Figura 4C mostra um gráfico de correlação que compara os níveis de expressão conforme medido em RLU para um dado guia do experimento in vitro de Exemplo 1 para os níveis de expressão de transgene de hA1AT in vivo detectados nesse experimento com o uso do mesmo guia. O valor de R^2 de 0,71 demonstrou uma correlação positiva entre o exame de célula primário e os tratamentos in vivo.

TABELA 5: EDIÇÃO EM LÓCUS DE ALBUMINA DE CAMUNDONGO

Condição	% de Indel Média	SD	Amostras

G000555	30,4	2,4	5
G011722	23,4	2,6	5
G011723	8,8	2,6	5
G011725	11,7	3,9	5
G000553	47,1	6,1	5
G000666	36,8	6,9	5
G000668	43,6	3,0	5
G000670	44,1	3,4	5

TABELA 6: Níveis de hA1AT EM SORO

	Semana 1			Semana 2			Semana 4		
Condição	Média (µg/ml)	SD	Amostras (n)	Média (µg/ml)	SD	Amostras (n)	Média (µg/ml)	SD	Amostras (n)
G000555	1.363	185	5	1.409	230	5	1.920	410	5
G011722	308	78	5	941	178	5	937	160	5
G011723	327	92	5	447	138	5	489	160	5
G011725	163	40	5	220	47	5	234	20	5
G000553	1.259	230	5	1.659	356	5	1.652	367	5
G000666	1.019	317	5	1.383	536	5	1.743	525	5
G000668	1.596	60	5	1.725	90	5	2.172	234	5
G000670	1.694	202	5	2.126	292	5	2.866	320	5
Plasma humano	2.603	53	5						

EXEMPLO 5 – *KNOCKDOWN* IN VIVO DE TRANSGENE DE PiZ DE HSERPINA1 E INSERÇÃO DE hSERPINA1 EM LÓCUS DE MALBUMINA

[0302] Nesse exemplo, uma primeira etapa de edição para knockdown de expressão da A1AT do transgene de variante de PiZ de hSERPINA (Estágio 1) é seguida por uma segunda etapa de edição para inserir hSERPINA1 no lócus de albumina de camundongo (Estágio 2). O ssAAV e as LNPs testados nesse Exemplo foram preparados e entregues aos camundongos conforme descrito no Exemplo 1 para camundongos NSG-PiZ machos (Grupos A, B, e C) e camundongos machos C57B1/6 (Grupo D) (Jackson Laboratory). Os camundongos NSG-PiZ são camundongos transgênicos que portam cópias da variante de PiZ de SERPINA1 humana (Glu342Lys) no antecedente NOD scid gama (NSG) imunodeficiente.

[0303] No Estágio 1 desse experimento, os camundongos foram dosados com uma LNP que porta mRNA de Cas9 e sgRNA G000409 que alveja o transgene de hSERPINA1 em 0,3 mg/kg (com relação a teor de carga de RNA total). Dois semanas depois da dose de Estágio 1, os soros foram coletados para medir os níveis de hA1AT de soro. A edição do Estágio 2 nesse experimento foi realizada 3 semanas após a dosagem de Estágio 1. Na dosagem de Estágio 2, os camundongos do Estágio 1 foram dosados com LNP 1 mg/kg (com relação ao teor de carga de RNA total) que porta mRNA de Cas9 e sgRNA G000668 (que alveja albumina de camundongo) juntamente com ssAAV derivado de P00450 em 1e12 vg/camundongo. A Figura 5A destaca as condições de edição usadas para cada grupo de teste nesse experimento. Os níveis de A1AT humana no soro foram determinados por ELISA (Aviva Biosystems, nº de cat OKIA00048) em uma, duas e três semanas após a dosagem de Estágio 2. Cinco semanas depois da dose de Estágio 2, os animais sofreram eutanásia e o tecido hepático e os soros foram coletados para edição e expressão de soro de hA1AT, respectivamente.

[0304] A Figura 5B e a Tabela 7 mostram a formação de indel na variante de PiZ de hSERPINA1 que foi alvejada no Estágio 1. A Figura 5C e a Tabela 7 mostram a formação de indel no lócus de albumina alvejado no Estágio 2. A Figura 5D e a Tabela 8 mostram níveis de proteína de hA1AT em soro em vários pontos no tempo conforme medido por ELISA, assim como níveis de hA1AT conforme medido em plasma humano.

TABELA 7 – FORMAÇÃO DE INDEL EM hSERPINA1 E

	hSERPINA1			mAlbumina		
Grupo de Tratamento	% de Edição Média	SD	Amostras (n)	% de Edição Média	SD	Amostras (n)
A	0,1	0,1	4	0,1	0,0	4
B	45,9	4,4	5	65,2	3,0	5
C	32,0	3,5	5	52,9	4,0	5
D	0,7	0,2	5	40,1	2,3	5

TABELA 8 – NÍVEIS DEhA1AT EM SORO

Grupo de Tratamento	Tipo de Dados	Semana 2	Semana 4	Semana 5	Semana 6

Grupo A	Média (µg/ml)	2.406,575	1.903,775	2.321,094	882,2813
	SD	348,6477	426,2463	491,8094	228,3315
	Amostras (n)	4	4	4	4
Grupo B	Média (µg/ml)	21,3279	18,94045	21,36955	14,82225
	SD	5,729652	6,187462	9,180648	3,996221
	Amostras (n)	5	5	5	5
Grupo C	Média (µg/ml)	17,8477	977,2608	1845,197	1938,48
	SD	3,154736	116,7203	385,4366	572,3113
	Amostras (n)	5	5	5	5
Grupo D	Média (µg/ml)	N/A	1.871,738	3.861,613	2.815,315
	SD	N/A	126,3939	426,7188	463,9772
	Amostras (n)	N/A	5	5	5
Plasma Humano	Média (µg/ml)	3.816,88			
	SD	141,2429			
	Amostras (n)	3			

EXEMPLO 6 – EXAME IN VITRO DE UM CONSTRUTO BIDIRECIONAL ATRAVÉS DE SÍTIOS-ALVO EM HEPATÓCITOS DE CAMUNDONGO PRIMÁRIOS COM A UTILIZAÇÃO DE VÁRIOS dgRNAs OU sgRNAs

[0305] O experimento descrito nesse Exemplo testou a inserção de um construto de ssAAV bidirecional (P00415) em um painel de sítios-alvo com a utilização de 41 RNAs guia duplos diferentes (dgRNA) ou 4 RNAs guia únicos (sgRNA) que alvejam íntron 1 de albumina murina em hepatócitos de camundongo primários (PMH).

[0306] O construto de ssAAV (P00415) e MessengerMAX ou materiais de entrega de LNP testados nesse Exemplo foram preparados e entregues aos PMH, conforme descrito no Exemplo 1, com o AAV em uma MOI de 1e5. Depois do tratamento, meio de DNA e célula genômico isolado foi coletado para análise de edição e expressão de transgene, respectivamente. O vetor-repórter compreendeu um ORF de NanoLuc (além de GFP) que pode ser medido através da detecção de fluorescência à base de luciferase, conforme descrito no Exemplo 1, plotada na Figura 6 como unidades de luciferase relativa (“RLU”). Um esquema do vetor testado é fornecido na Figura 1A. Os dgRNAs testados são mostrados na Figura 6, com o uso de um número encurtado para aqueles listados na Tabela 15 (por

exemplo, quando os zeros iniciais são omitidos, por exemplo, quando “CR5545” corresponde a “CR005545” na Tabela 15). Certos dgRNAs têm um sgRNA correspondente listado em parênteses (por exemplo, G551 é um sgRNA que compreende o crRNA e trRNA do dgRNA CR5542). O construto de sgRNA não é testado na Figura 6.

[0307] Conforme mostrado na Figura 6 e na Tabela 32, níveis variados de expressão foram detectados.

[0308] Certos dgRNAs que resultaram em alta expressão de transgene (por exemplo, CR5574, CR5580, CR5576, e CR5579) foram testados como sgRNAs para sua capacidade para inserir hSERPINA1 no sítio de íntron de albumina murino 1 em PMH. Especificamente, dgRNA CR5574, dgRNA CR5580, dgRNA CR5576 e dgRNA CR5579 correspondem a sgRNA G013018, sgRNA G013018, sgRNA G667 e sgRNA G670, respectivamente. 50 ng ou 100 ng de mRNA de Cas9 e 15 nM ou 30 nM de cada sgRNA foram entregues ao PMH. Os dados na Figura 7 são plotados como RLU normalizada para CellTiter-Glo® (CTG). Os sgRNAs testados são mostrados na Figura 7, e são adicionalmente descritos na Tabela 11. Conforme mostrado na Figura 7 e na Tabela 33, níveis variados de expressão foram detectados.

TABELA 32- EXPRESSÃO DE NANOLUC COM AAV-P00415

Guia	AAV de PMH- P00415	
	Luciferase Média (RLU)	Desvio Padrão de Luciferase (RLU)
AAV	47.500	10.170
AAV	52.235	24.895
AAV	80.570	46.130
CR5545	415.850	246.450
CR5546	565.550	34.150
CR5547	432.750	36.050
CR5548	445.900	30.100
CR5549	993.100	301.900
CR5550	1.658.000	68.000
CR5551	1.587.500	226.500
CR5552	1.946.000	277.000

CR5556	890.600	118.400
CR5559	1.302.000	49.000
CR5564	874.000	248.000
CR5565	411.050	256.550
CR5566	286.350	83.650
CR5567	778.900	72.000
CR5568	1.590.500	56.500
CR5569	14.17.000	390.000
CR5570	838.200	150.900
CR5571	577.800	170.200
CR5574	3.797.000	25.000
CR5577	1.001.550	99.450
CR5580	3.655.500	803.500
AAV	47.500	10.170
AAV	52.200	24.895
AAV	80.600	46.130
CR5542 (G551)	367.000	300
CR5561 (G552)	982.000	303.350
CR5575 (G553)	1.740.000	186.500
CR5560 (G554)	1.950.000	128.500
CR5543 (G555)	1.520.000	59.500
CR5578 (G666)	2.460.000	1.000
CR5576 (G667)	1.940.000	197.000
CR5562 (G668)	2.510.000	876.000
CR5563 (G669)	1.190.000	310.550
CR5579 (G670)	4.600.000	496.500
CR5540 (G11722)	712.000	35.550
CR5573 (G11723)	2.320.000	500.500
CR5541 (G11724)	176.000	1.150
CR5544 (G11725)	357.000	72.400
CR5553 (G11726)	374.000	93.450
CR5554	913.000	455.500

(G11727)		
CR5555 (G11728)	585.000	13.200
CR5557 (G11729)	1.080.000	97.200
CR5558 (G11730)	1.820.000	277.000
CR5572 (G11731)	999.000	135.650

TABELA 33: INSERÇÃO DE SERPINA1 DE MALBUMINA

Guia	Concentração	NanoLuc/CTG
	AAAV-P00415	12,481248
G013018	100 ng/30nM	379,68072
	50 ng/15nM	428,03358
G013019	100 ng/30nM	750,48285
	50 ng/15nM	703,22584
G000670	100 ng/30nM	531,21772
	50 ng/15nM	440,83152
G000667	100 ng/30nM	664,4492
	50 ng/15nM	302,77669

TABELA 15. DGRNA GUIA DE albumina de camundongo E PADRÃO DE MODIFICAÇÃO

ID guia	Sequência Guia	SEQ ID	Sequência Completa	SEQ ID	Coordenada Genômica
CR005540	UGCUUGUAUUUUCUAGUAA	1133	UGCUUGUAUUUUCUAGUAAGUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1153	chr5:90461039-90461059
CR005541	UUUUUCUAGUAAUGGAAGCC	1134	UUUUUCUAGUAAUGGAAGCCGUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1154	chr5:90461047-90461067
CR005542	AUUUGCAUCUGAGAACCCUU	1135	AUUUGCAUCUGAGAACCCUUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1155	chr5:90461148-90461168
CR005543	UGCAUCUGAGAACCCUUAGG	1136	UGCAUCUGAGAACCCUUAGGGUUUUAGAGCUAU	1156	chr5:90461151-90461171

			GCUGUUUUG		
CR005544	UUAUAUUAUUGAUAUAUUUU	1137	UUAUAUUAUUGAUAUAUUUUGUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1157	chr5:90461174-90461194
CR005553	GCACAGAUAUAAACACUUAA	1138	GCACAGAUAUAAACACUUAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1158	chr5:90461480-90461500
CR005554	CACAGAUAUAAACACUUAAC	1139	CACAGAUAUAAACACUUAACGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1159	chr5:90461481-90461501
CR005555	GGUUUUAAAAAUAAUAAUGU	1140	GGUUUUAAAAAUAAUAAUGUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1160	chr5:90461502-90461522
CR005557	UCAGAUUUUCCUGUAACGAU	1141	UCAGAUUUUCCUGUAACGAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1161	chr5:90461572-90461592
CR005558	CAGAUUUUCCUGUAACGAUC	1142	CAGAUUUUCCUGUAACGAUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1162	chr5:90461573-90461593
CR005560	GAUCGGGAACUGGCAUCUUC	1143	GAUCGGGAACUGGCAUCUUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1163	chr5:90461589-90461609
CR005561	AUCGGGAACUGGCAUCUUCA	1144	AUCGGGAACUGGCAUCUUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1164	chr5:90461590-90461610
CR005562	GCAUCUUCAGGGAGUAGCUU	1145	GCAUCUUCAGGGAGUAGCUUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1165	chr5:90461601-90461621
CR005563	CAAUCUUUAAAUAUGUUGUG	1146	CAAUCUUUAAAUAUGUUGUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1166	chr5:90461674-90461694
CR005572	CAAUGGUAAAUAAGAAAUAA	1147	CAAUGGUAAAUAAGAAAUAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1167	chr5:90461408-90461428
CR005573	GUAAAUAU	1148	GUAAAUAUCUA	1168	chr5:90461425-

	CUACUAAGACAA		CUAAGACAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		90461445
CR005575	GUUACAGGAAAAUCUGAAGG	1149	GUUACAGGAAAAUCUGAAGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1169	chr5:90461569-90461589
CR005576	AUCGUUACAGGAAAAUCUGA	1150	AUCGUUACAGGAAAAUCUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1170	chr5:90461572-90461592
CR005578	CACUCUUGUCUGUGGAAACA	1151	CACUCUUGUCUGUGGAAACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1171	chr5:90461709-90461729
CR005579	UCACUCUUGUCUGUGGAAAC	1152	UCACUCUUGUCUGUGGAAACGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	1172	chr5:90461710-90461730

EXEMPLO 7 - EXAME IN VITRO DE UM CONSTRUTO BIDIRECIONAL ATRAVÉS DE SÍTIOS-ALVO EM HEPATÓCITOS DE RATO PRIMÁRIOS

[0309] O experimento descrito nesse Exemplo testou a inserção de um construto de ssAAV bidirecional (P00415) em um painel de sítios-alvo que utiliza 32 diferentes gRNAs que alvejam íntron 1 de albumina de rato em hepatócitos de rato primários (PRH).

[0310] O construto de ssAAV (P00415) e materiais MessengerMAX testados nesse Exemplo foram preparados e entregues aos PRH, conforme descrito no Exemplo 1, com o AAV em uma MOI de 1e6, 100 ng de mRNA de Cas9 por amostra e sgRNA a uma concentração de 25 nM. Depois do tratamento, meio de DNA e célula genômico isolado foi coletado para análise de edição e expressão de transgene, respectivamente. O vetor-repórter compreendeu um ORF de NanoLuc (além de GFP) que pode ser medido através da detecção de fluorescência à base de luciferase, conforme descrito no Exemplo 1. Os dados são plotados na Figura 8 como unidades de luciferase relativa normalizadas para CellTiter-Glo® (“NanoLuc/CTG”). Um esquema do vetor testado é fornecido na Figura 1A.

[0311] Conforme mostrado na Figura 8, níveis variados de edição (formação de indel) foram detectados. Entretanto, altos níveis de edição não

necessariamente resultou em expressão mais eficiente dos transgenes.

[0312] A inserção do construto de ssAAV bidirecional (P00415) em vários sítios-alvo com a utilização de gRNAs específicos testados na Figura 8 foram avaliados por uma faixa de concentrações (Cas9: 3,125 ng, 6,25 ng, 12,5 ng, 25 ng, 50 ng ou 100 ng; sgRNA:0,78 nM, 1,56 nM, 3,125 nM, 6,25 nM, 12,5 nM ou 25 nM). Conforme mostrado na Figura 9, a inserção do construto de ssAAV bidirecional (P00415) no lócus de albumina de rato é dependente de dose, isto é, as taxas de inserção são moduladas com dose de Cas9/sgRNA crescente.

TABELA 16. SGRNA GUIA DE albumina de rato E PADRÃO DE MODIFICAÇÃO

ID guia	Sequência Completa	SEQ ID NO:	Sequência Completa Modificada	SEQ ID NO:
G015740	ACUCUUGUCUGUGGGAAUGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1173	mA*mC*mU*CUUGUCUGUGGGAAUGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1198
G015731	UCCAAUCGCUACAGGAAAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1174	mU*mC*mC*AAUCGCUACAGGAAAAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1199
G015733	UUAGUAUAGCUAGGUAGAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1175	mU*mU*mA*GUAUAGCUAGGUAGAGCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1200
G017541	ACUCCGAUGACAAUAAUGGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC	1176	mA*mC*mU*CCGAUGACAAUAAUGGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGG	1201

	AACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU		CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G015723	GCGAUCUCACUCUUGUCUGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1177	mG*mC*mG*AUCUCACUCUUGUCUGUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1202
G015711	GAUUUUCCUGUAGCGAUUGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1178	mG*mA*mU*UUUCCUGUAGCGAUUGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1203
G015722	AUUCGUAAAAUUACUAAUACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1179	mA*mU*mU*CGUAAAAUUACUAAUACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1204
G015737	AGUCCCCCCAUUAUUGUCAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1180	mA*mG*mU*CCCCCCAUUAUUGUCAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1205
G015728	GCUGAACUCACUAGUUUCAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1181	mG*mC*mU*GAACUCACUAGUUUCAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG	1206

			mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G015717	GAUUGGAGGCUGGGAACUUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1182	mG*mA*mU*UGGAGGCUGGGAACUUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1207
G015735	UACAUUAAUAUAACCACAUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1183	mU*mA*mC*AUUAAUAUAACCACAUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1208
G015727	AAACUCUGAAUGUAGUCGAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1184	mA*mA*mA*CUCUGAAUGUAGUCGAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1209
G015716	AUGACUGAAACAUUCCGUCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1185	mA*mU*mG*ACUGAAACAUUCCGUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1210
G015729	GUGAUAUUAAUCAUCACCAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1186	mG*mU*mG*AUAUUAAUCAUCACCAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1211

G015730	AACUCCGAUGACAAUAA UGGGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1187	mA*mA*mC*UCCGAUGACA AUAAUGGGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU	1212
G015734	CUUUGCAUUCAAACCCA AGAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1188	mC*mU*mU*UGCAUUCAAA CCCAAGAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU	1213
G015726	GAUAACUCCGAUGACAA UAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1189	mG*mA*mU*AACUCCGAUG ACAAUAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU	1214
G015736	AUGUUUGUAAAUGUCUA CUAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1190	mA*mU*mG*UUUGUAAAUG UCUACUAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU	1215
G015732	UGCAUCUGAGAAUCCUU AUGGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1191	mU*mG*mC*AUCUGAGAAU CCUUAUGGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU	1216
G015719	UGACUGAAACAUUCCGU CUUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC	1192	mU*mG*mA*CUGAAACAUU CCGUCUUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC	1217

	CGAGUCGGUGCUUUU		mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G015720	UCCUGUAGCGAUUGGAGGCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1193	mU*mC*mC*UGUAGCGAUUGGAGGCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1218
G015718	UAUGCGUGUUUAGUAUAGCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1194	mU*mA*mU*GCGUGUUUAGUAUAGCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1219
G015739	ACUUUUAUUUUUCGUAGUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1195	mA*mC*mU*UUUAUUUUUCGUAGUAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1220
G015724	UGUAUUAGUAAUUUUACGAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1196	mU*mG*mU*AUUAGUAAUUUUACGAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1221
G015738	UUAAGUAAUUUUGAAAUACCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	1197	mU*mU*mA*AGUAAUUUUGAAAUACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	1222

G015713	AUAACUCCGAUGACAAU AAUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1229	mA*mU*mA*ACUCCGAUGA CAAUAAUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU	1223
G015725	UAACUCCGAUGACAAUA AUGGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1230	mU*mA*mA*CUCCGAUGAC AAUAAUGGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU	1224
G015721	UUUUCGUAGUAACGGAA GCCGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1231	mU*mU^{w}mU*UCGUAGUAAC GGAAGCCGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU	1225
G015714	UUCCUGUAGCGAUUGGA GGCGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1232	mU*mU*mC*CUGUAGCGAU UGGAGGCGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU	1226
G015715	UCCCAGCCUCCAAUCGC UACGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1233	mU*mC*mC*CAGCCUCCAA UCGCUACGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU	1227
G015712	UCCGAUUUUCCUGUAGC GAUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC	1234	mU*mC*mC*GAUUUUCCUG UAGCGAUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC	1228

	CGAGUCGGUGCUUUU		mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	

EXEMPLO 8 - EXAME IN VITRO DE UM CONSTRUTO BIDIRECIONAL ATRAVÉS DE SÍTIOS-ALVO EM HEPATÓCITOS DE CINOMOLGOS PRIMÁRIOS COM A UTILIZAÇÃO DE VÁRIOS gRNAs

[0313] O experimento descrito nesse Exemplo testou a inserção de um construto de ssAAV bidirecional (P00415) em um painel de sítios-alvo que utiliza 34 diferentes gRNAs que alvejam íntron 1 de albumina de cinomolgos (“cino”) em hepatócitos de cino primários (PCH). O exame que utilizou os 34 gRNAs diferentes foi realizado duas vezes para garantir a variabilidade entre experimentos individuais.

[0314] Os materiais de entrega de pacote de ssAAV e lipídio testados nesse Exemplo foram preparados e entregues em PCH, conforme descrito no Exemplo 1. Depois do tratamento, meio de DNA e célula genômico isolado foi coletado para análise de edição e expressão de transgene, respectivamente. Cada um dos vetores compreendeu um repórter que pode ser medido através da detecção de fluorescência à base de luciferase, conforme descrito no Exemplo 1 (derivado de plasmídeo P00415). Para esse exemplo, os vetores de AAV contiveram o ORF de NanoLuc (além de GFP). Cada um dos gRNAs testados e os dados de edição correspondentes e expressão dos transgenes são mostrados na Tabela 17 e Tabela 18. A expressão do transgene é medida como RLU normalizada para CellTiter-Glo® (CTG).

[0315] Conforme mostrado na Tabela 17, níveis variados de edição foram detectados para cada uma das combinações testadas. Entretanto, conforme mostrado na Tabela 18, altos níveis de edição não necessariamente resultaram em expressão mais eficiente dos transgenes, indicando pouca correlação entre edição e inserção/expressão dos construtos bidirecionais em PCH.

