



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122019025681-0 B1

(22) Data do Depósito: 01/11/2013

(45) Data de Concessão: 18/04/2023

(54) Título: MÉTODO PARA INSERIR UMA SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO EM UMA LOCALIZAÇÃO SEGURA DE UM GENOMA DE UMA CÉLULA

(51) Int.Cl.: C12N 15/31; C12N 5/10; C12N 9/22; C12Q 1/68; C12N 15/63; (...).

(30) Prioridade Unionista: 01/11/2012 US 61/721,302; 03/07/2013 US 61/842,874; 14/03/2013 US 61/785,404.

(73) Titular(es): FACTOR BIOSCIENCE INC..

(72) Inventor(es): MATTHEW ANGEL; CHRISTOPHER ROHDE.

(86) Pedido PCT: PCT US2013068118 de 01/11/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/071219 de 08/05/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/12/2019

(62) Pedido Original do Dividido: BR112015009804-5 - 01/11/2013

(57) Resumo: A presente invenção refere-se, em parte, a ácidos nucleicos que codificam proteínas, produtos terapêuticos compreendendo ácidos nucleicos que codificam proteínas, métodos para induzir as células a expressarem proteínas usando ácidos nucleicos, kits e dispositivos para transfecção, edição gênica e reprogramação de células, e células, organismos e produtos terapêuticos produzidos usando esses métodos, kits e dispositivos. São descritos métodos e produtos para alterar a sequência de DNA de uma célula, assim como os métodos e produtos para induzir as células a expressarem proteínas usando moléculas de RNA sintéticas. Também são descritos produtos terapêuticos compreendendo ácidos nucleicos que codificam proteínas de edição gênica.

**MÉTODO PARA INSERIR UMA SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO EM UMA
LOCALIZAÇÃO SEGURA DE UM GENOMA DE UMA CÉLULA**

(Dividido do BR 1120150098045, depositado em 01/11/2013)

PRIORIDADE

[001]O presente pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório U.S. Nº. 61/721.302, depositado em 1 de novembro de 2012, Pedido Provisório U.S. Nº. 61/785.404, depositado em 14 de março de 2013, e Pedido Provisório U.S. Nº. 61/842.874, depositado em 3 de julho de 2013, cujos conteúdos estão incorporados neste documento em sua totalidade por referência. O presente pedido está relacionado ao Pedido U.S. Nº. 13/465.490, depositado em 7 de maio de 2012, Pedido Internacional Nº. PCT/US2012/067966, depositado em 5 de dezembro de 2012, e Pedido U.S. Nº. 13/931.251, depositado em 28 de junho de 2013, cujos conteúdos estão incorporados neste documento em sua totalidade por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002]A presente invenção refere-se, em parte, a ácidos nucleicos que codificam proteínas, produtos terapêuticos compreendendo ácidos nucleicos que codificam proteínas, métodos para induzir as células a expressarem proteínas usando ácidos nucleicos, kits e dispositivos para transfecção, edição gênica e reprogramação de células, e células, organismos e produtos terapêuticos produzidos usando esses métodos, kits e dispositivos.

DESCRIÇÃO DO ARQUIVO DE TEXTO ENVIADO ELETRONICAMENTE

[003]Os conteúdos do arquivo de texto enviado eletronicamente com este estão incorporados neste documento em sua totalidade por referência: Uma cópia do formato

legível em computador da Listagem de Sequência (nome do arquivo: FABI_005_02W0_SeqList_ST25.txt; data registrada: 30 de outubro de 2013; tamanho do arquivo: 255 KB).

FUNDAMENTOS

RNA Sintético e Terapêuticos de RNA

[004]O ácido ribonucleico (RNA) é ubíquo nas células procarióticas e eucarióticas, onde ele codifica as informações genéticas na forma de RNA mensageiro, liga e transporta aminoácidos na forma de RNA transportador, monta aminoácidos em proteínas na forma de RNA ribossômico e realiza inúmeras outras funções incluindo a regulação da expressão gênica nas formas de microRNA e RNA longo não codificante. O RNA pode ser produzido sinteticamente por métodos, incluindo síntese química direta e transcrição *in vitro*, e pode ser administrado a pacientes para uso terapêutico.