Tabela 17: Dados de edição de íntron 1 de albumina para sgRNAs entregues aos hepatócitos cino primários

ID GUIA	Exp. nº 1 % de Edição Média	Exp. nº 2 % de Edição Média	Média de Exp. nº 1 e

			nº 2
G009870	28,8	40,5	34,65
G009848	41,9	35,2	38,55
G009864	38,4	49,0	43,7
G009874	30,2	39,6	34,9
G009869	32,3	26,2	29,25
G009860	42,0	30,8	36,4
G009844	37,3	38,4	37,85
G009849	48,8	51,2	50
G009845	36,2	53,8	45
G009859	36,1	29,2	32,65
G009854	40,4	42,3	41,35
G009862	34,9	32,3	33,6
G009856	21,2	36,0	28,6
G009846	43,8	41,7	42,75
G009847	51,8	61,6	56,7
G009855	39,9	39,4	39,65
G009852	41,9	42,0	41,95
G009851	40,9	23,6	32,25
G009865	36,9	36,5	36,7
G009872	36,2	34,6	35,4
G009853	53,3	42,2	47,75
G012766	45,7	21,0	33,35
G009873	41,7	43,6	42,65
G009868	27,4	29,2	28,3
G009850	47,7	53,5	50,6
G009861	32,9	27,2	30,05
G009866	33,0	31,3	32,15
G009876	34,1	29,2	31,65
G009875	34,3	34,5	34,4
G009863	59,5	51,7	55,6
G009871	55,8	48,3	52,05
G009857	21,4	22,1	21,75
G009858	15,0	8,6	11,8
G009867	48,2	31,3	39,75

Tabela 18: Dados de expressão de íntron 1 de albumina para construtos com a utilização de vários sgRNAs entregues aos hepatócitos cino primários					
ID GUIA	Exp. nº 1 RLU/CTG Médio	Exp. nº 1 Desvio Padrão de RLU/CTG	Exp. nº 2 RLU/CTG Médio	Exp. nº 2 Desvio Padrão de RLU/CTG	Média de Exp. nº 1 e nº 2
G009870	216,49	15,83	250,72	52,47	233,60
G009848	320,06	90,30	241,93	58,04	281,00
G009864	282,52	30,63	220,90	4,65	251,71
G009874	209,18	46,68	217,59	17,69	213,38
G009869	248,83	40,53	213,25	31,06	231,04
G009860	200,75	2,50	197,89	74,55	199,32
G009844	246,67	54,60	194,37	59,12	220,52
G009849	240,66	47,60	193,26	17,24	216,96
G009845	183,30	44,92	188,04	58,68	185,67
G009859	215,47	21,27	187,92	38,90	201,70
G009854	188,52	5,15	184,72	31,34	186,62
G009862	225,87	4,24	182,45	4,39	204,16
G009856	190,20	9,06	178,42	62,26	184,31
G009846	223,93	27,92	177,23	51,96	200,58
G009847	281,44	25,14	170,66	3,16	226,05
G009855	256,16	40,14	169,57	8,00	212,87
G009852	203,79	30,02	167,80	16,90	185,79
G009851	200,23	26,64	167,48	46,06	183,85
G009865	185,17	12,28	167,38	13,01	176,27
G009872	115,79	15,80	144,73	11,44	130,26
G009853	180,41	0,28	141,34	4,00	160,88
G012766	131,47	15,22	139,08	59,22	135,27
G009873	112,77	34,15	136,21	15,88	124,49
G009868	210,02	9,35	133,32	18,70	171,67
G009850	201,10	19,37	132,06	5,45	166,58
G009861	169,03	5,39	124,62	20,05	146,83
G009866	143,57	9,77	124,50	23,00	134,03
G009876	132,26	31,77	120,94	30,00	126,60
G009875	119,64	18,04	113,61	6,52	116,62

G009863	160,89	5,30	108,83	24,78	134,86
G009871	102,92	12,93	102,00	13,68	102,46
G009857	54,05	11,70	63,37	4,00	58,71
G009858	61,50	1,82	60,84	0,17	61,17
G009867	14,14	2,65	12,16	0,25	13,15

EXEMPLO 9 – INSERÇÃO IN VIVO DE hSERPINA1 NO LÓCUS DE MALBUMINA COM O USO DE UM CONSTRUTO BIDIRECIONAL QUE COMPREENDE UMA SEQUÊNCIA P2A

[0316] A eficácia de vários construtos bidirecionais, com e sem uma sequência de P2A na facilitação da inserção de hSERPINA1 no lócus de albumina de camundongo foi testada. O ssAAV e as LNPs testados nesse Exemplo foram preparados e entregues aos camundongos, conforme descrito no Exemplo 1 (n=5 por grupo). Os soros coletados nas semanas 1, 2, 4 e 5 depois da dose foram assumidos para medir a expressão de soro de alfa-1 antitripsina humana (hA1AT).

[0317] Dois construtos diferentes, P00450 e P00451, foram entregues para camundongos juntamente com uma formulação de LNP que contém G000670 que alveja íntron 1 de albumina. Os componentes de vetor e sequências para os construtos P00450 e P00451 são mostrados na Tabela 19. O AAV e a LNP foram entregues em 1e12 vg/camundongo e 1,0 mg/kg (com relação ao teor de carga de RNA total), respectivamente. Os níveis de hA1AT de soro são mostrados na Figura 10 e Tabela 20 e Tabela 21 nas semanas 1, 2, 4 e 5 depois da dose. Conforme mostrado na Tabela 20 e Tabela 21, a inclusão de P2A não resultou necessariamente em expressão mais eficiente do transgene, que indica que hA1AT pode ser expressa com ou sem a inclusão de um peptídeo de autoclivagem 2A, tal como P2A.

TABELA 19: COMPONENTES DE VETOR E SEQUÊNCIAS

	Componente	P00450	P00451
	ITR de 5’	(SEQ ID NO: 263)	SEQ ID NO: 263
1ª Orientação	2A	N/A	
	Aceitante de Splice	Aceitante de Splice de Albumina de Camundongo (SEQ ID NO: 264)	SEQ ID NO: 264

	Transgene	SERPINA1 Humana (SEQ ID NO: 265)	SEQ ID NO: 268
	Poli-A	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 266
2ª Orientação	Poli-A	SEQ ID NO: 267	SEQ ID NO:267
	Transgene	SERPINA1 Humana (SEQ ID NO: 268)	
	Aceitante de Splice	Aceitante de Splice de Albumina de Camundongo (SEQ ID NO: 269)	SEQ ID NO: 269
	2A	N/A	
	ITR de 3’	(SEQ ID NO: 270)	SEQ ID NO: 270

TABELA 20: Níveis de hA1AT EM SORO (SEMANAS 1 E 2)

	Semana 1			Semana 2		
Condição	Média (µg/ml)	SD	Amostras (n)	Média (µg/ml)	SD	Amostras (n)
AAV e LNP (P00450 + G000670)	168,92	27,75	2	2.499,05	289,49	3
AAV e LNP (P00451 + G000670)	130,90	22,22	5	1.175,16	111,65	4
AAV apenas (P00450)	0	0	4	0	0	1
AAV apenas (P00451)	0	0	4	0	0	1
Veículo	0	0	4	0	0	1
Controle (Lote de plasma humano)	3.450,05	334,76	4			

TABELA 21: Níveis de hA1AT EM SORO (SEMANAS 3 E 4)

	Semana 3			Semana 4		
Condição	Média (µg/ml)	SD	Amostras (n)	Média (µg/ml)	SD	Amostras (n)
AAV e LNP (P00450 + G000670)	2.620,77	504,64	5	2.480,33	317,19	5
AAV e LNP (P00451 + G000670)	1.705,83	203,36	5	1.562,14	345,42	5
AAV apenas (P00450)				0	0	5
AAV apenas (P00451)				0	0	5
Veículo				0	0	5

Controle (Lote de plasma humano)						

EXEMPLO 10 – KNOCKDOWN IN VIVO DE transgene de PiZ DE HSERPINA1 E INSERÇÃO DE hSERPINA1 EM lócus de mAlbumina

[0318] Nesse exemplo, a capacidade para realizar knockdown do transgene de hSERPINA1 e inserir hSERPINA1 no lócus de albumina de camundongo foi avaliada. Há dois estágios para o experimento: (1) uma primeira etapa de edição para knockdown de expressão da A1AT do transgene de variante de PiZ de hSERPINA (Estágio 1); e (2) uma segunda etapa de edição para inserir hSERPINA1 no lócus de albumina de camundongo (Estágio 2). O ssAAV e as LNPs testados nesse Exemplo foram preparados e entregues a camundongos NSG-PiZ machos (Grupos 1, 2, e 3) (Jackson Laboratory) conforme descrito no Exemplo 1.

[0319] No Estágio 1 desse experimento, os camundongos foram dosados com uma LNP que porta mRNA de Cas9 e sgRNA G000409 que alveja o transgene de hSERPINA1 em 0,3 mg/kg (com relação a teor de carga de RNA total) ou um controle de veículo. Dois semanas depois da dose de Estágio 1, os soros foram coletados para medir os níveis de hA1AT de soro. A dosagem do Estágio 2 nesse experimento foi realizada 3 semanas após a dosagem de Estágio 1. Na dosagem de Estágio 2, os camundongos do Estágio 1 foram dosados com LNP 1 mg/kg (com relação ao teor de carga de RNA total) que porta mRNA de Cas9 e sgRNA G000668 (que alveja albumina de camundongo) apenas ou com ssAAV derivado de P00450 em 1e12 vg/camundongo, e o grupo de controle recebeu apenas veículo. A Tabela 22 destaca as condições de edição de cada grupo de teste nesse experimento. Os níveis de A1AT humana no soro foram determinados por ELISA em uma, duas e três semanas após a dosagem de Estágio 2. Cinco semanas depois da dose de Estágio 2, os animais sofreram eutanásia e o tecido hepático e os soros foram coletados para determinar os níveis de expressão de soro de hA1AT.

[0320] A Figura 11 e a Tabela 23 mostram níveis de proteína de hA1AT em soro em vários pontos no tempo conforme medido por ELISA.

TABELA 22: CONDIÇÕES DE EDIÇÃO PARA CADA GRUPO DE TESTE

Grupo de Tratamento	Antecedente	Estágio 1	Estágio 2

1	NGS-PiZ	Veículo	Veículo
2	NGS-PiZ	G000409	G000668 apenas
3	NGS-PiZ	G000409	G000668 + P00450

TABELA 23 – Níveis de hA1AT EM SORO

Grupo de Tratamento	Tipo de Dados	Semana 2	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 8
Grupo 1	Média (µg/ml)	2.787,03	1.752,09	1.188,34	1.165,73	882,28
	SD	530,59	479,90	325,73	288,97	228,33
	Amostras (n)	4	4	4	4	4
Grupo 2	Média (µg/ml)	17,08	17,71	16,58	17,25	14,82
	SD	5,86	6,08	4,88	4,89	3,99
	Amostras (n)	5	5	5	5	5
Grupo 3	Média (µg/ml)	13,99	1.480,69	1.465,54	2.913,76	1.938,48
	SD	3,20	215,35	519,08	619,28	572,31
	Amostras (n)	5	5	5	5	5

EXEMPLO 11 - DURABILIDADE DE EXPRESSÃO DE hA1AT IN VIVO APÓS KNOCKDOWN DE TRANSGENE DE PiZ de hSERPINA1 E INSERÇÃO DE hSERPINA1 EM LÓCUS DE mAlbumina

[0321] A durabilidade de expressão de hA1AT ao longo do tempo em animais tratados foi avaliada nesse Exemplo. Para essa finalidade, hA1AT foi medido no soro de animais tratados depois da dose, como parte de um estudo de durabilidade de 15 semanas.

[0322] Para esse exemplo, uma primeira etapa de edição para knockdown de expressão da A1AT do transgene de variante de PiZ de hSERPINA (Estágio 1) é seguida por uma segunda etapa de edição para inserir hSERPINA1 no lócus de albumina de camundongo (Estágio 2). O ssAAV, LNPs e controles testados nesse Exemplo foram preparados e entregues a camundongos conforme descrito no Exemplo 1 para camundongos NSG-PiZ machos (Grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

[0323] No Estágio 1 desse experimento, os camundongos em Grupos 2, 3, 4 e 6 foram dosados com uma LNP que porta mRNA de Cas9 e sgRNA G000409 que alveja o transgene de hSERPINA1 em 0,3 mg/kg (com relação a teor de carga de RNA total). A edição do Estágio 2 nesse experimento foi realizada 3 semanas

após a dosagem de Estágio 1. Na dosagem de Estágio 2, os camundongos dos Grupos 4, 5 e 6 foram dosados com LNP 1 mg/kg (com relação ao teor de carga de RNA total) que porta mRNA de Cas9 e sgRNA G000666 ou sgRNA G13019 (ambos alvejam albumina de camundongo) juntamente com ssAAV derivado de P00450 em 1e12 vg/camundongo. A Tabela 24 destaca as condições de edição usadas para cada grupo de teste nesse experimento. Os níveis de A1AT humana no soro foram determinados por ELISA em quatro, oito e doze semanas após a dosagem de Estágio 2. Os níveis de A1AT (de tipo selvagem e mutante) humana no soro também foram determinados por LC-MS/MS em uma, duas, quatro, oito e doze semanas após a dosagem de Estágio 2. Doze semanas depois da dose de Estágio 2, os animais sofreram eutanásia e o tecido hepático e os soros foram coletados para edição e expressão de soro de hA1AT, respectivamente.

[0324] A Figura 12 e a Tabela 25 mostram a formação de indel no lócus de albumina alvejado no Estágio 2. A Figura 13A e a Tabela 26 mostram níveis de proteína de hA1AT em soro em vários pontos no tempo conforme medido por ELISA (Abeam, nº Cat ab108799). Conforme mostrado na Figura 13A, expressão de hA1AT foi prolongada em cada ponto no tempo avaliado para os Grupos 1, 4, 5, 6 e 7 dentro de 12 semanas após a dosagem de Estágio 2. A Figura 13B e a Tabela 29 mostram níveis de proteína de hA1AT (de tipo selvagem e mutante) em soro em vários pontos no tempo conforme medido por LC-MS/MS. Conforme mostrado na Figura 13B, os níveis de hA1AT diminuíram em cada um dos grupos que foram dosados com uma LNP que porta mRNA de Cas9 e sgRNA G000409 que alveja o transgene de hSERPINA1 (por exemplo, grupos 2, 3, 4 e 6) durante a dosagem de Estágio 1. Enquanto isso, cada um dos grupos que foi dosado com LNP que porta mRNA de Cas9 e sgRNA juntamente com ssAAV durante a dosagem de Estágio 2 mostrou aumentos subsequentes em níveis de hA1AT de soro.

TABELA 24: CONDIÇÕES DE EDIÇÃO PARA CADA GRUPO DE TESTE

Grupo de Tratamento	Antecedente	Estágio 1	Estágio 2
1	NGS-PiZ	Veículo (Sem KO)	Veículo (Sem Inserção)
2	NGS-PiZ	G000409 (KO)	Veículo (Sem Inserção)
3	NGS-PiZ	G000409 (KO)	P00450 (AAV apenas)

4	NGS-PiZ	G000409 (KO)	G000666 + P00450 (Inserção)
5	NGS-PiZ	Veículo (Sem KO)	G000666 + P00450 (Inserção)
6	NGS-PiZ	G000409 (KO)	G13019 + P00450 (Inserção)

TABELA 25 – FORMAÇÃO DE INDEL EM mAlbumina

	mAlbumina		
Grupo de Tratamento	% de Edição Média	SD	Amostras (n)
1	0,14	0,05	5
2	0,14	0,05	5
3	0,08	0,04	5
4	61,62	3,89	5
5	45,96	3,93	5
6	44,42	3,05	5

TABELA 26 – NÍVEIS DE hA1AT EM SORO CONFORME MEDIDO POR ELISA

Grupo de Tratamento	Tipo de Dados	Semana 0	Semana 3	Semana 7	Semana 11	Semana 15
Grupo 1	Média (µg/ml)	1.025,72	833,98	991,06	1.216,32	1.083,88
	SD	139,80	262,98	140,73	66,02	50,85
	Amostras (n)	5	5	5	5	5
Grupo 2	Média (µg/ml)	813,04	21,33	21,42	19,43	21,28
	SD	130,12	5,75	3,28	3,59	0
	Amostras (n)	5	5	5	5	5
Grupo 3	Média (µg/ml)	956,82	18,69	18,06	18,98	14,98
	SD	100,81	1,48	1,60	8,30	0
	Amostras (n)	5	5	5	5	5
Grupo 4	Média	737,97	17,92	429,24	468,64	268,94

	(µg/ml)					
	SD	73,18	0	92,14	89,45	85,11
	Amostras (n)	5	5	5	5	5
Grupo 5	Média (µg/ml)	774,70	1.743	1.476,61	985,21	782,66
	SD	188,47	421,25	327,39	166,15	172,51
	Amostras (n)	5	5	5	5	5
Grupo 6	Média (µg/ml)	736,79	0	489,52	588,11	517,47
	SD	27,63	0	112,25	95,24	94,06
	Amostras (n)	5	5	5	5	5

TABELA 29 – Níveis de hA1AT EM SORO CONFORME MEDIDO POR LC-MS/MS

Grupo de Tratamento	Tipo de Dados	Semana 0	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 7	Semana 11	Semana 15
Grupo 1	Média (µg/ml)	2.746,67	1.883,33	2.050,00	1.752,50	1.532,00	1.011,80	665,00
	SD	1.624,85	310,05	704,66	528,04	390,22	207,33	85,20
	Amostras (n)	3	3	5	4	5	5	5
Grupo 2	Média (µg/ml)	2.202,00	40,50	32,28	36,70	34,25	39,90	33,25
	SD	438,94	N=1	8,60	10,61	9,11	20,25	14,04
	Amostras (n)	5	1	5	2	4	3	4
Grupo 3	Média (µg/ml)	2.127,50	BQL	BQL	BQL	25,00	27,60	2.127,50
	SD	247,17				N=1	0,46	247,17
	Amostras (n)	4				1	3	5
Grupo 4	Média (µg/ml)	2.166,67	33,80	404,00	527,00	594,60	583,20	494,40
	SD	328,68	N=1	68,75	108,28	87,63	105,43	59,45
	Amostras (n)	3	1	5	5	5	5	5
Grupo 5	Média (µg/ml)	1.950,00	1.895,00	3.444,00	2.655,00	3.884,00	1.936,00	1.587,50
	SD	223,38	169,02	1.105,05	722,84	1.116,03	551,39	521,24
Grupo 6	SD	296,47	N=1	127,03	164,27	153,22	635,20	123,81
	Amostras (n)	4	1	5	5	5	5	5

BQL=Abaixo de limite de quantificação 25 µg/ml

Os valores de BQL ignorados para cálculos de desvio padrão e média

EXEMPLO 12- NÍVEL DE EXPRESSÃO DE hA1AT IN VIVO COM VÁRIAS DOSES DE LNP OU AAV

[0325] O nível de expressão de hA1AT em camundongos tratados com várias doses de LNP ou AAV foi avaliado nesse Exemplo. O ssAAV e as LNPs testados nesse Exemplo foram preparados e entregues aos camundongos, conforme descrito no Exemplo 1. Duas semanas depois da dose, os animais sofreram eutanásia e o tecido hepático e os soros foram coletados para edição e expressão de soro de hA1AT, respectivamente.

[0326] Os camundongos foram dosados com (1) doses variáveis de LNP (por exemplo, 1 mg/kg, 0,3 mg/kg, ou 0,1 mg/kg com relação ao teor de carga de RNA total) que porta mRNA de Cas9 e sgRNA G000666 (que alveja albumina de camundongo) ou (2) doses variáveis de ssAAV derivado de P00450 (por exemplo, 3e12 vg/camundongo, 1e12 vg/camundongo, 3ell vg/camundongo ou 1e11 vg/camundongo).

[0327] Os níveis de A1AT humana no soro foram determinados por ELISA (Aviva Biosystems, nº de cat OKIA00048) uma semana após a dosagem. A Figura 14A, a Figura 14B e a Tabela 27 mostram os níveis de proteína de hA1AT em soro com várias concentrações de LNP e AAV conforme medido por ELISA. Como referência, níveis de hA1AT em plasma humana são aproximadamente 3.450,9 ug/ml. Os resultados de edição no lócus de albumina de camundongo são mostrados na Figura 14C, Figura 14D e na Tabela 28. Conforme mostrado na Figura 14, Figura 14B, Figura 14C e Figura 14D, a expressão de hA1AT e a formação de indel aumentaram de modo dependente de dose com o aumento de dose de LNP ou AAV, respectivamente. Adicionalmente, a inserção de hSERPINA1 em Ratos Wistar com o uso de ssAAV e doses variáveis de LNP (por exemplo, 3 mg/kg, 1 mg/kg, ou 0,3 mg/kg com relação ao teor de carga de RNA total) que porta mRNA de Cas9 e sgRNA G013019 (que alveja albumina de rato) mostrou que aumentar doses de LNP resulta em expressão aumentada de hA1AT em soro por 2 semanas (dados não mostrados).

TABELA 27: NÍVEIS DE hA1AT EM SORO

Condição	Média	SD	Amostras

	(µg/ml)		(n)
1 mpk (LNP) e 1e12 (AAV)	1.827,13	824,68	5
0,3 mpk (LNP) e 1e12 (AAV)	408,26	169,47	5
0,1 mpk (LNP) e 1e12 (AAV)	28,54	4,10	5
1 mpk (LNP) e 3e12 (AAV)	2.714,41	1.439,31	5
1 mpk (LNP) e 1e12 (AAV)	1.827,13	824,68	5
1 mpk (LNP) e 3e11 (AAV)	399,09	160,19	5
1 mpk (LNP) e 1e11 (AAV)	188,63	86,21	5
Plasma humano			

TABELA 28: EDIÇÃO EM LÓCUS DE ALBUMINA DE CAMUNDONGO

Condição	% de Indel Média	SD	Amostras
1 mpk (LNP) e 1e12 (AAV)	48,56	6,29	5
0,3 mpk (LNP) e 1e12 (AAV)	20,16	5,31	5
0,1 mpk (LNP) e 1e12 (AAV)	2,54	1,02	5
1 mpk (LNP) e 3e12 (AAV)	40,62	8,94	5
1 mpk (LNP) e 1e12 (AAV)	48,56	6,29	5
1 mpk (LNP) e 3e11 (AAV)	46,66	6,58	5
1 mpk (LNP) e 1e11 (AAV)	47,88	3,67	5

EXEMPLO 13 - ANÁLISE FORA DO ALVO DE GUIAS HUMANOS DE ALBUMINA

[0328] Um método bioquímico (Consultar, por exemplo, Cameron et al, Nature Methods. 6, 600 a 606; 2017) foi usado para determinar potenciais sítios genômicos fora do alvo clivados por Cas9 que alveja Albumina. Nesse experimento, 13 sgRNA que alvejam Albumina humana e dois guias de controle com perfis fora de alvo conhecidos foram examinados com o uso de DNA genômico de HEK293 isolado. O número de potenciais sítios fora do alvo detectados com o uso de uma concentração guia de 16 nM no ensaio bioquímico foram mostrados na Tabela 30. O ensaio identificou potenciais sítios fora do alvo para os sgRNAs testados.

TABELA 30- ANÁLISE FORA DO ALVO

ID de gRNA	Alvo	Sequência Guia	Contagem de

			Sítio Fora do Alvo (Saída melhorada)
G012753	Albumina	GACUGAAACUUCACAGAAUA	62
G012761	Albumina	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU	75
G012752	Albumina	UGACUGAAACUUCACAGAAU	223
G012764	Albumina	CCUCACUCUUGUCUGGGCAA	3.985
G012763	Albumina	UGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	5.443
G009857	Albumina	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	131
G009859	Albumina	UUAAAUAAAGCAUAGUGCAA	91
G009860	Albumina	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	133
G012762	Albumina	UGAUUCCUACAGAAAAACUC	68
G009844	Albumina	GAGCAACCUCACUCUUGUCU	107
G012765	Albumina	ACCUCACUCUUGUCUGGGCA	41
G012766	Albumina	UGAGCAACCUCACUCUUGUC	78
G009874	Albumina	UAAUAAAAUUCAAACAUCCU	53
G000644	EMX1	GAGUCCGAGCAGAAGAAGAA	304
G000645	VEGFA	GACCCCCUCCACCCCGCCUC	1.641

[0329] Em ensaios de detecção fora do alvo conhecidos, tais como o método bioquímico usado acima, um grande número de potenciais sítios fora do alvo são tipicamente recuperados, em concepção, de modo a “lançar uma rede ampla” para potenciais sítios que podem ser validados em outros contextos, por exemplo, em uma célula primária de interesse. Por exemplo, o método bioquímico sobre-representa, tipicamente, o número de potenciais sítios fora do alvo conforme o ensaio utiliza DNA genômico de alto peso molecular purificado livre do ambiente celular e é dependente da dose de RNP de Cas9 usada. Consequentemente, potenciais sítios fora do alvo identificados por esses métodos podem ser validados com o uso de sequenciamento alvejado dos potenciais sítios fora do alvo identificados.

[0330] Íntron 1 de albumina humana: (SEQ ID NO: 1)

GTAAGAAATCCATTTTTCTATTGTTCAACTTTTATTCTATTTTCCCAGTAAAATAA
AGTTTTAGTAAACTCTGCATCTTTAAAGAATTATTTTGGCATTTATTTCTAAAATG
GCATAGTATTTTGTATTTGTGAAGTCTTACAAGGTTATCTTATTAATAAAATTCAA
ACATCCTAGGTAAAAAAAAAAAAAGGTCAGAATTGTTTAGTGACTGTAATTTTCT
TTTGCGCACTAAGGAAAGTGCAAAGTAACTTAGAGTGACTGAAACTTCACAGAA
TAGGGTTGAAGATTGAATTCATAACTATCCCAAAGACCTATCCATTGCACTATGC
TTTATTTAAAAACCACAAAACCTGTGCTGTTGATCTCATAAATAGAACTTGTATTT
ATATTTATTTTCATTTTAGTCTGTCTTCTTGGTTGCTGTTGATAGACACTAAAAGA
GTATTAGATATTATCTAAGTTTGAATATAAGGCTATAAATATTTAATAATTTTTAA
AATAGTATTCTTGGTAATTGAATTATTCTTCTGTTTAAAGGCAGAAGAAATAATT
GAACATCATCCTGAGTTTTTCTGTAGGAATCAGAGCCCAATATTTTGAAACAAAT
GCATAATCTAAGTCAAATGGAAAGAAATATAAAAAGTAACATTATTACTTCTTGT
TTTCTTCAGTATTTAACAATCCTTTTTTTTCTTCCCTTGCCCAG

TABELA 9: SGRNA Humano E PADRÕES DE MODIFICAÇÃO

ID Guia	Sequência Completa	SEQ ID NO:	Sequência Completa Modificada	SEQ ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	34	mG*mA*mG*CAACCUCACUCUUGUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	66
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAAAUAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	35	mA*mU*mG*CAUUUGUUUCAAAAUAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	67
G009852	UGCAUUUGUUUCAAAAUAUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	36	mU*mG*mC*AUUUGUUUCAAAAUAUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	68
G009857	AUUUAUGAGAUCAACAGCACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG	37	mA*mU*mU*UAUGAGAUCAACAGCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA	69

	CUUUU		mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU	
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUUUGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	38	mG*mA*mU*CAACAGCACAGGUUUUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU	70
G009859	UUAAAUAAAGCAUAGUGCAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	39	mU*mU*mA*AAUAAAGCAUAGUGCAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU	71
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	40	mU*mA*mA*AGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU	72
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	41	mU*mA*mG*UGCAAUGGAUAGGUCUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU	73
G009866	UACUAAAACUUUAUUUUACUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	42	mU*mA*mC*UAAAACUUUAUUUUACUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU	74
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	43	mA*mA*mA*GUUGAACAAUAGAAAAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA	75

			mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGUCAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	44	mA*mA*mU*GCAUAAUCUAAGUCAAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	76
G009874	UAAUAAAAUUCAAACAUCCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	45	mU*mA*mA*UAAAAUUCAAACAUCCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	77
G012747	GCAUCUUUAAAGAAUUAUUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	46	mG*mC*mA*UCUUUAAAGAAUUAUUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	78
G012748	UUUGGCAUUUAUUUCUAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	47	mU*mU*mU*GGCAUUUAUUUCUAAAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	79
G012749	UGUAUUUGUGAAGUCUUACAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	48	mU*mG*mU*AUUUGUGAAGUCUUACAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	80
G012750	UCCUAGGUAAAAAAAAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	49	mU*mC*mC*UAGGUAAAAAAAAAAAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m	81

			U*mU*mU	
G012751	UAAUUUUCUUUUGCGCACUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	50	mU*mA*mA*UUUUCUUUUGCGCACUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	82
G012752	UGACUGAAACUUCACAGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	51	mU*mG*mA*CUGAAACUUCACAGAAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	83
G012753	GACUGAAACUUCACAGAAUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	52	mG*mA*mC*UGAAACUUCACAGAAUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	84
G012754	UUCAUUUUAGUCUGUCUUCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	53	mU*mU*mC*AUUUUAGUCUGUCUUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	85
G012755	AUUAUCUAAGUUUGAAUAUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	54	mA*mU*mU*AUCUAAGUUUGAAUAUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	86
G012756	AAUUUUUAAAAUAGUAUUCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	55	mA*mA*mU*UUUUAAAAUAGUAUUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	87

G012757	UGAAUUAUUCUUCUGUUUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	56	mU*mG*mA*AUUAUUCUUCUGUUUAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	88
G012758	AUCAUCCUGAGUUUUUCUGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	57	mA*mU*mC*AUCCUGAGUUUUUCUGUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	89
G012759	UUACUAAAACUUUAUUUUACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	58	mU*mU*mA*CUAAAACUUUAUUUUACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	90
G012760	ACCUUUUUUUUUUUUUACCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	59	mA*mC*mC*UUUUUUUUUUUUACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	91
G012761	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	60	mA*mG*mU*GCAAUGGAUAGGUCUUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	92
G012762	UGAUUCCUACAGAAAAACUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	61	mU*mG*mA*UUCCUACAGAAAAACUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	93
G0127	UGGGCAAGGGAAGAAAAAA	62	mU*mG*mG*GCAAGGGAAGAAA	94

63	AGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU		AAAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G012764	CCUCACUCUUGUCUGGGCAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	63	mC*mC*mU*CACUCUUGUCUGGGCAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	95
G012765	ACCUCACUCUUGUCUGGGCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	64	mA*mC*mC*UCACUCUUGUCUGGGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	96
G012766	UGAGCAACCUCACUCUUGUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	65	mU*mG*mA*GCAACCUCACUCUUGUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	97

TABELA 10. RNA GUIA DE ALBUMINA DE CAMUNDONGO

ID guia	Sequência Guia	Coordenadas Genômicas de Camundongo (mm10)	SEQ ID NO:
G000551	AUUUGCAUCUGAGAACCCUU	chr5:90461148-90461168	98
G000552	AUCGGGAACUGGCAUCUUCA	chr5:90461590-90461610	99
G000553	GUUACAGGAAAAUCUGAAGG	chr5:90461569-90461589	100
G000554	GAUCGGGAACUGGCAUCUUC	chr5:90461589-90461609	101
G000555	UGCAUCUGAGAACCCUUAGG	chr5:90461151-90461171	102
G000666	CACUCUUGUCUGUGGAAACA	chr5:90461709-90461729	103
G000667	AUCGUUACAGGAAAAUCUGA	chr5:90461572-90461592	104
G000668	GCAUCUUCAGGGAGUAGCUU	chr5:90461601-90461621	105

G000669	CAAUCUUUAAAUAUGUUGUG	chr5:90461674-90461694	106
G000670	UCACUCUUGUCUGUGGAAAC	chr5:90461710-90461730	107
G011722	UGCUUGUAUUUUUCUAGUAA	chr5:90461039-90461059	108
G011723	GUAAAUAUCUACUAAGACAA	chr5:90461425-90461445	109
G011724	UUUUUCUAGUAAUGGAAGCC	chr5:90461047-90461067	110
G011725	UUAUAUUAUUGAUAUAUUUU	chr5:90461174-90461194	111
G011726	GCACAGAUAUAAACACUUAA	chr5:90461480-90461500	112
G011727	CACAGAUAUAAACACUUAAC	chr5:90461481-90461501	113
G011728	GGUUUUAAAAAUAAUAAUGU	chr5:90461502-90461522	114
G011729	UCAGAUUUUCCUGUAACGAU	chr5:90461572-90461592	115
G011730	CAGAUUUUCCUGUAACGAUC	chr5:90461573-90461593	116
G011731	CAAUGGUAAAUAAGAAAUAA	chr5:90461408-90461428	117
G013018	GGAAAAUCUGAAGGUGGCAA	chr5:90461563-90461583	118
G013019	GGCGAUCUCACUCUUGUCUG	chr5:90461717-90461737	119

TABELA 11. SGRNA GUIA DE ALBUMINA DE CAMUNDONGO E PADRÃO DE MODIFICAÇÃO

ID Guia	Sequência Completa	SEQ ID NO:	Sequência Completa Modificada	SEQ ID NO:
G000551	AUUUGCAUCUGAGAACCCUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	120	mA*mU*mU*UGCAUCUGAGAACCCUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	142
G000552	AUCGGGAACUGGCAUCUUCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	121	mA*mU*mC*GGGAACUGGCAUCUUCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	143
G000553	GUUACAGGAAAAUCUGAAGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	122	mG*mU*mU*ACAGGAAAAUCUGAAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	144

G00054	GAUCGGGAACUGGCAUCUUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	123	mG*mA*mU*CGGGAACUGGCAUCUUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	145
G00055	UGCAUCUGAGAACCCUUAGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	124	mU*mG*mC*AUCUGAGAACCCUUAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	146
G00066	CACUCUUGUCUGUGGAAACAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	125	mC*mA*mC*UCUUGUCUGUGGAAACAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	147
G00067	AUCGUUACAGGAAAAUCUGAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	126	mA*mU*mC*GUUACAGGAAAAUCUGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	148
G00068	GCAUCUUCAGGGAGUAGCUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	127	mG*mC*mA*UCUUCAGGGAGUAGCUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	149
G00069	CAAUCUUUAAAUAUGUUGUGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	128	mC*mA*mA*UCUUUAAAUAUGUUGUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	150
G00070	UCACUCUUGUCUGUGGAAACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	129	mU*mC*mA*CUCUUGUCUGUGGAAACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	151

G011722	UGCUUGUAUUUUUCUAGUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	130	mU*mG*mC*UUGUAUUUUUCUAGUAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	152
G011723	GUAAAUAUCUACUAAGACAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	131	mG*mU*mA*AAUAUCUACUAAGACAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	153
G011724	UUUUUCUAGUAAUGGAAGCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	132	mU*mU*mU*UUCUAGUAAUGGAAGCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	154
G011725	UUAUAUUAUUGAUAUAUUUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	133	mU*mU*mA*UAUUAUUGAUAUAUUUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	155
G011726	GCACAGAUAUAAACACUUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	134	mG*mC*mA*CAGAUAUAAACACUUAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	156
G011727	CACAGAUAUAAACACUUAACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	135	mC*mA*mC*AGAUAUAAACACUUAACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	157
G011728	GGUUUUAAAAAUAAUAAUGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	136	mG*mG*mU*UUUAAAAAUAAUAAUGUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	158

G011729	UCAGAUUUUCCUGUAACGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	137	mU*mC*mA*GAUUUUCCUGUAACGAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	159
G011730	CAGAUUUUCCUGUAACGAUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	138	mC*mA*mG*AUUUUCCUGUAACGAUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	160
G011731	CAAUGGUAAAUAAGAAAUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	139	mC*mA*mA*UGGUAAAUAAGAAAUAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	161
G013018	GGAAAAUCUGAAGGUGGCAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	140	mG*mG*mA*AAAUCUGAAGGUGGCAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	162
G013019	GGCGAUCUCACUCUUGUCUGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	141	mG*mG*mC*GAUCUCACUCUUGUCUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	163

TABELA 12. RNA GUIA DE ALBUMINA CINO

ID guia	Sequência Guia	Coordenadas Genômicas Cino (mf5)	SEQ ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCU	chr5:61198711-61198731	2*
G009845	AGCAACCUCACUCUUGUCUG	chr5:61198712-61198732	165
G009846	ACCUCACUCUUGUCUGGGGA	chr5:61198716-61198736	166
G009847	CCUCACUCUUGUCUGGGGAA	chr5:61198717-61198737	167
G009848	CUCACUCUUGUCUGGGGAAG	chr5:61198718-61198738	168
G009849	GGGGAAGGGGAGAAAAAAAA	chr5:61198731-61198751	169

G009850	GGGAAGGGGAGAAAAAAAAA	chr5:61198732-61198752	170
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAAAUAU	chr5:61198825-61198845	3*
G009852	UGCAUUUGUUUCAAAAUAUU	chr5:61198826-61198846	4*
G009853	UGAUUCCUACAGAAAAAGUC	chr5:61198852-61198872	173
G009854	UACAGAAAAAGUCAGGAUAA	chr5:61198859-61198879	174
G009855	UUUCUUCUGCCUUUAAACAG	chr5:61198889-61198909	175
G009856	UUAUAGUUUUAUAUUCAAAC	chr5:61198957-61198977	176
G009857	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	chr5:61199062-61199082	5*
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUUUG	chr5:61199070-61199090	6*
G009859	UUAAAUAAAGCAUAGUGCAA	chr5:61199096-61199116	7*
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	chr5:61199101-61199121	8*
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU	chr5:61199108-61199128	9*
G009862	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUA	chr5:61199109-61199129	182
G009863	UUACUUUGCACUUUCCUUAG	chr5:61199186-61199206	183
G009864	UACUUUGCACUUUCCUUAGU	chr5:61199187-61199207	184
G009865	UCUGACCUUUUAUUUUACCU	chr5:61199238-61199258	185
G009866	UACUAAAACUUUAUUUUACU	chr5:61199367-61199387	10*
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAAAAA	chr5:61199401-61199421	11*
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGUCAAA	chr5:61198812-61198832	12*
G009869	AUUAUCCUGACUUUUUCUGU	chr5:61198860-61198880	189
G009870	UGAAUUAUUCCUCUGUUUAA	chr5:61198901-61198921	190
G009871	UAAUUUUCUUUUGCCCACUA	chr5:61199203-61199223	191
G009872	AAAAGGUCAGAAUUGUUUAG	chr5:61199229-61199249	192
G009873	AACAUCCUAGGUAAAAUAAA	chr5:61199246-61199266	193
G009874	UAAUAAAAUUCAAACAUCCU	chr5:61199258-61199278	13
G009875	UUGUCAUGUAUUUCUAAAAU	chr5:61199322-61199342	195
G009876	UUUGUCAUGUAUUUCUAAAA	chr5:61199323-61199343	196

SEQ ID NOs marcadas com um "*" acima indicam que a gRNA indicada é aplicável tanto a cino quanto a ser humano.

TABELA 13: SGRNA CINO E PADRÕES DE MODIFICAÇÃO

ID Guia	Sequência Completa	SEQ ID NO:	Sequência Completa Modificada	SEQ ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCUGUUUUAGAGCU	34*	mG*mA*mG*CAACCUCACUCUUGUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA	66*

	AGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU		mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	
G009845	AGCAACCUCACUCUUG UCUGGUUUUAGAGCU AGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	198	mA*mG*mC*AACCUCACUCUUGUCUG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	231
G009846	ACCUCACUCUUGUCU GGGGAGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGG UGCUUUU	199	mA*mC*mC*UCACUCUUGUCUGGGGA GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	232
G009847	CCUCACUCUUGUCUG GGGAAGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGG UGCUUUU	200	mC*mC*mU*CACUCUUGUCUGGGGAA GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	233
G009848	CUCACUCUUGUCUGG GGAAGGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGG UGCUUUU	201	mC*mU*mC*ACUCUUGUCUGGGGAAG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	234
G009849	GGGGAAGGGGAGAAA AAAAAGUUUUAGAGCU AGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	202	mG*mG*mG*GAAGGGGAGAAAAAAAA GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	235
G009850	GGGAAGGGGAGAAAA AAAAAGUUUUAGAGCU AGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	203	mG*mG*mG*AAGGGGAGAAAAAAAAAG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	236
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAA AUAUGUUUUAGAGCUA	35*	mA*mU*mG*CAUUUGUUUCAAAAUAUG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm	67*

	GAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU		UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	
G009852	UGCAUUUGUUUCAAAA UAUUGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	36*	mU*mG*mC*AUUUGUUUCAAAAUAUUG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	68*
G009853	UGAUUCCUACAGAAAA AGUCGUUUUAGAGCU AGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	206	mU*mG*mA*UUCCUACAGAAAAAGUCG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	239
G009854	UACAGAAAAAGUCAGG AUAAGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	207	mU*mA*mC*AGAAAAAGUCAGGAUAAG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	240
G009855	UUUCUUCUGCCUUUAA ACAGGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	208	mU*mU*mU*CUUCUGCCUUUAAACAG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	241
G009856	UUAUAGUUUUAUAUUC AAACGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	209	mU*mU*mA*UAGUUUUAUAUUCAAACG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	242
G009857	AUUUAUGAGAUCAACA GCACGUUUUAGAGCU AGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	37*	mA*mU*mU*UAUGAGAUCAACAGCACG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	69*
G009858	GAUCAACAGCACAGGU UUUGGUUUUAGAGCU	38*	mG*mA*mU*CAACAGCACAGGUUUUG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA	70*

	AGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU		mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G009859	UUAAAUAAAGCAUAGUGCAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	39*	mU*mU*mA*AAUAAAGCAUAGUGCAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	71*
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	40*	mU*mA*mA*AGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	72*
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	41*	mU*mA*mG*UGCAAUGGAUAGGUCUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	73*
G009862	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	215	mA*mG*mU*GCAAUGGAUAGGUCUUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	248
G009863	UUACUUUGCACUUUCCUUAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	216	mU*mU*mA*CUUUGCACUUUCCUUAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	249
G009864	UACUUUGCACUUUCCUUAGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	217	mU*mA*mC*UUUGCACUUUCCUUAGUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	250
G009865	UCUGACCUUUUAUUUUACCUGUUUUAGAGCUA	218	mU*mC*mU*GACCUUUUAUUUUACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA	251

	GAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU		mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	
G009866	UACUAAAACUUUAUUU UACUGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	42*	mU*mA*mC*UAAAACUUUAUUUUACUG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	74*
G009867	AAAGUUGAACAAUAGA AAAAGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	43*	mA*mA*mA*GUUGAACAAUAGAAAAAG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	75*
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGU CAAAGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	44*	mA*mA*mU*GCAUAAUCUAAGUCAAAG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	76*
G009869	AUUAUCCUGACUUUUU CUGUGUUUUAGAGCU AGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	222	mA*mU*mU*AUCCUGACUUUUUCUGU GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	255
G009870	UGAAUUAUUCCUCUGU UUAAGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	223	mU*mG*mA*AUUAUUCCUCUGUUUAAG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	256
G009871	UAAUUUUCUUUUGCCC ACUAGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	224	mU*mA*mA*UUUUCUUUUGCCCACUAG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	257
G009872	AAAAGGUCAGAAUUGU UUAGGUUUUAGAGCU	225	mA*mA*mA*AGGUCAGAAUUGUUUAGG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm	258

	AGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU		UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G009873	AACAUCCUAGGUAAAAUAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	226	mA*mA*mC*AUCCUAGGUAAAAUAAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	259
G009874	UAAUAAAAUUCAAACAUCCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	45*	mU*mA*mA*UAAAAUUCAAACAUCCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	77*
G009875	UUGUCAUGUAUUUCUAAAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	228	mU*mU*mG*UCAUGUAUUUCUAAAAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	261
G009876	UUUGUCAUGUAUUUCUAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	229	mU*mU*mU*GUCAUGUAUUUCUAAAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	262

SEQ ID NOs marcadas com um “*” acima indicam que a sgRNA indicada é aplicável tanto a cino quanto a ser humano.