Reprogramação Celular e Terapias à Base de Células

[005]As células podem ser reprogramadas, expondo-as a sinais extracelulares específicos e/ou pela expressão ectópica de proteínas específicas, microRNAs, etc. Embora vários métodos de reprogramação tenham sido anteriormente descritos, a maior parte que aborta a expressão ectópica requer a introdução de DNA exógeno, o que pode gerar riscos de mutação. Métodos de reprogramação sem DNA baseados na distribuição direta das proteínas de reprogramação foram relatados. No entanto, esses métodos são muito ineficientes e não confiáveis para uso comercial. Além disso, os métodos de reprogramação à base de RNA foram descritos (Ver, por exemplo, Angel. MIT Thesis. 2008. 1-56; Angel *et al.* PLoS ONE. 2010. 5,107; Warren *et al.* Cell Stem Cell. 2010.

7,618-630; Angel. MIT Thesis. 2011. 1-89; e Lee *et al.* Cell. 2012. 151,547-558; cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência). No entanto, os métodos de reprogramação à base de RNA existentes são lentos, não confiáveis e ineficientes quando realizados em células adultas, requerem muitas transfecções (resultando em custo significativo e chance de erro), podem reprogramar apenas um número limitado de tipos celulares, podem reprogramar células para apenas um número limitado de tipos celulares, requerem o uso de imunossuppressores, e requerem o uso de vários componentes derivados de humanos, incluindo HSA derivados de sangue e alimentadores de fibroblasto humano. As diversas desvantagens dos métodos de reprogramação à base de RNA divulgados anteriormente os tornam indesejáveis para a pesquisa e para o uso terapêutico.

Edição Gênica

[006]Várias proteínas de ocorrência natural contêm domínios de ligação de DNA que podem reconhecer sequências de DNA específicas, por exemplo, dedos de zinco (ZFs) e efetores semelhantes a ativador de transcrição (TALEs). Proteínas de fusão contendo um ou mais desses domínios de ligação de DNA e o domínio de clivagem da FokI endonuclease podem ser usadas para criar uma ruptura de fita dupla numa região desejada do DNA numa célula (*ver, por exemplo*, Publicação de Pedido de Patente US Nº. US 2012/0064620, Publicação de Pedido de Patente US Nº. US 2011/0239315, Patente US Nº. 8.470.973, Publicação de Pedido de Patente US Nº. US 2013/0217119, Patente US Nº. 8.420.782, Publicação de Pedido de Patente US Nº. US 2011/0301073, Publicação de Pedido de Patente US Nº. US 2011/0145940,

Patente US N°. 8.450.471, Patente US N°. 8.440.431, Patente US N°. 8.440.432, e Publicação de Pedido de Patente US N°. 2013/0122581, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência). No entanto, os métodos atuais para a edição gênica de células são ineficientes e geram um risco de mutagênese descontrolada, tornando-os indesejáveis para a pesquisa e para o uso terapêutico. Os métodos para a edição gênica sem DNA de células somáticas não foram anteriormente explorados, assim como também não foram os métodos para edição gênica simultânea ou sequencial e reprogramação de células somáticas. Além disso, os métodos para a edição gênica direta de células em pacientes (*isto é, in vivo*) não foram explorados anteriormente, e o desenvolvimento desses métodos tem sido limitado pela falta de alvos aceitáveis, distribuição ineficiente, expressão ineficiente da proteína/proteínas de edição gênica, edição gênica ineficiente pela proteína/proteínas de edição gênica expressas, devido, em parte, à fraca ligação dos domínios de ligação de DNA, excessivos efeitos inespecíficos, devido, em parte, à dimerização não direcionada do domínio de clivagem da FokI e à fraca especificidade dos domínios de ligação de DNA, e outros fatores. Finalmente, o uso da edição gênica em tratamentos antibacterianos, antivirais e anticâncer não foi anteriormente explorado.