TABELA 14: COMPONENTES DE VETOR E SEQUÊNCIAS

ID de Plasmídeo	ITR de 5’	1ª orientação			2ª orientação			ITR de 3’
		Aceitante de Splice	Transgene	Poli-A	Poli-A	Transgene	Aceitante de Splice	
P00415	(SEQ ID NO: 263)	Aceitante de Splice de Albumina de Camundo	Nluc-P2A-GFP (SEQ ID NO: 275)	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 267	Nluc-P2A-GFP (SEQ ID NO: 276)	Aceitante de Splice de Albumina de Camundon	(SEQ ID NO: 270)

		ngo (SEQ ID NO: 264)					go (SEQ ID NO: 269)	
P00450	(SEQ ID NO: 263)	Aceitante de Splice de Albumina de Camundongo (SEQ ID NO: 264)	SERPINA1 Humana (SEQ ID NO: 265)	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 267	SERPINA1 Humana (SEQ ID NO: 268)	Aceitante de Splice de Albumina de Camundongo (SEQ ID NO: 269)	(SEQ ID NO: 270)

[0331] Sequência de ITR de 5’ (SEQ ID NO: 263):

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT

[0332] Aceitante de Splice de Albumina de Camundongo (1ª orientação) (SEQ ID NO: 264):

TAGGTCAGTGAAGAGAAGAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCAT
CAATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAG

[0333] SERPINA1 Humana, 1ª Orientação (SEQ ID NO: 265):

GAGGACCCCCAGGGCGACGCCGCCCAGAAGACCGACACCAGCCACCACGACCA
GGACCACCCCACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCCGAGTTCGCCTTCAGC
CTGTACAGGCAGCTGGCCCACCAGAGCAACAGCACCAACATCTTCTTCAGCCCC
GTGAGCATCGCCACCGCCTTCGCCATGCTGAGCCTGGGCACCAAGGCCGACACC
CACGACGAGATCCTGGAGGGCCTGAACTTCAACCTGACCGAGATCCCCGAGGCC
CAGATCCACGAGGGCTTCCAGGAGCTGCTGAGGACCCTGAACCAGCCCGACAGC
CAGCTGCAGCTGACCACCGGCAACGGCCTGTTCCTGAGCGAGGGCCTGAAGCTG
GTGGACAAGTTCCTGGAGGACGTGAAGAAGCTGTACCACAGCGAGGCCTTCACC
GTGAACTTCGGCGACACCGAGGAGGCCAAGAAGCAGATCAACGACTACGTGGA
GAAGGGCACCCAGGGCAAGATCGTGGACCTGGTGAAGGAGCTGGACAGGGACA
CCGTGTTCGCCCTGGTGAACTACATCTTCTTCAAGGGCAAGTGGGAGAGGCCCTT
CGAGGTGAAGGACACCGAGGAGGAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGT
GAAGGTGCCCATGATGAAGAGGCTGGGCATGTTCAACATCCAGCACTGCAAGAA
GCTGAGCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAGTACCTGGGCAACGCCACCGCCATCTTC
TTCCTGCCCGACGAGGGCAAGCTGCAGCACCTGGAGAACGAGCTGACCCACGAC
ATCATCACCAAGTTCCTGGAGAACGAGGACAGGAGGAGCGCCAGCCTGCACCTG
CCCAAGCTGAGCATCACCGGCACCTACGACCTGAAGAGCGTGCTGGGCCAGCTG
GGCATCACCAAGGTGTTCAGCAACGGCGCCGACCTGAGCGGCGTGACCGAGGAG
GCCCCCCTGAAGCTGAGCAAGGCCGTGCACAAGGCCGTGCTGACCATCGACGAG
AAGGGCACCGAGGCCGCCGGCGCCATGTTCCTGGAGGCCATCCCCATGAGCATC
CCCCCCGAGGTGAAGTTCAACAAGCCCTTCGTGTTCCTGATGATCGAGCAGAACA
CCAAGAGCCCCCTGTTCATGGGCAAGGTGGTGAACCCCACCCAGAAGTAA

[0334] bGH Poli-A (1ª orientação) (SEQ ID NO: 266):

CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCT
TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA
TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA
GGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGG
TGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATC
CCC

[0335] SV40 Poli-A (2ª orientação) (SEQ ID NO: 267):

AAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTT
GTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCA
CAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAA
CTCATCAATGTATCTTATCATGTCTG

[0336] SERPINA1 Humana, 2ª Orientação (SEQ ID NO: 268):

GAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCCACCATGATCAG
GATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTCAGCC
TATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGT
GAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCAC
GATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAG
ATCCATGAAGGCTTCCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAG
CTCCAGCTGACCACCGGCAATGGCCTGTTCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTG
GATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCA
ACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAG
GGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTT
TTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAG
TCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGG
TGCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTC
CAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCTG
CCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATGAACTCACCCACGATATCATC
ACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAAA
CTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCCTGGGTCAACTGGGCATCA
CTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCC
TGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGA
CTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCCCGA
GGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCT
CCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAAAAtaa

[0337] Aceitante de Splice de Albumina de Camundongo (2ª orientação) (SEQ ID NO: 269):

CTGTGGAAACAGGGAGAGAAAAACCACACAACATATTTAAAGATTGATGAAGAC
AACTAACTGTAATATGCTGCTTTTTGTTCTTCTCTTCACTGACCTA

[0338] Sequência de ITR de 3’ (SEQ ID NO: 270):

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
TGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTC
AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

[0339] Nluc-P2A-GFP (1ª Orientação) (SEQ ID NO: 275):

TTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATT
CAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAG
AAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCAGTATTCACTTTGGAGGACTTTGTCGGTGACTG
GAGGCAAACCGCTGGTTATAATCTCGACCAAGTACTGGAACAGGGCGGGGTAAG
TTCCCTCTTTCAGAATTTGGGTGTAAGCGTCACACCAATCCAGCGGATTGTGTTG
TCTGGAGAGAACGGACTCAAAATTGACATCCATGTTATCATTCCATATGAAGGTC
TCAGTGGAGACCAAATGGGGCAGATCGAGAAGATTTTCAAGGTAGTTTACCCAG
TCGACGATCACCACTTCAAAGTCATTCTCCACTATGGCACACTTGTTATCGACGG
AGTAACTCCTAATATGATTGATTACTTTGGTCGCCCGTATGAGGGCATCGCAGTG
TTTGATGGCAAAAAGATCACCGTAACAGGAACGTTGTGGAATGGGAACAAGATA
ATCGACGAGAGATTGATAAATCCAGACGGGTCACTCCTGTTCAGGGTTACAATTA
ACGGCGTCACAGGATGGAGACTCTGTGAACGAATACTGGCCACAAATTTTTCACT
CCTGAAGCAGGCCGGAGACGTGGAGGAAAACCCAGGGCCCGTGAGCAAGGGCG
AGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAA
ACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
AGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAC
CCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCAC

ATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAG
CGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG
TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG
GAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAAC
GTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATC
CGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC
ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCC
AGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGG
AGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAG
GAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAA

[0340] Nluc-P2A-GFP (2ª Orientação) (SEQ ID NO: 276):

TTACACCTTCCTCTTCTTCTTGGGGCTGCCGCCGCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC
CCAGGGTGATGCCGGCGGCGGTCACGAACTCCAGCAGCACCATGTGGTCCCTCTT
CTCGTTGGGGTCCTTGCTCAGGGCGCTCTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGC
AGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCCAGC
TGCACGCTGCCGTCCTCGATGTTGTGCCTGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTT
CTTCTGCTTGTCGGCCATGATGTACACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCT
TGTGGCCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATCCT
GTTCACCAGGGTGTCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCCCTGGTCTTGTAGTTGCCG
TCGTCCTTGAAGAAGATGGTCCTCTCCTGCACGTAGCCCTCGGGCATGGCGCTCT
TGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTCGGGGTACCTGCTGAAGCACTGCACGCC
GTAGGTCAGGGTGGTCACCAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGT
GCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCGTCGCCCTCGCCCTCGCCG
CTCACGCTGAACTTGTGGCCGTTCACGTCGCCGTCCAGCTCCACCAGGATGGGCA
CCACGCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACGGGGCCGGGGTTCTCCTCCAC
GTCGCCGGCCTGCTTCAGCAGGCTGAAGTTGGTGGCCAGGATCCTCTCGCACAGC
CTCCAGCCGGTCACGCCGTTGATGGTCACCCTGAACAGCAGGCTGCCGTCGGGGT
TGATCAGCCTCTCGTCGATGATCTTGTTGCCGTTCCACAGGGTGCCGGTCACGGT
GATCTTCTTGCCGTCGAACACGGCGATGCCCTCGTAGGGCCTGCCGAAGTAGTCG
ATCATGTTGGGGGTCACGCCGTCGATCACCAGGGTGCCGTAGTGCAGGATCACCT
TGAAGTGGTGGTCGTCCACGGGGTACACCACCTTGAAAATCTTCTCGATCTGGCC
CATCTGGTCGCCGCTCAGGCCCTCGTAGGGGATGATCACGTGGATGTCGATCTTC
AGGCCGTTCTCGCCGCTCAGCACGATCCTCTGGATGGGGGTCACGCTCACGCCCA
GGTTCTGGAACAGGCTGCTCACGCCGCCCTGCTCCAGCACCTGGTCCAGGTTGTA
GCCGGCGGTCTGCCTCCAGTCGCCCACGAAGTCCTCCAGGGTGAACACGGCCTCC
TCGAAGCTGCACTTCTCCTCCATGCACTCCCTCTCCAGGTTGCCCTGCACGAACTC
CTCCAGCTTGCCGCTGTTGTACCTCTTGGGCCTGTTCAGGATCTTGTTGGCGTTCT
CGTGGTCCAGGAA

[0341] Sequência completa de P00415 (de ITR para ITR): (SEQ ID NO: 279)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTAGATCTCTTAGGTCAGTG
AAGAGAAGAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAA
TATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGC
CAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTT
TGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGA
AGCAGTATTCACTTTGGAGGACTTTGTCGGTGACTGGAGGCAAACCGCTGGTTAT
AATCTCGACCAAGTACTGGAACAGGGCGGGGTAAGTTCCCTCTTTCAGAATTTGG

GTGTAAGCGTCACACCAATCCAGCGGATTGTGTTGTCTGGAGAGAACGGACTCA
AAATTGACATCCATGTTATCATTCCATATGAAGGTCTCAGTGGAGACCAAATGGG
GCAGATCGAGAAGATTTTCAAGGTAGTTTACCCAGTCGACGATCACCACTTCAAA
GTCATTCTCCACTATGGCACACTTGTTATCGACGGAGTAACTCCTAATATGATTG
ATTACTTTGGTCGCCCGTATGAGGGCATCGCAGTGTTTGATGGCAAAAAGATCAC
CGTAACAGGAACGTTGTGGAATGGGAACAAGATAATCGACGAGAGATTGATAAA
TCCAGACGGGTCACTCCTGTTCAGGGTTACAATTAACGGCGTCACAGGATGGAG
ACTCTGTGAACGAATACTGGCCACAAATTTTTCACTCCTGAAGCAGGCCGGAGAC
GTGGAGGAAAACCCAGGGCCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGT
GGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGT
GTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCAT
CTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACC
TACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCT
TCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA
CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGT
GAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGG
GCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAA
GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGG
CAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCC
CGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA
CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGG
GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGA
AGAGAAAGGTCTAACCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC
CCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTA
ATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG
GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA
TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGG
CTCTAGGGGGTATCCCCAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATA
AAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAA
TAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTA
GTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTACACCTTCCTC
TTCTTCTTGGGGCTGCCGCCGCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCCAGGGTGATGC
CGGCGGCGGTCACGAACTCCAGCAGCACCATGTGGTCCCTCTTCTCGTTGGGGTC
CTTGCTCAGGGCGCTCTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCACGGG
GCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCCAGCTGCACGCTGCCG
TCCTCGATGTTGTGCCTGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTC
GGCCATGATGTACACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGGCCCAGG
ATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATCCTGTTCACCAGGGT
GTCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCCCTGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAG
AAGATGGTCCTCTCCTGCACGTAGCCCTCGGGCATGGCGCTCTTGAAGAAGTCGT
GCTGCTTCATGTGGTCGGGGTACCTGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTCAGGGT
GGTCACCAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTT
CAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCGTCGCCCTCGCCCTCGCCGCTCACGCTGAAC
TTGTGGCCGTTCACGTCGCCGTCCAGCTCCACCAGGATGGGCACCACGCCGGTGA
ACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACGGGGCCGGGGTTCTCCTCCACGTCGCCGGCCTG
CTTCAGCAGGCTGAAGTTGGTGGCCAGGATCCTCTCGCACAGCCTCCAGCCGGTC
ACGCCGTTGATGGTCACCCTGAACAGCAGGCTGCCGTCGGGGTTGATCAGCCTCT
CGTCGATGATCTTGTTGCCGTTCCACAGGGTGCCGGTCACGGTGATCTTCTTGCC
GTCGAACACGGCGATGCCCTCGTAGGGCCTGCCGAAGTAGTCGATCATGTTGGG
GGTCACGCCGTCGATCACCAGGGTGCCGTAGTGCAGGATCACCTTGAAGTGGTG

GTCGTCCACGGGGTACACCACCTTGAAAATCTTCTCGATCTGGCCCATCTGGTCG
CCGCTCAGGCCCTCGTAGGGGATGATCACGTGGATGTCGATCTTCAGGCCGTTCT
CGCCGCTCAGCACGATCCTCTGGATGGGGGTCACGCTCACGCCCAGGTTCTGGAA
CAGGCTGCTCACGCCGCCCTGCTCCAGCACCTGGTCCAGGTTGTAGCCGGCGGTC
TGCCTCCAGTCGCCCACGAAGTCCTCCAGGGTGAACACGGCCTCCTCGAAGCTGC
ACTTCTCCTCCATGCACTCCCTCTCCAGGTTGCCCTGCACGAACTCCTCCAGCTTG
CCGCTGTTGTACCTCTTGGGCCTGTTCAGGATCTTGTTGGCGTTCTCGTGGTCCAG
GAA

[0342] P00450 SEQ ID NO: 289

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTAGATCTACTAGTtaggtcagtga
agagaagaacaaaaagcagcatattacagttagttgtcttcatcaatctttaaatatgttgtgtggtttttctctccctgtttccacagttGA
GGACCCCCAGGGCGACGCCGCCCAGAAGACCGACACCAGCCACCACGACCAGG
ACCACCCCACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCCGAGTTCGCCTTCAGCCT
GTACAGGCAGCTGGCCCACCAGAGCAACAGCACCAACATCTTCTTCAGCCCCGT
GAGCATCGCCACCGCCTTCGCCATGCTGAGCCTGGGCACCAAGGCCGACACCCA
CGACGAGATCCTGGAGGGCCTGAACTTCAACCTGACCGAGATCCCCGAGGCCCA
GATCCACGAGGGCTTCCAGGAGCTGCTGAGGACCCTGAACCAGCCCGACAGCCA
GCTGCAGCTGACCACCGGCAACGGCCTGTTCCTGAGCGAGGGCCTGAAGCTGGT
GGACAAGTTCCTGGAGGACGTGAAGAAGCTGTACCACAGCGAGGCCTTCACCGT
GAACTTCGGCGACACCGAGGAGGCCAAGAAGCAGATCAACGACTACGTGGAGA
AGGGCACCCAGGGCAAGATCGTGGACCTGGTGAAGGAGCTGGACAGGGACACC
GTGTTCGCCCTGGTGAACTACATCTTCTTCAAGGGCAAGTGGGAGAGGCCCTTCG
AGGTGAAGGACACCGAGGAGGAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTG
AAGGTGCCCATGATGAAGAGGCTGGGCATGTTCAACATCCAGCACTGCAAGAAG
CTGAGCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAGTACCTGGGCAACGCCACCGCCATCTTCT
TCCTGCCCGACGAGGGCAAGCTGCAGCACCTGGAGAACGAGCTGACCCACGACA
TCATCACCAAGTTCCTGGAGAACGAGGACAGGAGGAGCGCCAGCCTGCACCTGC
CCAAGCTGAGCATCACCGGCACCTACGACCTGAAGAGCGTGCTGGGCCAGCTGG
GCATCACCAAGGTGTTCAGCAACGGCGCCGACCTGAGCGGCGTGACCGAGGAGG
CCCCCCTGAAGCTGAGCAAGGCCGTGCACAAGGCCGTGCTGACCATCGACGAGA
AGGGCACCGAGGCCGCCGGCGCCATGTTCCTGGAGGCCATCCCCATGAGCATCC
CCCCCGAGGTGAAGTTCAACAAGCCCTTCGTGTTCCTGATGATCGAGCAGAACAC
CAAGAGCCCCCTGTTCATGGGCAAGGTGGTGAACCCCACCCAGAAGTAACAGAC
ATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAA
AAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAG
CTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAG
GGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTggggataccccctagagccccagctggttctttccgcctcagaagccataga
gcccaccgcatccccagcatgcctgctattgtcttcccaatcctcccccttgctgtcctgccccaccccaccccccagaatagaatgac
acctactcagacaatgcgatgcaatttcctcattttattaggaaaggacagtgggagtggcaccttccagggtcaaggaaggcacggg
ggaggggcaaacaacagatggctggcaactagaaggcacagtcgaggttaTTTTTGGGTGGGATTCACCACTT
TTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCAATCATTAAGAAGACAAAGG
GTTTGTTGAACTTGACCTCGGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACAT
GGCCCCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACG
GCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGTGACCCCGGAGAGGTCAGCCCCAT
TGCTGAAGACCTTAGTGATGCCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCATAGGT
TCCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTT

TCCAGGAACTTGGTGATGATATCGTGGGTGAGTTCATTTTCCAGGTGCTGTAGTT
TCCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGCATTGCCCAGGTATTTCATCA
GCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCTAAACG
CTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCCTCTTCC
TCGGTGTCCTTGACTTCAAAGGGTCTCTCCCATTTGCCTTTAAAGAAGATGTAATT
CACCAGAGCAAAAACTGTGTCTCTGTCAAGCTCCTTGACCAAATCCACAATTTTC
CCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGTC
CCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACTTTTTAACATCCTCCAAA
AACTTATCCACTAGCTTCAGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCA
GCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAGGAGTTCCTGGAAGCCTTC
ATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATT
TCATCGTGAGTGTCAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGGCTGTAGCG
ATGCTCACTGGGGAGAAGAAGATATTGGTGCTGTTGGACTGGTGTGCCAGCTGG
CGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGATCTTGTTGAAGGTT
GGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGG
GATCCTCaactgtggaaacagggagagaaaaaccacacaacatatttaaagattgatgaagacaactaactgtaatatgctgcttt
ttgttcttctcttcactgacctaACTAGTAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC
CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCG
GGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT
GGCCAA

[0343] Sequência de Peptídeo de Sinal de Albumina SEQ ID NO: 2.000

MKWVTFISLLFLFSSAYS

REIVINDICAÇÕES

1. Método para introduzir um ácido nucleico de SERPINA1 a uma célula ou população de células **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar:

i) um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação de proteína AAT heteróloga;

ii) um agente de ligação de DNA guiado por RNA; e

iii) um RNA guia (gRNA) de albumina que compreende uma sequência escolhida de:

a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97;

d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33;

e) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33;

f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e

g) uma sequência que é complementar a 15 nucleotídeos consecutivos +/- 10 nucleotídeos das coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2 a 33,

assim introduzindo o ácido nucleico de SERPINA1 à célula ou população de células.

2. Método para expressar AAT em um indivíduo que necessita do mesmo **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar:

i) um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação de proteína AAT heteróloga;

ii) um agente de ligação de DNA guiado por RNA; e

iii) um RNA guia (gRNA) de albumina que compreende uma sequência escolhida de:

a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97;

d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33;

e) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33;

f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e

g) uma sequência que é complementar a 15 nucleotídeos consecutivos +/- 10 nucleotídeos das coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2 a 33,

assim expressando AAT em um indivíduo que necessita da mesma.

3. Método para tratar deficiência de alfa-1 antitripsina (AATD) em um indivíduo que necessita de proteína AAT **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar:

i) um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação de proteína AAT heteróloga;

ii) um agente de ligação de DNA guiado por RNA; e

iii) um RNA guia (gRNA) de albumina que compreende uma sequência escolhida de:

a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97;

d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33;

e) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33;

f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e

g) uma sequência que é complementar a 15 nucleotídeos consecutivos +/- 10 nucleotídeos das coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2 a 33,

assim tratando AATD no indivíduo.

4. Método para aumentar a secreção de AAT de uma célula de fígado ou população de células **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar:

i) um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação de proteína AAT heteróloga;

ii) um agente de ligação de DNA guiado por RNA; e

iii) um RNA guia (gRNA) de albumina que compreende uma sequência escolhida de:

a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 2, 8, 13, 19, 28,

29, 31, 32, 33;

b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97;

d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33;

e) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33;

f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e

g) uma sequência que é complementar a 15 nucleotídeos consecutivos +/- 10 nucleotídeos das coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2 a 33,

assim aumentando a secreção de AAT da célula de fígado ou da população de células.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, sendo que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente induzir uma quebra de fita dupla (DSB) no gene SERPINA1 endógeno.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, sendo que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente modificar o gene SERPINA1 endógeno.

7. Método, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a DSB é induzida no gene SERPINA1 endógeno e/ou o gene SERPINA1 endógeno é modificado antes ou após administrar o construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação de proteína AAT heteróloga, o agente de ligação de DNA guiado por RNA e o gRNA de albumina.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, sendo que

o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente administrar um RNA guia de SERPINA1 que é pelo menos parcialmente complementar a uma sequência-alvo presente no éxon 2, 3, 4 ou 5 do gene de SERPINA1 humano endógeno.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o RNA guia de SERPINA1 compreende uma sequência guia selecionada das SEQ ID NOs: 1.000 a 1.128 ou uma sequência guia que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a 17, 18, 19 e/ou 20 nucleotídeos consecutivos de uma sequência escolhida das SEQ ID NOs: 1.000 a 1.128.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8, sendo que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente administrar um agente de ligação de DNA guiado por RNA com o RNA guia de SERPINA1.

11. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a união de extremidade não homóloga (NHEJ) leva a uma mutação durante o reparo de uma DSB no gene SERPINA1 endógeno.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a NHEJ leva a uma deleção ou inserção de um nucleotídeo (ou nucleotídeos) durante o reparo de uma DSB no gene SERPINA1 endógeno.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a deleção ou inserção de um nucleotídeo (ou nucleotídeos) induz um deslocamento de quadro ou mutação sem sentido no gene SERPINA1 endógeno.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a administração é in vitro.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a administração é in vivo.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que gRNA de albumina compreende uma sequência

guia que compreende uma sequência escolhida de:

a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico é administrado em um vetor de ácido nucleico e/ou uma nanopartícula lipídica.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de ligação de DNA guiado por RNA, e/ou gRNA de albumina é administrado em um vetor de ácido nucleico e/ou nanopartícula lipídica.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de ligação de DNA guiado por RNA, e/ou gRNA de SERPINA1 é administrado em um vetor de ácido nucleico e/ou nanopartícula lipídica.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor de ácido nucleico é um vetor viral.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor viral é selecionado do grupo que consiste em um vetor viral adenoassociado (AAV), vetor de adenovírus, vetor de retrovírus e vetor de lentivírus.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor AAV é selecionado do grupo que consiste em 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, AAV 12, rh10 e híbridos dos mesmos.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico, agente de ligação de DNA guiado por RNA, gRNA de albumina e gRNA de SERPINA1 são administrados sequencialmente, em qualquer ordem e/ou em qualquer combinação.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico, agente de ligação de DNA guiado por RNA, gRNA de albumina e gRNA de SERPINA1, individualmente ou em qualquer combinação, são administrados simultaneamente.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de ligação de DNA guiado por RNA, ou agente de ligação de DNA guiado por RNA e gRNA de albumina em combinação, é administrado antes de administrar o construto de ácido nucleico.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico é administrado antes de administrar o gRNA de albumina e/ou agente de ligação de DNA guiado por RNA.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de ligação de DNA guiado por RNA é uma Cas nuclease de classe 2.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a Cas nuclease é uma Cas9 nuclease.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a Cas9 nuclease é uma Cas9 nuclease de S. pyogenes.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a Cas nuclease é uma clivase.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a Cas nuclease é uma nickase.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico é um construto de ácido nucleico bidirecional.