[007] Nesse sentido, ainda há uma necessidade de composições e métodos melhorados para a expressão de proteínas nas células.

RESUMO DA INVENÇÃO

[008] A presente invenção fornece, em parte, composições, métodos, artigos e dispositivos para induzir

as células a expressarem proteínas, métodos, artigos e dispositivos para produzir essas composições, métodos, artigos e dispositivos, e composições e artigos, incluindo células, organismos e terapêuticos produzidos usando essas composições, métodos, artigos e dispositivos. Ao contrário dos métodos anteriormente relatados, determinadas modalidades da presente invenção não envolvem a exposição das células ao DNA exógeno ou a materiais alogênicos ou derivados de animais, tornando os produtos produzidos de acordo com os métodos da presente invenção úteis para aplicações terapêuticas.

[009]Em alguns aspectos, são fornecidas moléculas de RNA sinéticas com baixa toxicidade e alta eficiência de tradução. Em um aspecto, é fornecido um meio de cultura celular para transfecção de alta eficiência, reprogramação e edição gênica de células. Outros aspectos pertencem a métodos para produzir moléculas de RNA sintéticas que codificam proteínas de reprogramação. Outros aspectos pertencem ainda a métodos para produzir moléculas de RNA sintéticas que codificam proteínas de edição gênica.

[010]Em um aspecto, a invenção fornece proteínas de edição gênica de alta eficiência que compreendem domínios de clivagem de nuclease projetados. Em outro aspecto, a invenção fornece proteínas gene-edição de alta-fidelidade compreendendo engenharia nuclease clivagem domínios. Outros aspectos referem-se a proteínas de edição gênica de alta eficiência que compreendem domínios de ligação de DNA projetados. Outros aspectos pertencem ainda a proteínas de edição gênica de alta fidelidade que compreendem domínios de ligação de DNA projetados. Outros aspectos referem-se

ainda a proteínas de edição gênica que compreendem sequências de repetição projetadas. Alguns aspectos se referem a métodos para alterar a sequência de DNA de uma célula, transfectando a célula com ou induzindo a células a expressar uma proteína de edição gênica. Outros aspectos referem-se a métodos para alterar a sequência de DNA de uma célula que esteja presente numa cultura *in vitro*. Outros aspectos referem-se ainda a métodos para alterar a sequência de DNA de uma célula que esteja presente *in vivo*.

[011] Em alguns aspectos, a invenção fornece métodos para tratar o câncer compreendendo a administração a um paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma proteína de edição gênica ou de um ácido nucleico que codifica uma proteína de edição gênica. Em um aspecto, a proteína de edição gênica é capaz de alterar a sequência de DNA de um gene associado ao câncer. Em outro aspecto, o gene associado ao câncer é o gene BIRC5. Outros aspectos referem-se ainda a terapêuticos que compreendem ácidos nucleicos e/ou células e métodos de uso de terapêuticos que compreendem ácidos nucleicos e/ou células para o tratamento de, por exemplo, diabetes tipo 1, doença cardíaca, incluindo cardiomiopatia isquêmica e dilatada, degeneração macular, doença de Parkinson, fibrose cística, anemia falciforme, talassemia, anemia de Fanconi, imunodeficiência combinada grave, neuropatia sensorial hereditária, xeroderma pigmentoso, doença de Huntington, distrofia muscular, esclerose lateral amiotrófica, mal de Alzheimer, câncer, e doenças infecciosas incluindo hepatite e HIV/AIDS. Em alguns aspectos, os ácidos nucleicos compreendem o RNA sintético. Em outros aspectos, os ácidos nucleicos são

distribuídos às células usando um vírus. Em alguns aspectos, o vírus é um vírus de replicação competente. Em outros aspectos, o vírus é um vírus de replicação incompetente.