33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico é de fita simples ou de fita dupla.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico é um DNA de fita simples ou um DNA de fita dupla.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 34, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto bidirecional não compreende um promotor que aciona a expressão da proteína AAT heteróloga.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 35, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o nível de indivíduo de AAT funcional é aumentado a pelo menos cerca de 500 µg/ml.

37. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o nível do indivíduo de AAT funcional é aumentado em pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ou mais, em comparação com o nível do indivíduo de AAT funcional antes da administração.

38. Método, de acordo com a reivindicação 36 ou 37, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o nível de AAT é medido em soro, plasma, sangue, fluido espinhal cerebral e/ou esputo.

39. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 38, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula ou população de células expressa AAT

funcional em um nível que é aumentado por pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ou mais, em comparação com um nível antes da administração.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula ou população de células tem capacidade de expressar AAT.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula ou população de células que têm capacidade para expressar AAT se origina de um tecido de quaisquer um ou mais dentre fígado, pulmão, órgão gástrico, rim, estômago, intestino delgado distal e proximal, pâncreas, glândulas adrenais ou cérebro.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4, 5, 8 a 37 ou 41, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula ou população de células inclui uma célula de fígado (por exemplo, hepatócito) ou uma célula de pulmão.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula de fígado é um hepatócito.

44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 43, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o acúmulo de AAT no fígado é reduzido.

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 44, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico compreende uma sequência que codifica uma proteína AAT de tipo selvagem, ou um fragmento funcional da mesma.

46. Método para expressar AAT em um indivíduo que necessita da mesma **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo um construto de ácido nucleico bidirecional que compreende uma sequência de codificação de proteína AAT heteróloga, assim expressando AAT no indivíduo.

47. Método para tratar deficiência de alfa-1 antitripsina (AATD) em um

indivíduo que necessita de proteína AAT **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar um construto de ácido nucleico bidirecional que compreende uma sequência de codificação de proteína AAT heteróloga, assim tratando AATD no indivíduo.

48. Método para expressar AAT em uma célula ou população de células **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar à célula ou população de células um construto de ácido nucleico bidirecional que compreende a sequência de codificação de proteína AAT heteróloga, assim expressando AAT na célula ou população de células.

49. Método para aumentar a secreção de AAT de uma célula de fígado ou população de células **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar à célula ou população de células um construto de ácido nucleico bidirecional que compreende uma sequência de codificação de proteína AAT heteróloga, assim aumentando a secreção de AAT da célula de fígado ou população de células.

50. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 49, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico bidirecional compreende:

a) um primeiro segmento que compreende uma sequência de codificação para uma AAT heteróloga; e

b) um segundo segmento que compreende um complemento reverso de uma sequência de codificação da AAT heteróloga,

em que o construto não compreende um promotor que aciona a expressão da AAT heteróloga.

51. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 49, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico bidirecional compreende:

a) um primeiro segmento que compreende uma sequência de codificação para

uma AAT heteróloga; e

b) um segundo segmento que compreende um complemento reverso de uma sequência de codificação de um segundo polipeptídeo,

em que o construto não compreende um promotor que aciona a expressão da AAT heteróloga e/ou do segundo polipeptídeo.

52. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 51, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar um agente de ligação de DNA guiado por RNA.

53. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 52, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente administrar um gRNA de albumina.

54. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 53, sendo que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente induzir uma quebra de fita dupla (DSB) no gene SERPINA1 endógeno.

55. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 54, sendo que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente modificar o gene SERPINA1 endógeno.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 55, sendo que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente administrar um RNA guia de SERPINA1 que é pelo menos parcialmente complementar a uma sequência-alvo presente no éxon 2, 3, 4 ou 5 do gene de SERPINA1 humano endógeno.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o RNA guia de SERPINA1 compreende uma sequência guia selecionada das SEQ ID NOs: 1.000 a 1.128 ou uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada das SEQ ID NOS: 1.000 a 1.128.

58. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 57, sendo

que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente administrar um agente de ligação de DNA guiado por RNA.

59. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 58, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a união de extremidade não homóloga (NHEJ) leva a uma mutação durante o reparo de uma DSB no gene SERPINA1 endógeno.

60. Método, de acordo com a reivindicação 59, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a NHEJ leva a uma deleção ou inserção de um nucleotídeo (ou nucleotídeos) durante o reparo de uma DSB no gene SERPINA1 endógeno.

61. Método, de acordo com a reivindicação 60, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a deleção ou inserção de um nucleotídeo (ou nucleotídeos) induz um deslocamento de quadro ou mutação sem sentido no gene SERPINA1 endógeno.

62. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 61, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a administração é in vitro.

63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 61, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a administração é in vivo.

64. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 63, **CARACTERIZADO** pelo fato de que gRNA de albumina compreende uma sequência guia que compreende uma sequência escolhida de:

a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97.

65. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 64, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto bidirecional é administrado em um

vetor de ácido nucleico e/ou uma nanopartícula lipídica.

66. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 65, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de ligação de DNA guiado por RNA, e/ou gRNA de albumina é administrado em um vetor de ácido nucleico e/ou nanopartícula lipídica.

67. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 66, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de ligação de DNA guiado por RNA, e/ou gRNA de SERPINA1 é administrado em um vetor de ácido nucleico e/ou nanopartícula lipídica.

68. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 67, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor de ácido nucleico é um vetor viral.

69. Método, de acordo com a reivindicação 68, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor viral é selecionado do grupo que consiste em um vetor viral adenoassociado (AAV), vetor de adenovírus, vetor de retrovírus e vetor de lentivírus.

70. Método, de acordo com a reivindicação 69, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor AAV é selecionado do grupo que consiste em 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, AAV 12, rh10 e híbridos dos mesmos.

71. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 70, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto bidirecional, agente de ligação de DNA guiado por RNA, gRNA de albumina e gRNA de SERPINA1 são administrados sequencialmente, em qualquer ordem e/ou em qualquer combinação.

72. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 70, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto bidirecional, agente de ligação de DNA guiado por RNA, gRNA de albumina e gRNA de SERPINA1, individualmente ou em qualquer combinação, são administrados simultaneamente.

73. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 70, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de ligação de DNA guiado por RNA, ou agente de ligação de DNA guiado por RNA e gRNA de albumina em combinação, é administrado antes de administrar o construto de ácido nucleico.

74. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 70, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto bidirecional é administrado antes de administrar o gRNA de albumina e/ou agente de ligação de DNA guiado por RNA.

75. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 74, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de ligação de DNA guiado por RNA é uma Cas nuclease de classe 2.

76. Método, de acordo com a reivindicação 75, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a Cas nuclease é uma Cas9.

77. Método, de acordo com a reivindicação 76, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a Cas nuclease é uma Cas9 nuclease de S. pyogenes.

78. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 75 a 77, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a Cas nuclease é uma clivase.

79. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 75 a 77, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a Cas nuclease é uma nickase.

80. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 79, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico bidirecional é DNA de fita simples.

81. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 80, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico bidirecional é um DNA de fita dupla.

82. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46, 47 ou 50 a 81, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o nível de indivíduo de AAT funcional é aumentado a pelo menos cerca de 500 ug/ml.

83. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46, 47 ou 50 a 81, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o nível do indivíduo de AAT funcional é aumentado em pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ou mais, em comparação com o nível do indivíduo de AAT funcional antes da administração.

84. Método, de acordo com a reivindicação 82 ou 83, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o nível de AAT é medido em soro, plasma, sangue, fluido espinhal cerebral e/ou esputo.

85. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 81, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula ou população de células expressa AAT funcional em um nível que é aumentado por pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ou mais, em comparação com um nível antes da administração.

86. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 81 ou 85, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula ou população de células inclui uma célula de fígado.

87. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 86, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o acúmulo de AAT no fígado é reduzido.

88. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 87, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o construto de ácido nucleico compreende uma sequência que codifica uma proteína AAT de tipo selvagem, ou um fragmento funcional da mesma.

89. Método para tratar deficiência de alfa-1 antitripsina (AATD) em um indivíduo que necessita de proteína AAT **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar:

i) um sistema de edição de gene com capacidade para reduzir a expressão endógena de SERPINA1;

ii) um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação de proteína AAT heteróloga;

iii) um agente de ligação de DNA guiado por RNA; e

iv) um RNA guia (gRNA) de albumina que compreende uma sequência escolhida de:

a) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID Nos: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 e 33;

b) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 e 33;

c) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 e 97;

d) uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 2 a 33;

e) pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 a 33;

f) uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 34 a 97; e

g) uma sequência que é complementar a 15 nucleotídeos consecutivos +/- 10 nucleotídeos das coordenadas genômicas listadas para as SEQ ID NOs: 2 a 33,

assim tratando AATD no indivíduo.

90. Método, de acordo com a reivindicação 88, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sistema de edição de gene compreende um RNA guia de SERPINA1 que compreende uma sequência guia selecionada das SEQ ID NOs: 1.000 a 1.128 ou uma sequência que é pelo menos 95%, 90%, 85%, 80% ou 75% idêntica a uma sequência selecionada das SEQ ID NOS: 1.000 a 1.128.

91. Construto de ácido nucleico bidirecional **CARACTERIZADO** pelo fato de

que compreende:

a) um primeiro segmento que compreende uma sequência de codificação para um polipeptídeo AAT; e

b) um segundo segmento que compreende um complemento reverso de uma sequência de codificação do polipeptídeo AAT,

em que o construto não compreende um promotor que aciona a expressão do polipeptídeo AAT.

92. Construto de ácido nucleico bidirecional, de acordo com a reivindicação 91, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o segundo segmento é 3' do primeiro segmento.

93. Construto de ácido nucleico bidirecional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 92, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de codificação do complemento reverso no segundo segmento adota um uso de códon diferente daquele da sequência de codificação do primeiro segmento a fim de reduzir a formação de grampo.

94. Construto bidirecional **CARACTERIZADO** pelo fato de que o complemento reverso é:

a. não substancialmente complementar à sequência de codificação do primeiro segmento;

b. não substancialmente complementar a um fragmento da sequência de codificação do primeiro segmento;

c. altamente complementar à sequência de codificação do primeiro segmento;

d. altamente complementar a um fragmento da sequência de codificação do primeiro segmento;

e. pelo menos 60% idêntica ao complemento reverso da sequência de codificação do primeiro segmento;

f. pelo menos 70% idêntica ao complemento reverso da sequência de

codificação do primeiro segmento;

f. pelo menos 90% idêntica ao complemento reverso da sequência de codificação do primeiro segmento;

g. 50 a 80% idêntica ao complemento reverso da sequência de codificação do primeiro segmento; e/ou

h. pelo menos 60 a 100% idêntica ao complemento reverso da sequência de codificação do primeiro segmento.

95. Construto de ácido nucleico bidirecional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 93, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o segundo segmento compreende uma sequência de nucleotídeo que tem cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97% ou cerca de 99% de complementaridade com a sequência de codificação no primeiro segmento.

96. Construto de ácido nucleico bidirecional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 94, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de codificação do segundo segmento codifica o polipeptídeo AAT com o uso de um ou mais códons alternativos para um ou mais aminoácidos codificados pela sequência de codificação no primeiro segmento.

97. Construto de ácido nucleico bidirecional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 96, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência do segundo segmento é um complemento reverso da sequência de codificação do primeiro segmento.

98. Construto de ácido nucleico bidirecional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 97, sendo que o construto é **CARACTERIZADO** pelo fato de que não compreende um braço de homologia.

99. Construto de ácido nucleico bidirecional, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 91 a 98, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o primeiro segmento é ligado ao segundo segmento por um ligante.

100. Construto de ácido nucleico bidirecional, de acordo com a reivindicação 99, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ligante tem 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1.000, 1.500, 2.000 nucleotídeos em comprimento.

101. Construto de ácido nucleico bidirecional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 100, **CARACTERIZADO** pelo fato de que cada um do primeiro e segundo segmentos compreende uma sequência de cauda de poliadenilação.

102. Construto de ácido nucleico bidirecional, de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 101, sendo que o construto é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um sítio aceitante de splicing.

103. Construto de ácido nucleico bidirecional, de acordo com a reivindicação 102, sendo que o construto é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um primeiro sítio aceitante de splicing a montante do primeiro segmento e um segundo sítio aceitante de splicing (reverso) a jusante do segundo segmento.

104. Construto de ácido nucleico bidirecional, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 103, sendo que o construto é **CARACTERIZADO** pelo fato de que é DNA de fita dupla, opcionalmente de fita dupla.

105. Construto de ácido nucleico bidirecional, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 104, sendo que o construto é **CARACTERIZADO** pelo fato de que é DNA de fita simples, opcionalmente de fita simples.

106. Construto de ácido nucleico bidirecional, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 105, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência que codifica o polipeptídeo AAT é otimizado por códon.

107. Construto de ácido nucleico bidirecional, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 106, sendo que o construto é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma ou mais das seguintes estruturas terminais: grampo, alças,

repetições terminais invertidas (ITR) ou toroide.

108. Construto de ácido nucleico bidirecional, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 107, sendo que o construto é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma, duas ou três repetições terminais invertidas (ITR).

109. Construto de ácido nucleico bidirecional, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 108, sendo que o construto é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende no máximo duas ITRs.

110. Vetor **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o construto, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 91 a 109.

111. Vetor, de acordo com a reivindicação 110, sendo que o vetor é **CARACTERIZADO** pelo fato de que é um vetor viral adenoassociado (AAV).

112. Vetor, de acordo com a reivindicação 110, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o AAV compreende um genoma de fita simples (ssAAV) ou um genoma autocomplementar (scAAV).

113. Vetor, de acordo com a reivindicação 112, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor AAV é selecionado do grupo que consiste em 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, AAV 12, rh10 e híbridos dos mesmos.

114. Vetor viral **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um construto de ácido nucleico autocomplementar (ou de fita dupla) que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo AAT, em que o vetor não compreende um promotor que aciona a expressão do polipeptídeo AAT.

115. Vetor, de acordo com a reivindicação 114, sendo que o vetor é **CARACTERIZADO** pelo fato de que não compreende um braço de homologia.

116. Nanopartícula lipídica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o construto, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 91 a 109.

117. Célula hospedeira **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o construto, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 91 a 109.

118. Célula hospedeira **CARACTERIZADA** pelo fato de que é produzida pelo método, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores.

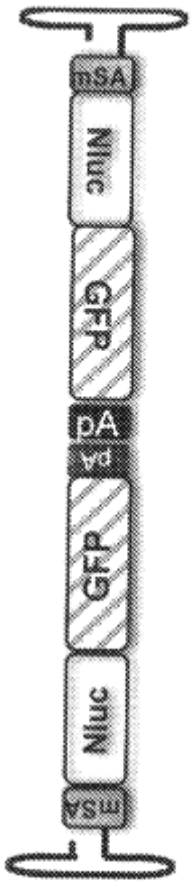
119. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 117, sendo que a célula hospedeira é **CARACTERIZADA** pelo fato de que é uma célula de fígado.

120. Célula hospedeira, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117 a 119, sendo que a célula hospedeira é **CARACTERIZADA** pelo fato de que é um tipo de célula sem divisão.

121. Célula hospedeira, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117 a 120, sendo que a célula hospedeira é **CARACTERIZADA** pelo fato de que expressa o polipeptídeo AAT codificado pelo construto bidirecional.

122. Célula hospedeira, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117 a 121, sendo que a célula hospedeira é **CARACTERIZADA** pelo fato de que é um hepatócito.

123. Método, construto ou célula hospedeira, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o gRNA compreende a SEQ ID NO: 901.



P00415 - Modelo de inserção

FIG. 1A

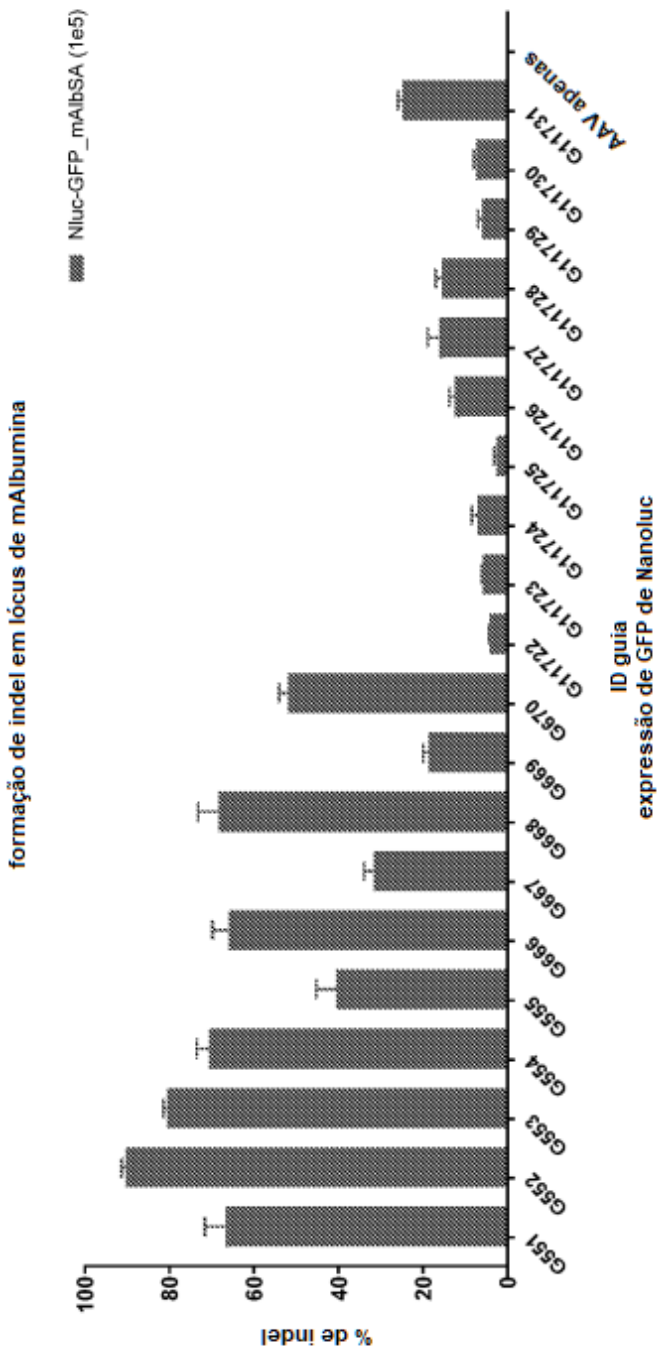

formação de indel em lócus de mAlbumina
Nluc-GFP_mAlbSA (1e5)
% de indel
0
20
40
60
80
100
G551
G562
G563
G564
G565
G566
G567
G568
G569
G570
G11722
G11723
G11724
G11725
G11726
G11727
G11728
G11729
G11730
G11731
AAV apenas
ID guia
expressão de GFP de Nanoluc

FIG. 1B

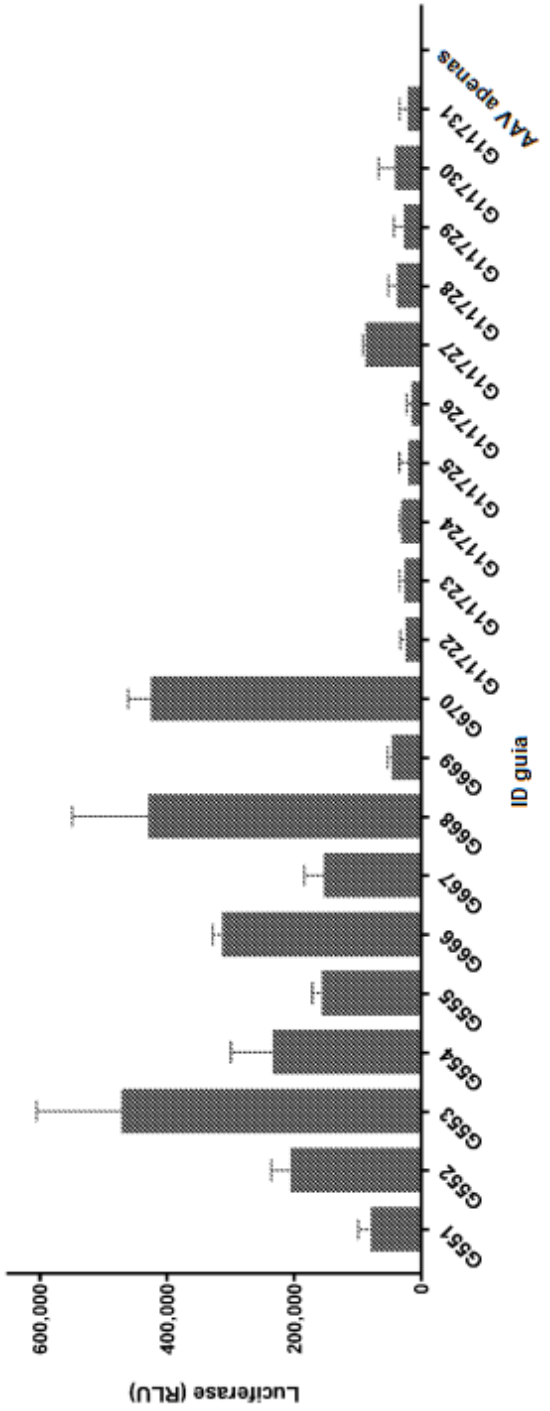

Nluc-GFP_mAlbSA
Luciferase (RLU)
0
200,000
400,000
600,000
G551
G562
G563
G564
G565
G566
G567
G568
G569
G570
G11722
G11723
G11724
G11725
G11726
G11727
G11728
G11729
G11730
G11731
AAV apenas
ID guia

FIG. 1C

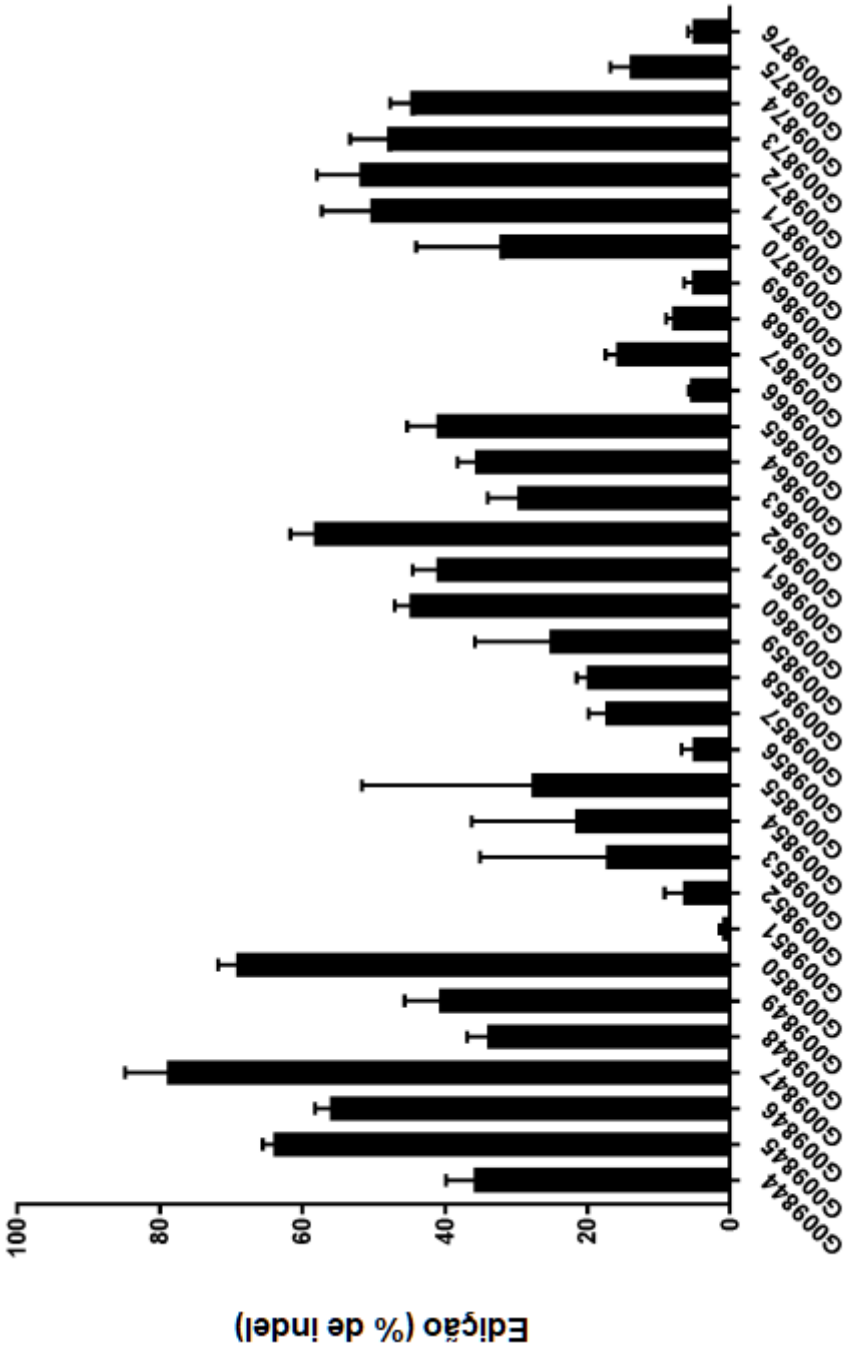

Edição (% de indel)
100
80
60
40
20
0
G0098844
G0098845
G0098846
G0098847
G0098848
G0098849
G0098850
G0098851
G0098852
G0098853
G0098854
G0098855
G0098856
G0098857
G0098858
G0098859
G0098860
G0098861
G0098862
G0098863
G0098864
G0098865
G0098866
G0098867
G0098868
G0098869
G0098870
G0098871
G0098872
G0098873
G0098874
G0098875
G0098876

Figura 2A

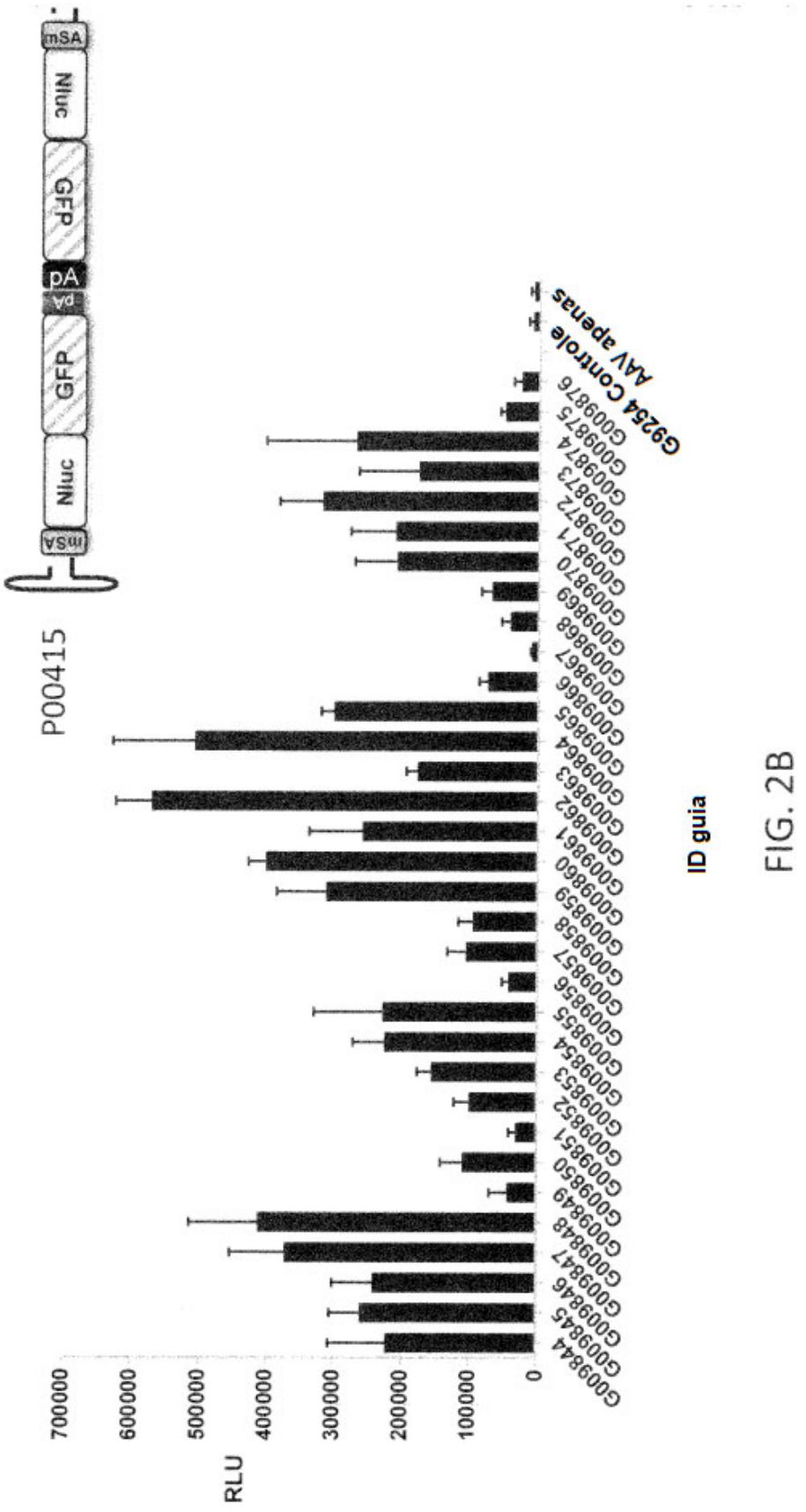

P00415
mSA
Nluc
GFP
pA
pA
GFP
Nluc
mSA
RLU
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
G092544
G092545
G092546
G092547
G092548
G092549
G092550
G092551
G092552
G092553
G092554
G092555
G092556
G092557
G092558
G092559
G092560
G092561
G092562
G092563
G092564
G092565
G092566
G092567
G092568
G092569
G092570
G092571
G092572
G092573
G092574
G092575
G092576
G9254 Controle
AAV apenas
ID guia

FIG. 2B

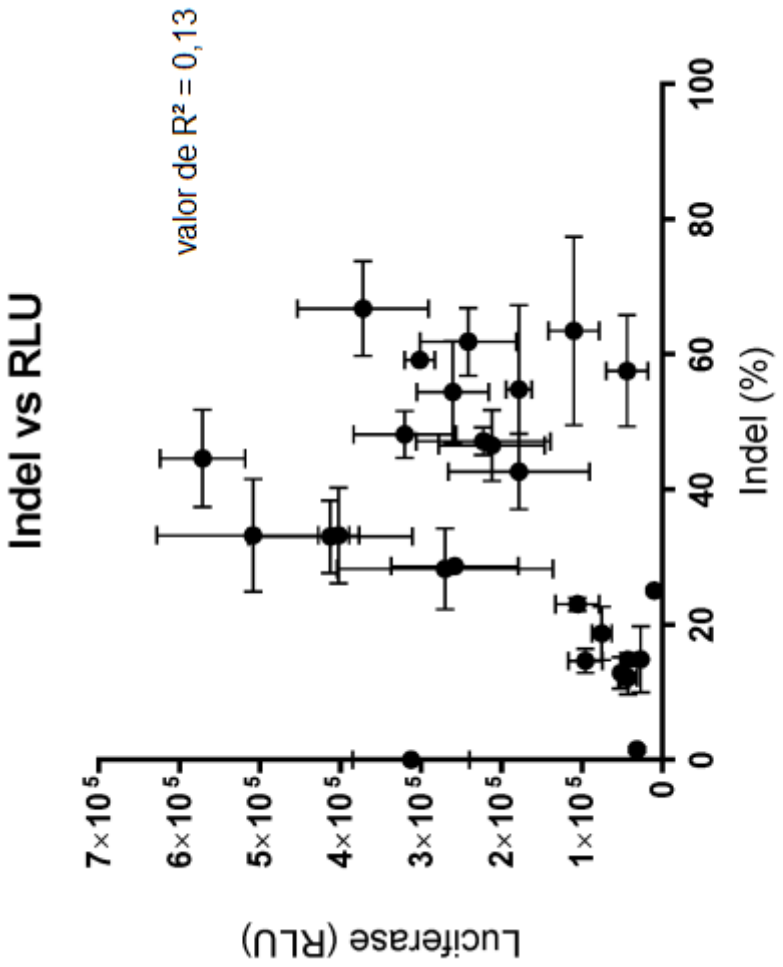

Indel vs RLU
valor de R² = 0,13
Luciferase (RLU)
7×10⁵
6×10⁵
5×10⁵
4×10⁵
3×10⁵
2×10⁵
1×10⁵
0
0
20
40
60
80
100
Indel (%)

FIG. 2C

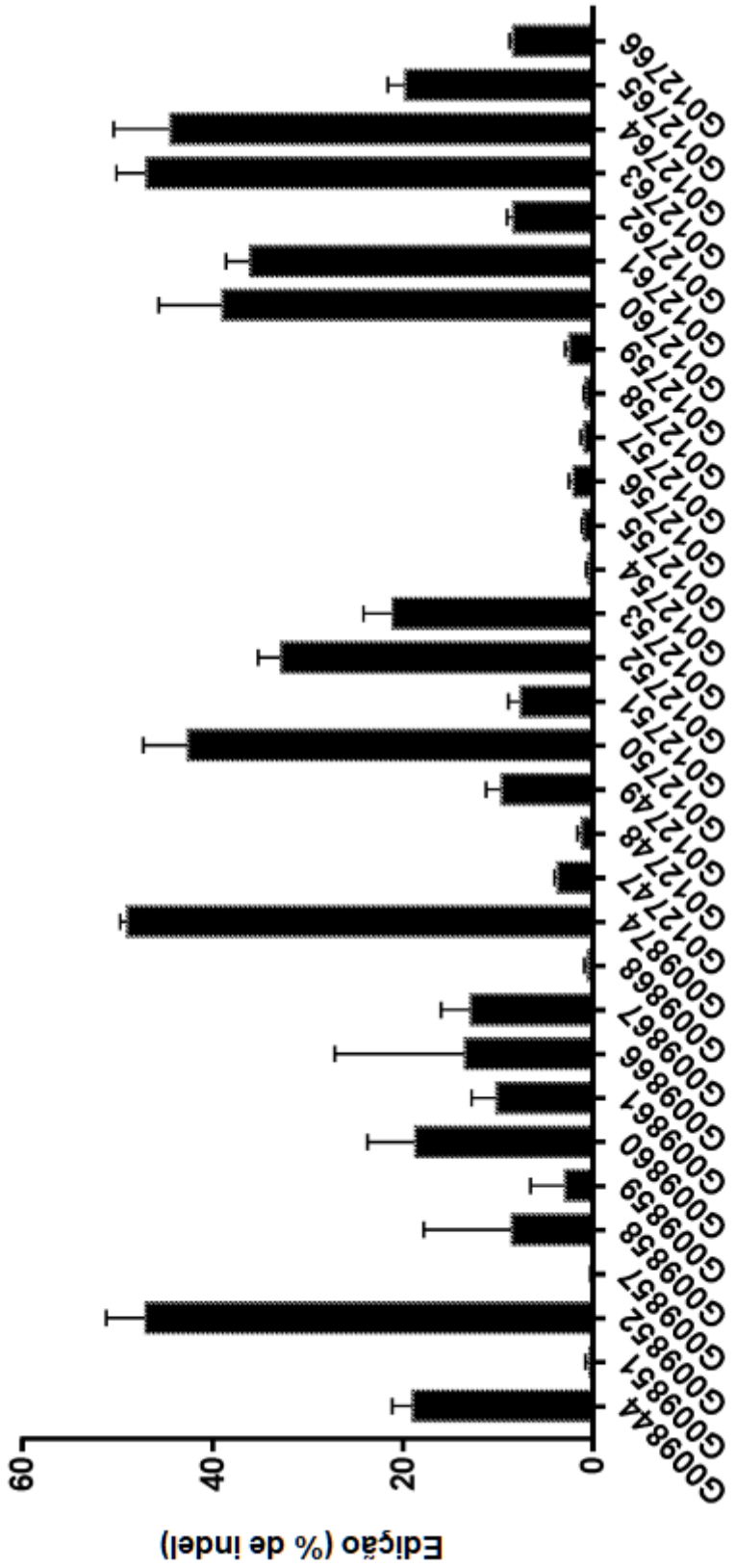

Edição (% de indel)
60
40
20
0
G009844
G009851
G009852
G009857
G009858
G009859
G009860
G009861
G009866
G009867
G009868
G012743
G012747
G012748
G012749
G012750
G012751
G012752
G012753
G012754
G012755
G012756
G012757
G012758
G012759
G012760
G012761
G012762
G012763
G012764
G012765
G012766

FIG. 3A

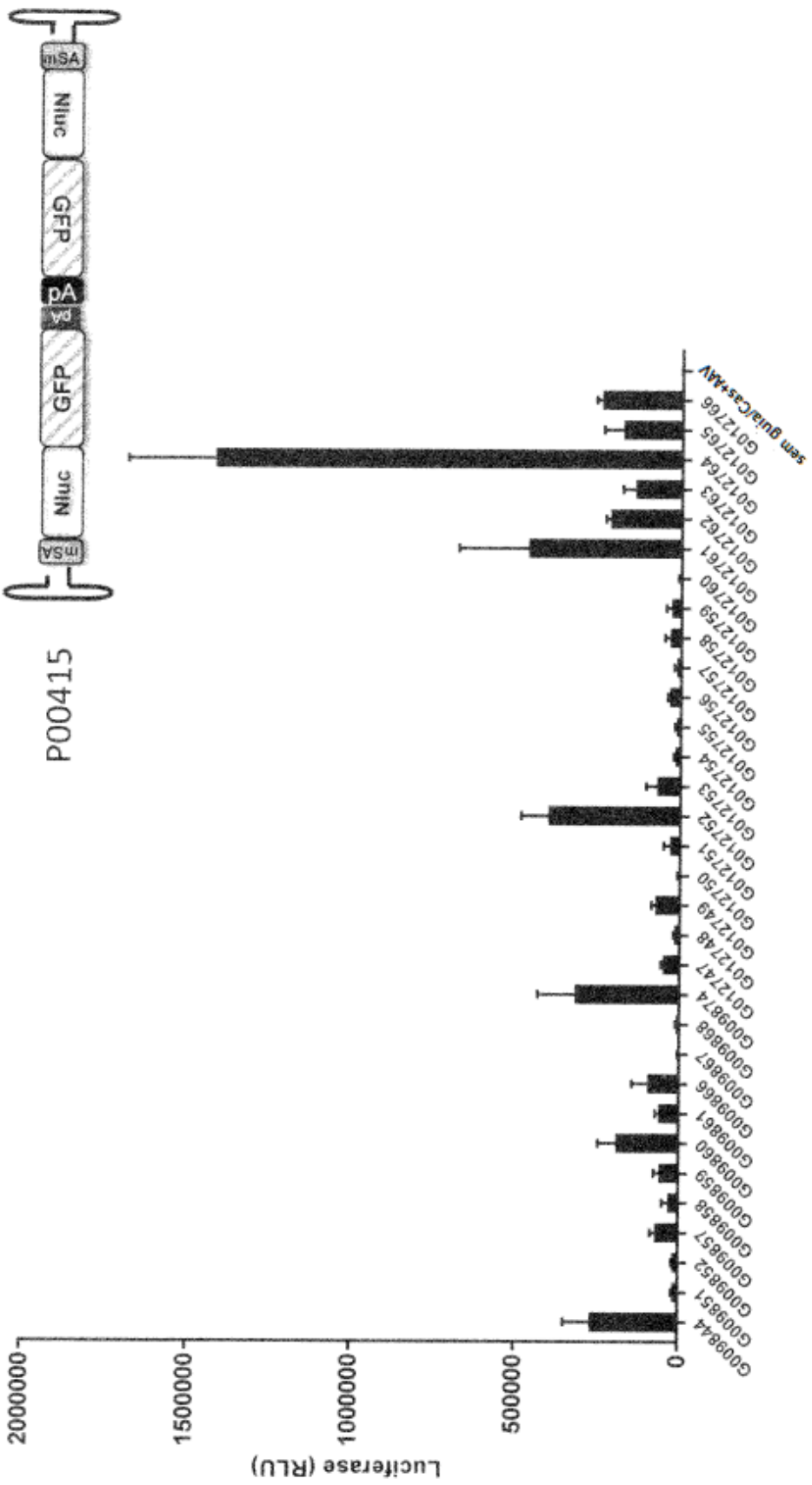

P00415
mSA
Nluc
GFP
pA
pA
GFP
Nluc
mSA
Luciferase (RLU)
2000000
1500000
1000000
500000
0
sem Guide/Cas+AAV
G012766
G012765
G012764
G012763
G012762
G012761
G012760
G012759
G012758
G012757
G012756
G012755
G012754
G012753
G012752
G012751
G012750
G012749
G012748
G012747
G009874
G009868
G009867
G009866
G009861
G009860
G009859
G009858
G009857
G009852
G009851
G009844

FIG. 3B

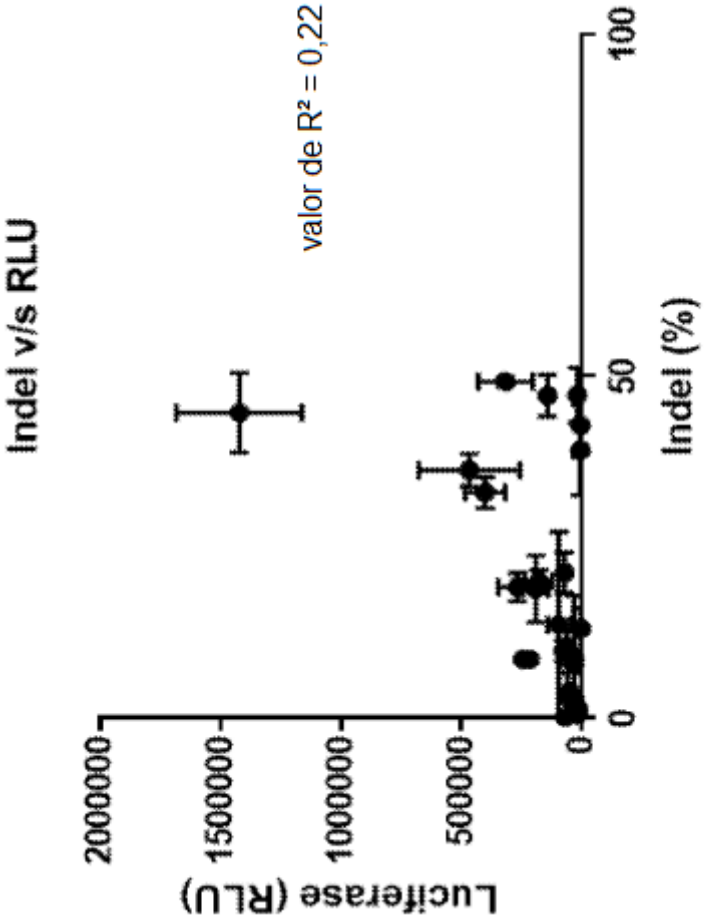

Indel v/s RLU
valor de R² = 0,22
Luciferase (RLU)
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
50
100
Indel (%)

FIG. 3C

FIG. 4A

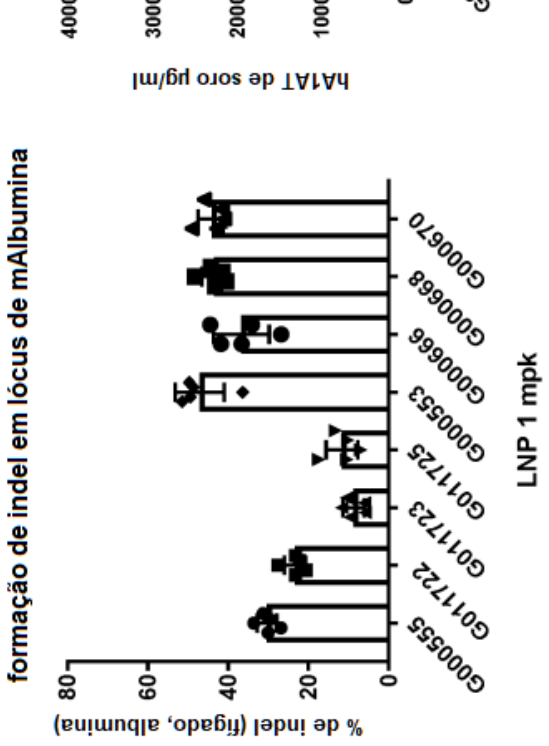
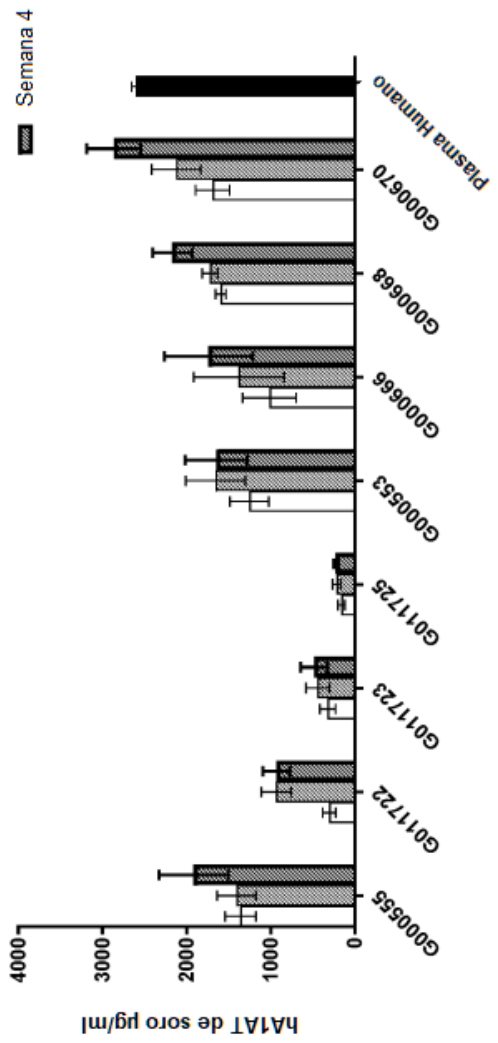

formação de indel em lócus de mAlbumina
% de indel (fígado, albumina)
0
20
40
60
80
G000555
G011722
G011723
G011725
G000553
G000666
G000668
G000670
LNP 1 mpk