[012] Os detalhes da invenção estão estabelecidos na descrição acompanhante abaixo. Embora os métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos neste documento possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais ilustrativos são agora descritos. Outros recursos, objetos e vantagens da invenção estarão evidentes a partir da descrição e das reivindicações. Na especificação e nas reivindicações anexas, as formas singulares também incluem o plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente compreendido por um indivíduo versado na técnica à qual pertence esta invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

[013] A **FIG. 1A** retrata o RNA codificando as proteínas indicadas e contendo adenosina, 50% de guanosina, 50% de 7-deazaguanosina, 70% de uridina, 30% de 5-metiluridina, e 5-metilcitidina, dissolvidas em um gel desnaturante de formaldeído-agarose.

[014] A **FIG. 1B** retrata o RNA codificando as proteínas indicadas e contendo adenosina, 50% de guanosina, 50% de 7-deazaguanosina, 50% de uridina, 50% de 5-metiluridina, e 5-metilcitidina, dissolvidas em um gel desnaturante de formaldeído-agarose.

[015] A **FIG. 2** retrata fibroblastos neonatais primários humanos reprogramados por cinco transfecções com RNA

codificando proteínas de reprogramação. As células foram fixadas e coradas para a proteína Oct4. Os núcleos foram contracorados com Hoechst 33342.

[016]A **FIG. 3A** retrata fibroblastos adultos primários humanos.

[017]A **FIG. 3B** retrata fibroblastos adultos primários humanos mostrados na **FIG. 3A**, reprogramados por sete transfecções com RNA codificando proteínas de reprogramação. As setas indicam as colônias de células reprogramadas.

[018]A **FIG. 3C** retrata uma grande colônia de fibroblastos adultos primários humanos reprogramados.

[019]A **FIG. 4A** retrata a localização de um par de TALEN se direcionando ao gene de CCR5 humano. As linhas únicas indicam os sítios de ligação de TALEN. As linhas duplas indicam a localização da mutação $\Delta 32$.

[020]A **FIG. 4B** retrata o RNA sintético que codifica o par de TALEN da **FIG. 4A**, dissolvido em um gel desnaturante de formaldeído-agarose.

[021]A **FIG. 4C** retrata os resultados de um ensaio de avaliação testando a funcionalidade do RNA da **FIG. 4B** em fibroblastos dérmicos humanos (GM00609). O aparecimento das bandas de 760bp e 200bp na amostra gerada a partir das células transfectadas com RNA indica a edição bem sucedida do gene. O percentual abaixo de cada faixa indica a eficiência da edição do gene (porcentagem de alelos editados).

[022]A **FIG. 4D** retrata um gráfico do perfil de linhas das faixas "Neg" e "TALENs" da **FIG. 4C**. Os números indicam a intensidade integrada das três bandas em relação à intensidade integrada total.

[023]A **FIG. 4E** retrata os resultados de um ensaio de avaliação realizado conforme na **FIG. 4C**, e incluindo também uma amostra gerada a partir das células que foram transfectadas duas vezes com o RNA (a faixa marcada "2x").

[024]A **FIG. 4F** retrata a edição gênica e a reprogramação simultâneas de células primárias humanas (GM00609) usando RNA sintético. As imagens mostram colônias representativas das células reprogramadas.

[025]A **FIG. 4G** retrata os resultados do sequenciamento direto do gene de CCR5 nas células reprogramadas com gene editado geradas conforme na **FIG. 4F**. Quatro das nove linhas testadas continham uma deleção entre os sítios de ligação de TALEN, indicando a edição eficiente do gene.

[026]A **FIG. 5** retrata os resultados de um ensaio de avaliação realizado conforme na **FIG. 4C**, exceto usando o RNA que se direciona ao gene MYC humano, e contendo tanto nucleotídeos canônicos ("A,G,U,C") quanto nucleotídeos não canônicos ("A,7dG,5mU,5mC"). As bandas escuras em 470bp e 500bp indicam a edição gênica de alta eficiência.