FIG. 4B


Niveis de proteína hA1AT em soro
Semana 1
Semana 2
Semana 4
hA1AT de soro µg/ml
0
1000
2000
3000
4000
G000555
G011722
G011723
G011725
G000553
G000666
G000668
G000670
Plasma Humano

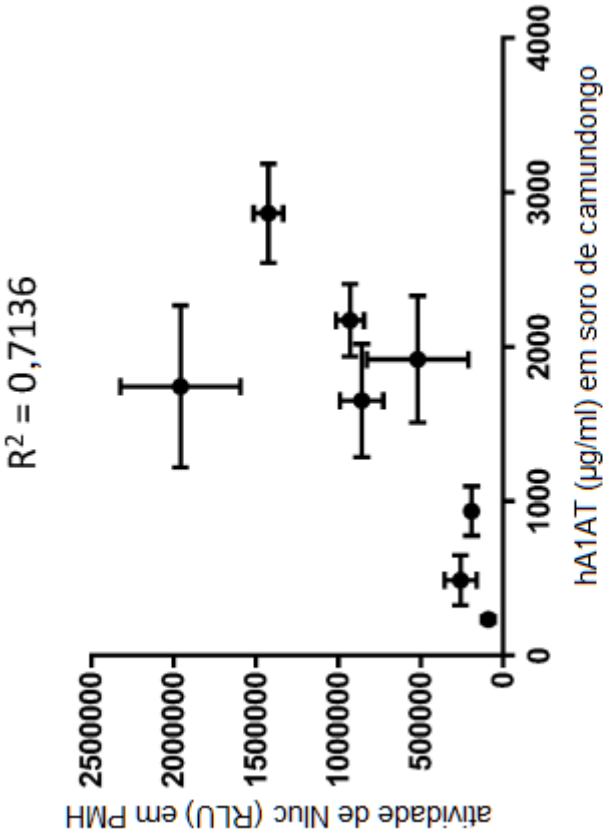

$R^2 = 0,7136$
atividade de Nluc (RLU) em PMH
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
1000
2000
3000
4000
hA1AT (µg/ml) em soro de camundongo

FIG. 4C

Petição 870210053659, de 15/06/2021, pág. 195/209

FIG. 5A

Grupo de tratamento	Antecedente	Estágio 1	Estágio 2
A	NGS-PiZ	Veículo	Veículo
B	NGS-PiZ	G000409	G000668 apenas
C	NGS-PiZ	G000409	G000668 + P00450
D	C57Bl/6	Veículo	G000668 + P00450

FIG. 5B

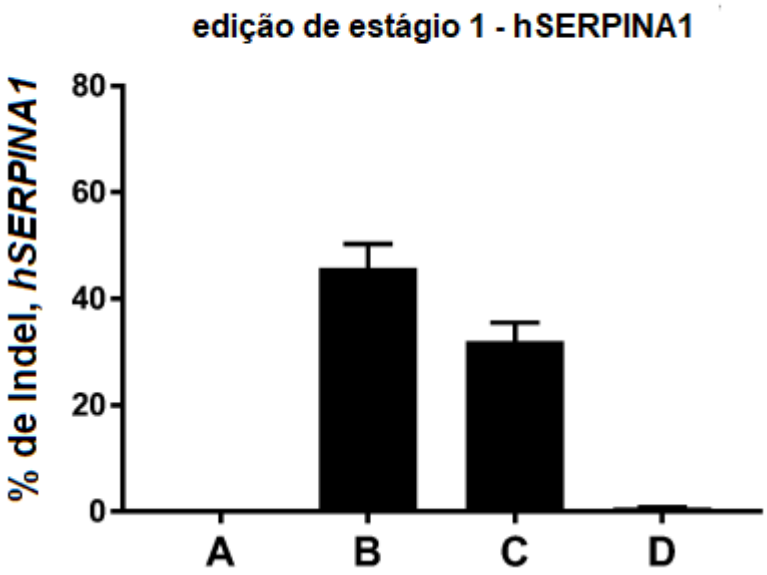


FIG. 5C

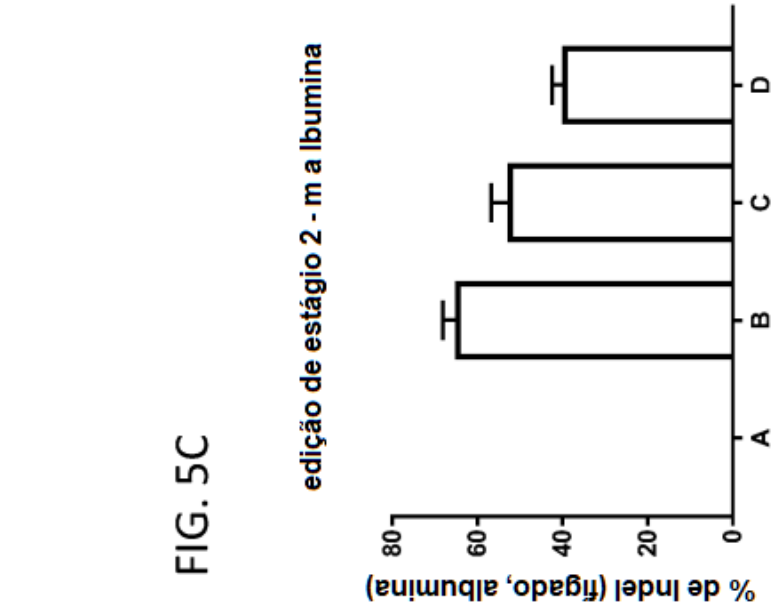
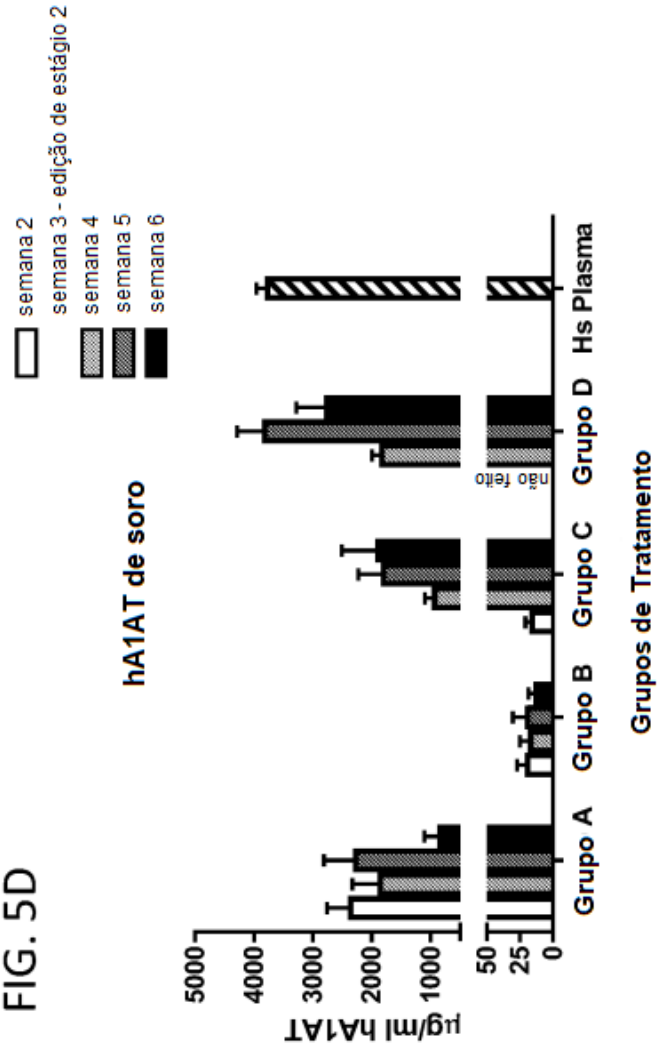

edição de estágio 2 - m a lbumina
% de Indel (fígado, albumina)
0
20
40
60
80
A
B
C
D

FIG. 5D


semana 2
semana 3 - edição de estágio 2
semana 4
semana 5
semana 6
hA1AT de soro
µg/ml hA1AT
5000
4000
3000
2000
1000
50
25
0
não feito
Grupo A
Grupo B
Grupo C
Grupo D
Hs Plasma
Grupos de Tratamento

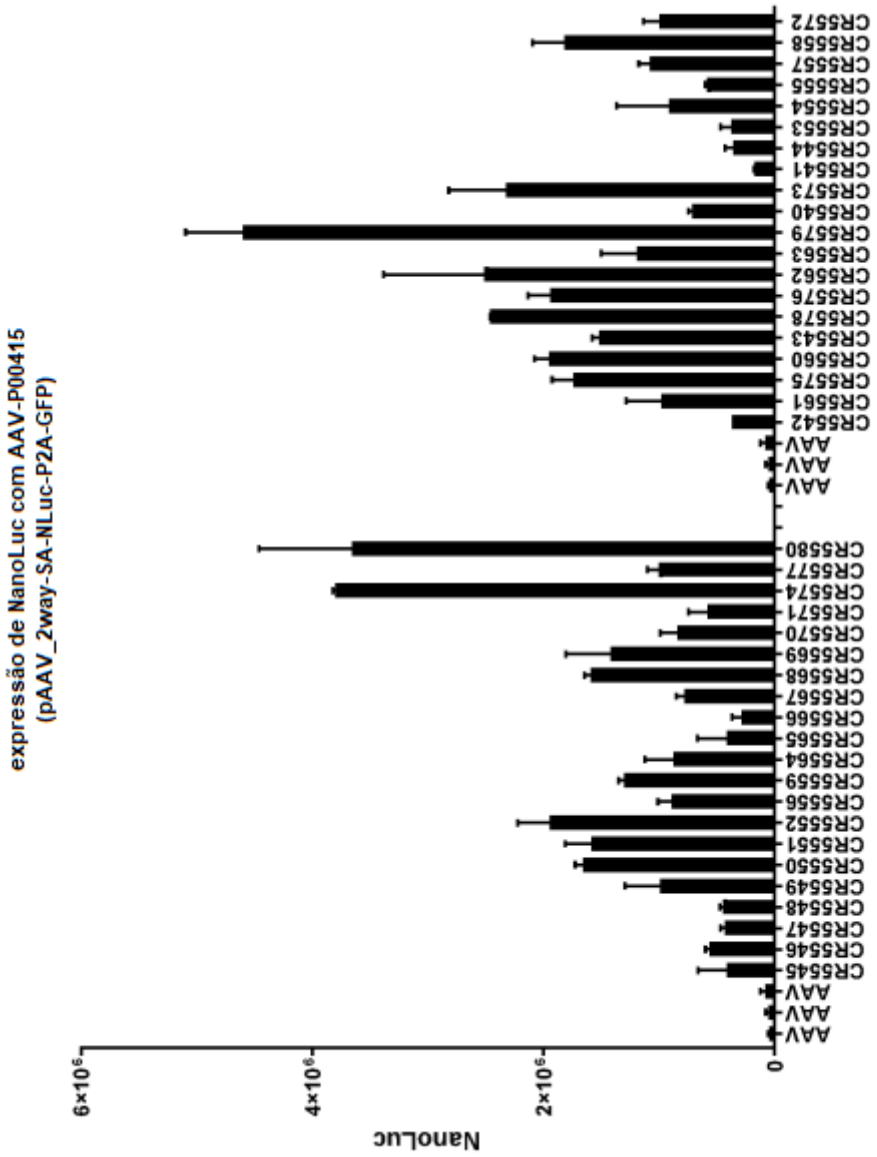

expressão de NanoLuc com AAV-P00415
(pAAV_2way-SA-NLuc-P2A-GFP)
NanoLuc
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
AAV
AAV
AAV
CR5545
CR5546
CR5547
CR5548
CR5549
CR5550
CR5551
CR5552
CR5556
CR5559
CR5564
CR5565
CR5566
CR5567
CR5568
CR5569
CR5570
CR5571
CR5574
CR5577
CR5580
AAV
AAV
AAV
CR5542
CR5561
CR5575
CR5560
CR5543
CR5578
CR5576
CR5562
CR5563
CR5579
CR5540
CR5573
CR5541
CR5544
CR5553
CR5554
CR5555
CR5557
CR5558
CR5572

FIG. 6

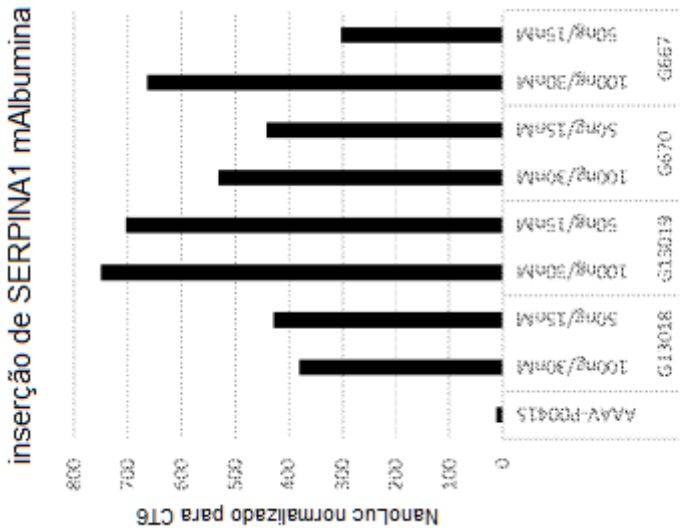

inserção de SERPINA1 mAlbumina
NanoLuc normalizado para CT6
800
700
600
500
400
300
200
100
0
AAAV-P00415
100ng/30nM
50ng/15nM
G13018
100ng/30nM
50ng/15nM
G13019
100ng/30nM
5ng/15nM
G6670
100ng/30nM
50ng/15nM
G6667

FIG. 7

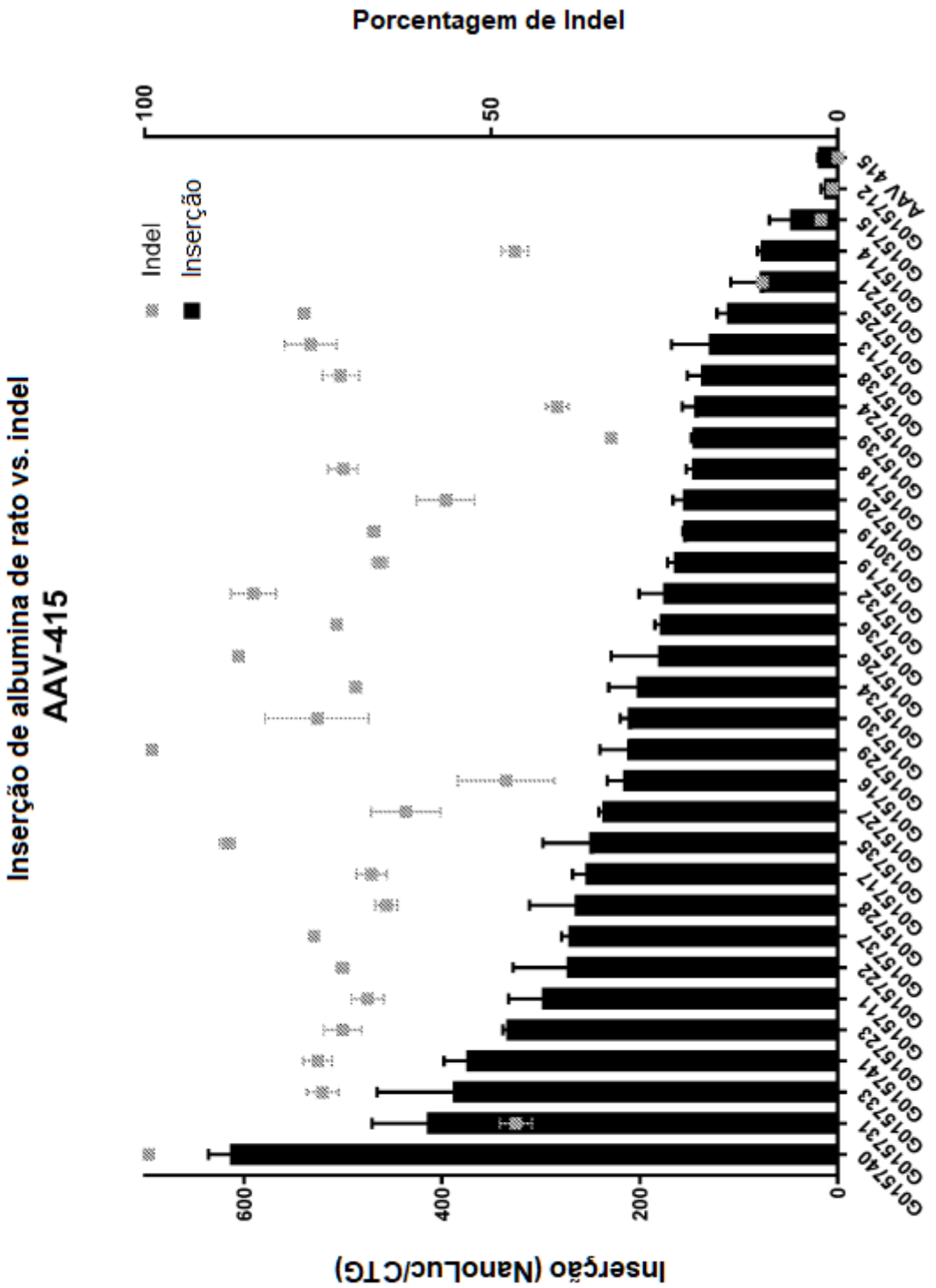

Inserção de albumina de rato vs. indel
AAV-415
Porcentagem de Indel
Indel
Inserção
100
50
0
600
400
200
0
Inserção (NanoLuc/CTG)
AAV 415
G015712
G015715
G015714
G015721
G015725
G015713
G015738
G015724
G015739
G015718
G015720
G015719
G013019
G015732
G015736
G015726
G015734
G015730
G015729
G015716
G015727
G015735
G015717
G015728
G015737
G015722
G015711
G015723
G015741
G015733
G015740

FIG. 8

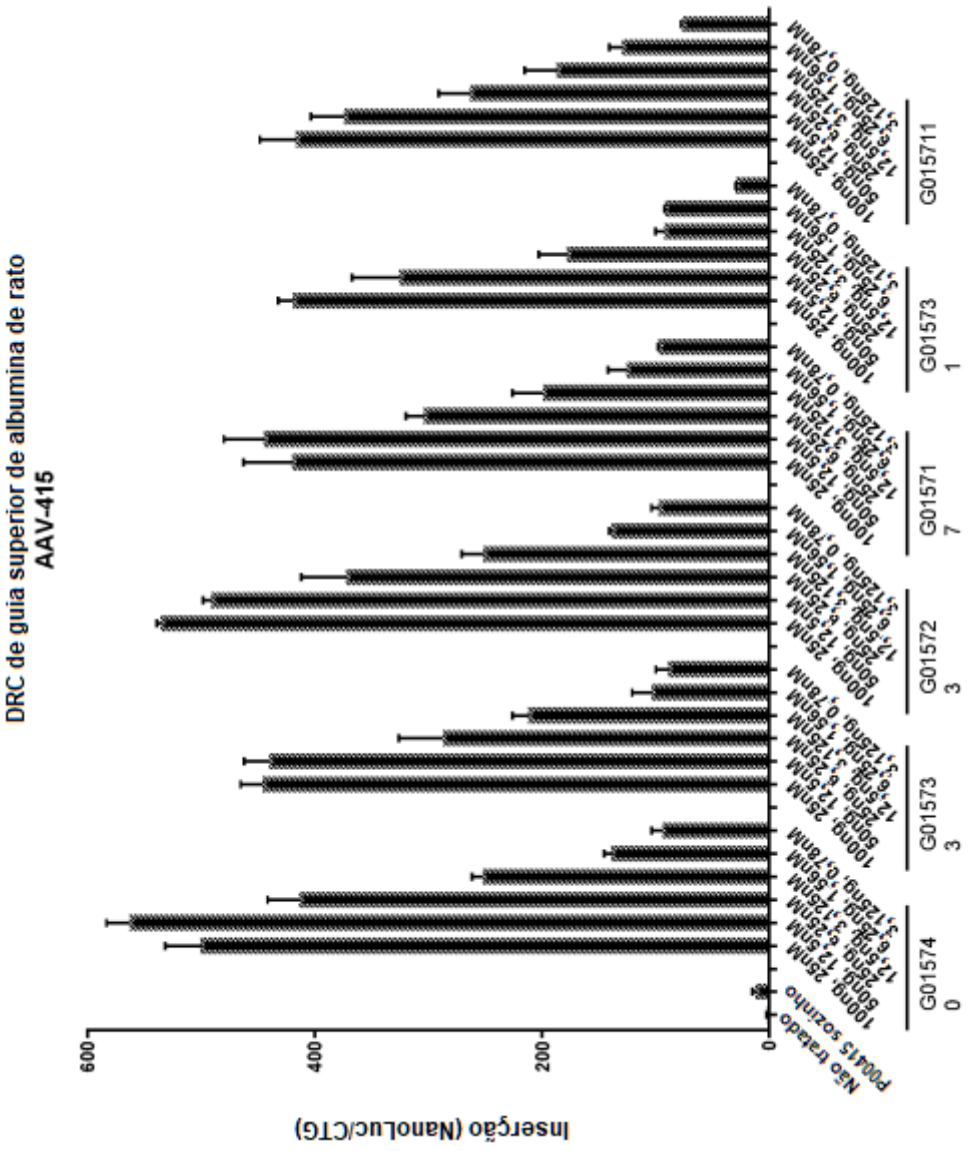

DRC de guia superior de albumina de rato
AAV-415
Inserção (NanoLuc/CTG)
600
400
200
0
Não tratado
P00415 sozinho
100ng, 25nM
50ng, 12,5nM
25ng, 6,25nM
12,5ng, 3,125nM
6,25ng, 1,56nM
3,125ng, 0,78nM
G01574 0
G01573 3
G01572 3
G01571 7
G01573 1
G015711

FIG. 9

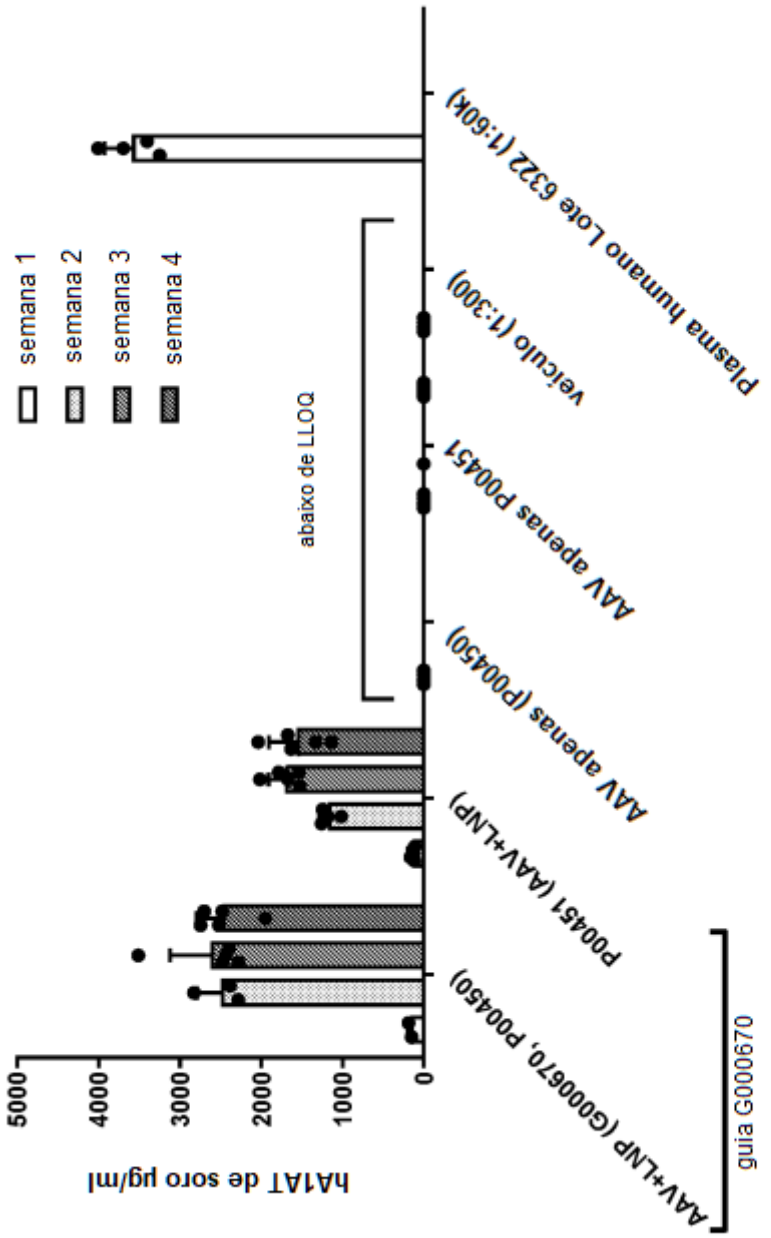

hA1AT de soro µg/ml
5000
4000
3000
2000
1000
0
semana 1
semana 2
semana 3
semana 4
abaixo de LLOQ
AAV+LNP (G000670, P00450)
P0451 (AAV+LNP)
AAV apenas (P00450)
AAV apenas P00451
veículo (1:300)
plasma humano Lote 6322 (1:60K)
guia G000670

FIG. 10

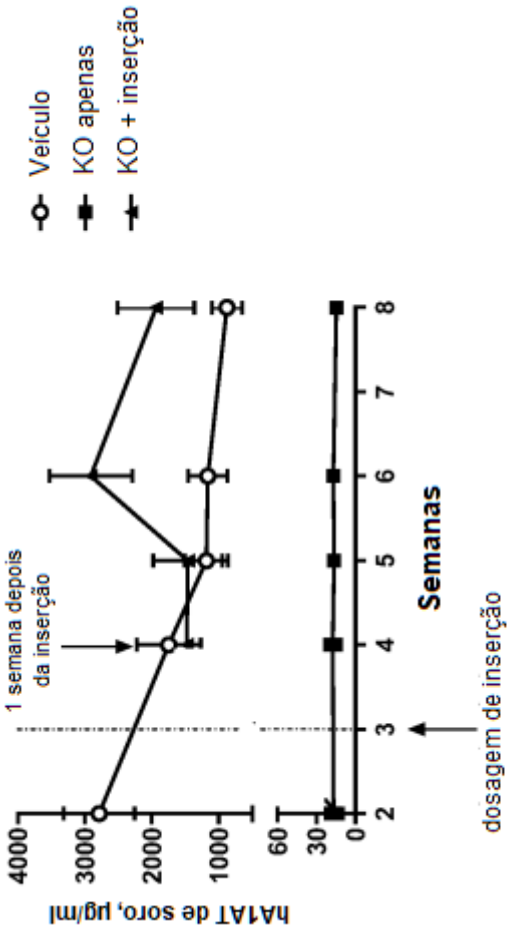

Veículo
KO apenas
KO + inserção
1 semana depois da inserção
hA1AT de soro, µg/ml
4000
3000
2000
1000
60
30
0
2
3
4
5
6
7
8
Semanas
dosagem de inserção

FIG. 11

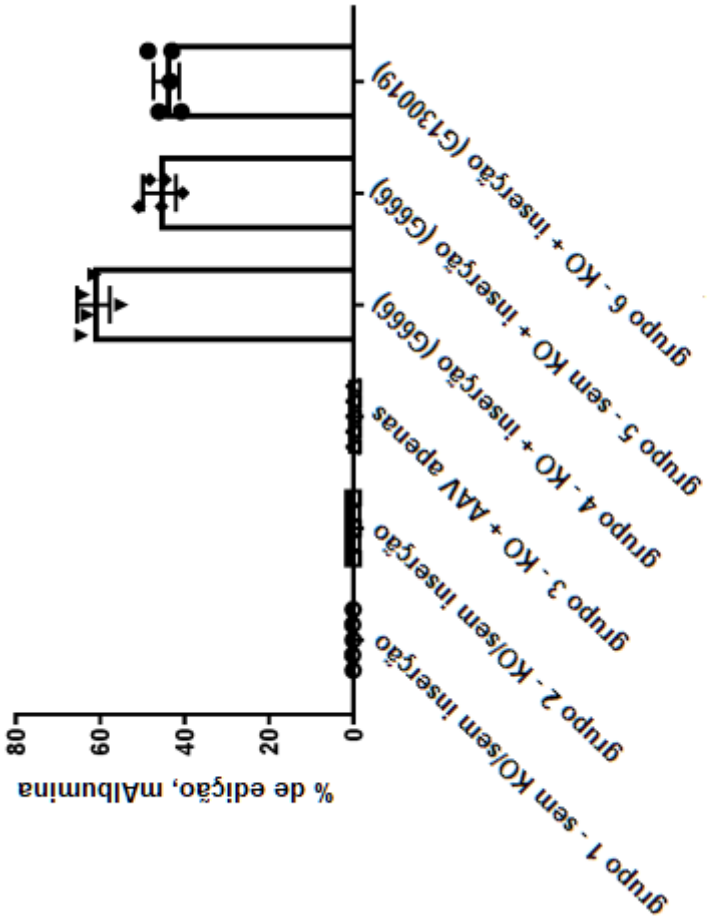

% de edição, mAlbumina
0
20
40
60
80
grupo 1 - sem KO/sem inserção
grupo 2 - KO/sem inserção
grupo 3 - KO + AAV apenas
grupo 4 - KO + inserção (G666)
grupo 5 - sem KO + inserção (G666)
grupo 6 - KO + inserção (G130019)

FIG. 12

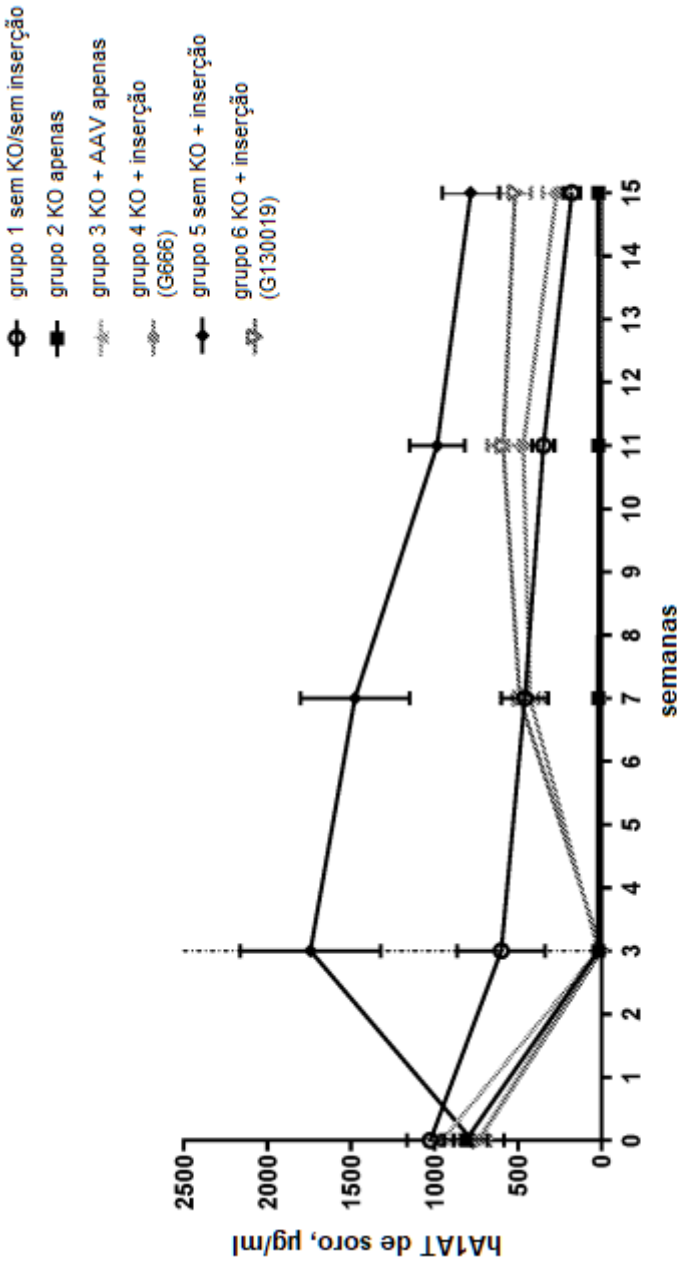

grupo 1 sem KO/sem inserção
grupo 2 KO apenas
grupo 3 KO + AAV apenas
grupo 4 KO + inserção (G666)
grupo 5 sem KO + inserção
grupo 6 KO + inserção (G130019)
hA1AT de soro, µg/ml
2500
2000
1500
1000
500
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
semanas

FIG. 13A

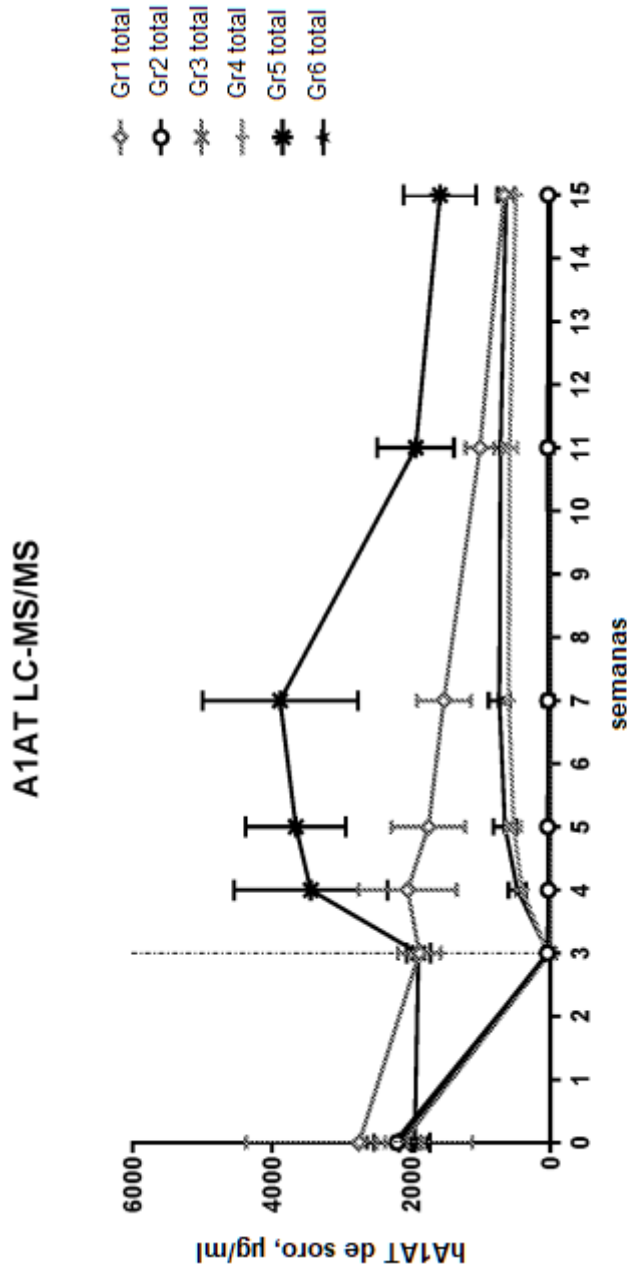

A1AT LC-MS/MS
Gr1 total
Gr2 total
Gr3 total
Gr4 total
Gr5 total
Gr6 total
hA1AT de soro, µg/ml
6000
4000
2000
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
semanas

FIG. 13B

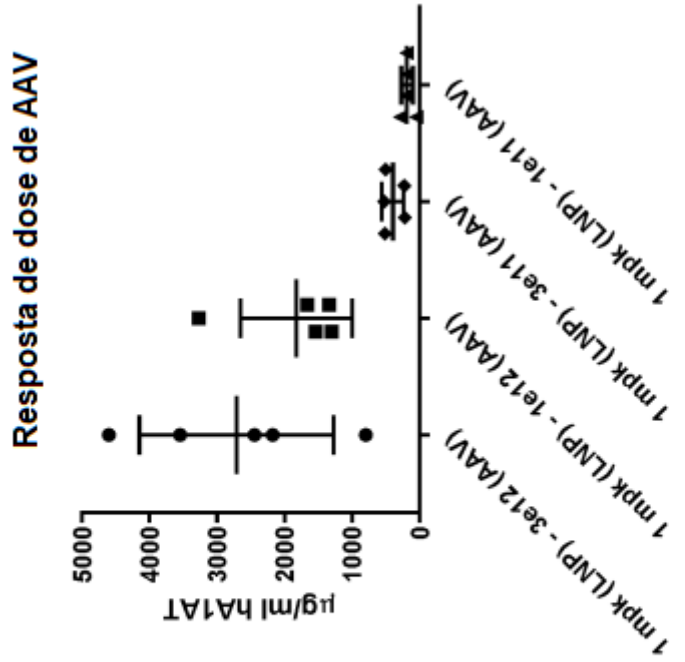


FIG. 14B

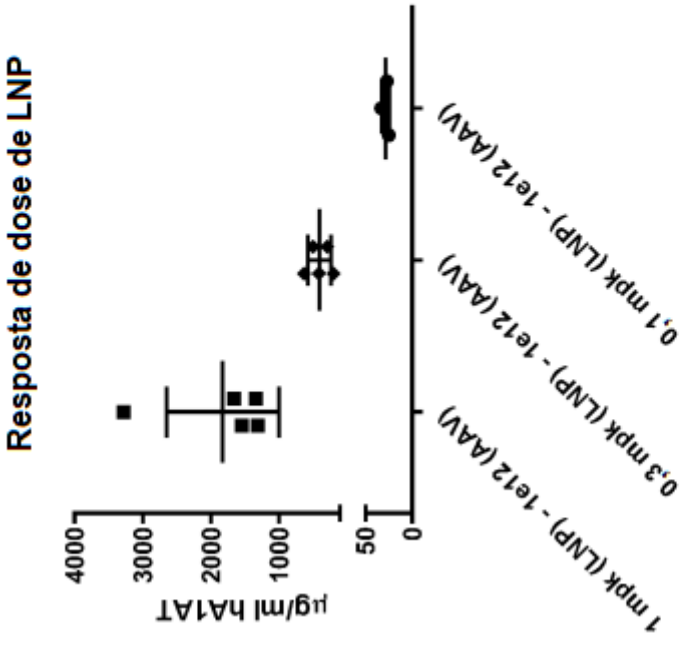


FIG. 14A

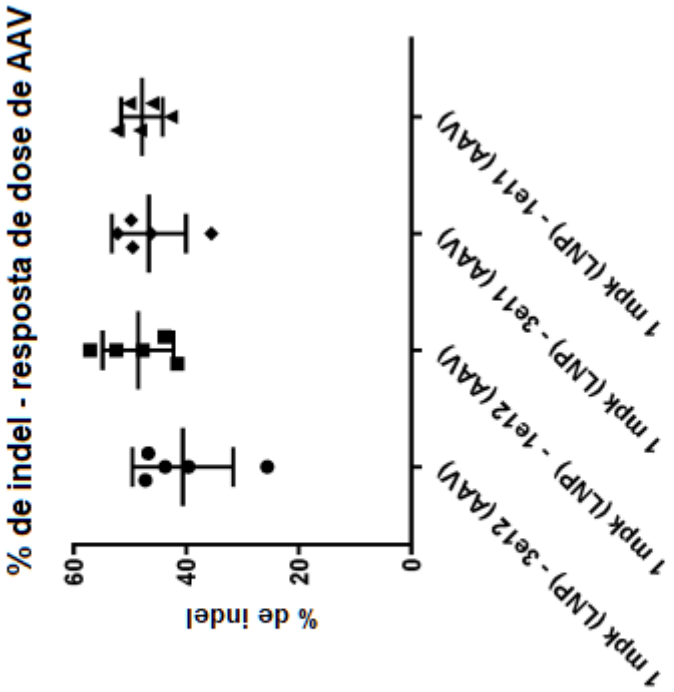


FIG. 14D

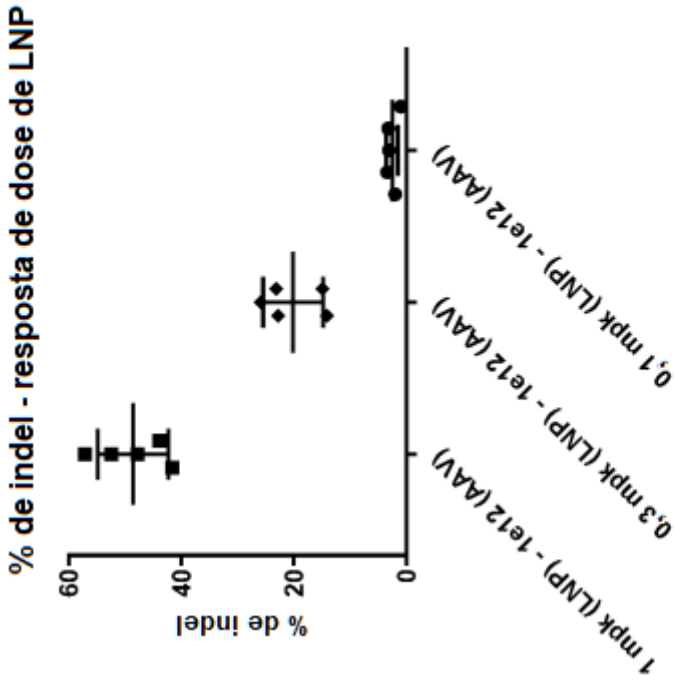


FIG. 14C

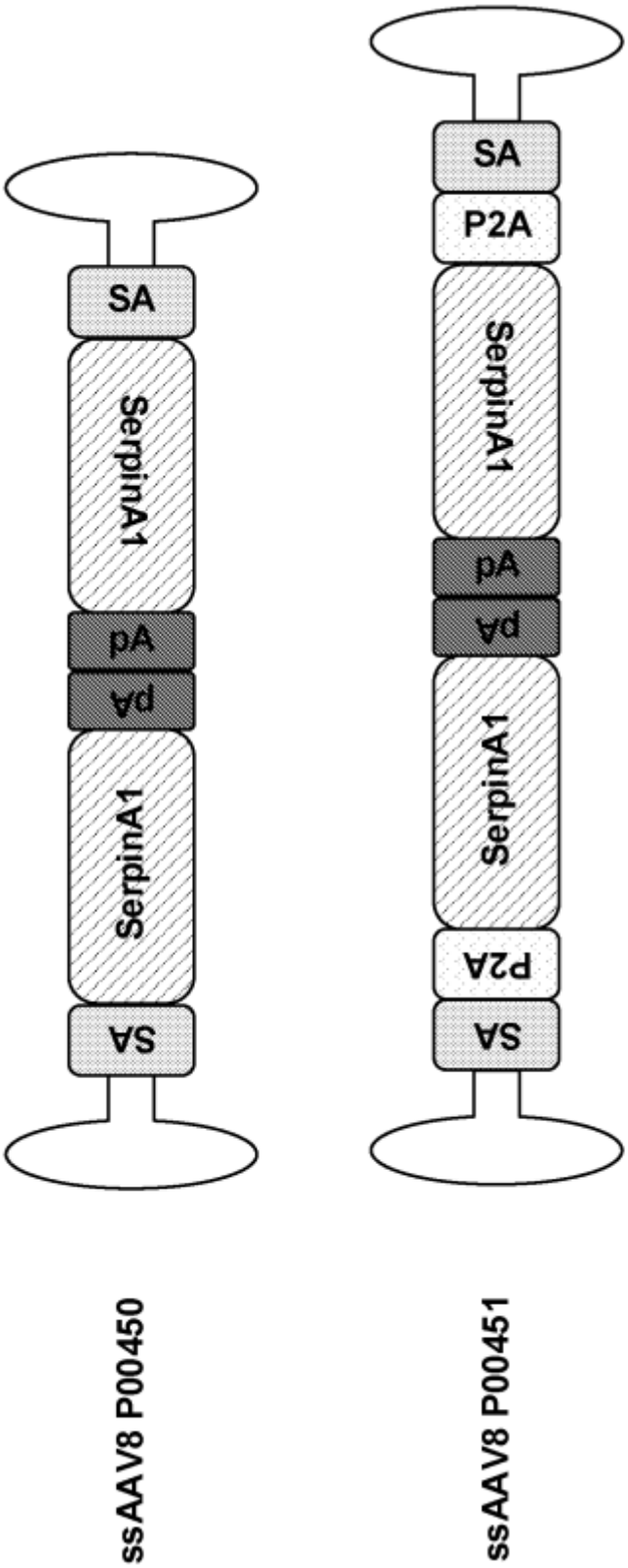

SA
SerpinA1
pA
pA
SerpinA1
SA
ssAAV8 P00450
SA
P2A
SerpinA1
pA
pA
SerpinA1
P2A
SA
ssAAV8 P00451

FIG. 15

RESUMO

“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR DEFICIÊNCIA DE ALFA-1 ANTITRIPSINA”

Trata-se de composições e métodos para expressar alfa-1 antitripsina (AAT) em uma célula hospedeira. Também são fornecidos composições e métodos para tratar indivíduos que têm deficiência de alfa-1 antitripsina (AATD).

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem_sequencia.txt
- Data de Geração do Código: 15/06/2021
- Hora de Geração do Código: 15:39:10
- Código de Controle:
    - Campo 1: F2ED44AE9240F90D
    - Campo 2: 9AB890984273D07A