[027]A **FIG. 6** retrata os resultados de um ensaio de avaliação realizado conforme na **FIG. 4C**, exceto usando o RNA que se direciona ao gene BIRC5 humano, e contendo tanto nucleotídeos canônicos ("A,G,U,C") quanto nucleotídeos não canônicos ("A,7dG,5mU,5mC"). A banda escura em 710bp indica a edição gênica de alta eficiência.

[028]A **FIG. 7A** retrata células HeLa (carcinoma cervical) transfectadas com o RNA que se direciona ao gene BIRC5 humano (RiboSlice). As células foram transfectadas tanto com um RNA único ("2x de Survivina L") quanto com quantidades iguais de cada membro de um par de RNA

("Survivina L + R"), com a mesma quantidade total de RNA distribuído em cada caso. Como mostrado no painel direito, as células transfectadas com o par de RNA se tornaram maiores e exibiram núcleos fragmentados e proliferação marcadamente reduzida, demonstrando a potente atividade anticâncer de RiboSlice.

[029]A **FIG. 7B** retrata células HeLa transfectadas com RNA que se direciona ao gene BIRC5 humano conforme na **FIG. 7A**. As células foram posteriormente fixadas e coradas para a proteína survivina. Os núcleos foram contracorados com Hoechst 33342. Os núcleos fragmentados grandes das células transfectadas com RiboSlice estão indicados com setas.

[030]A **FIG. 8** retrata fibroblastos adultos primários humanos reprogramados usando RNA sintético. As setas indicam colônias compactas de células que exibem uma morfologia indicativa de reprogramação.

[031]A **FIG. 9** retrata o RNA sintético que codifica as proteínas de edição gênica indicadas, dissolvidas em um gel desnaturante de formaldeído-agarose.

[032]A **FIG. 10A** retrata os resultados de um ensaio de avaliação testando a efetividade do RNA da **FIG. 9** em fibroblastos dérmicos humanos. As células foram lisadas aproximadamente 48h após a transfecção. As bandas correspondentes aos produtos de digestão resultantes da edição gênica bem sucedida estão indicadas com asteriscos. As marcas da faixa são da forma "X.Y", onde X refere-se ao éxon a partir do qual o DNA foi amplificado, e Y refere-se ao par de proteína de edição gênica, por exemplo, "1.1" refere-se ao par de proteína de edição gênica que se direciona à região do éxon 1 mais próximo do códon de

partida. "X.N" refere-se a células não transfectadas.

[033]A **FIG. 10B** retrata os resultados de um ensaio de avaliação testando a toxicidade do RNA da **FIG. 9** em fibroblastos dérmicos humanos. As células foram lisadas 11 dias após a transfecção. As faixas e bandas são marcadas conforme na **FIG. 10A**. O aparecimento das bandas indicadas com asteriscos demonstram que as células transfectadas conservavam alta viabilidade.

[034]A **FIG. 11** retrata os resultados de um estudo designado para testar a segurança do RNA que codifica as proteínas de edição gênica *in vivo*. O gráfico mostra o peso corporal médio dos quatro grupos de camundongos (10 animais em cada grupo), incluindo um grupo não tratado, um grupo com veículo apenas, um grupo tratado com RiboSlice através de injeção intratumoral, e um grupo tratado com RiboSlice através de injeção intravenosa. Para todos os grupos tratados, aos animais foram dadas 5 doses, dia sim dia não, do dia 1 ao dia 9. Os animais foram acompanhados até o dia 17. A falta de uma diferença estatisticamente significativa entre os pesos corporais médios dos quatro grupos demonstra a segurança *in vivo* de RiboSlice.

[035]A **FIG. 12A** retrata os resultados de um ensaio de avaliação que testa a efetividade das proteínas de edição gênica compreendendo várias sequências de repetição com 36 aminoácidos de comprimento. Os fibroblastos dérmicos humanos foram lisados aproximadamente 48h após a transfecção com RNA que codifica proteínas de edição gênica contendo a sequência de repetição indicada. A banda correspondente ao produto de digestão resultante da edição gênica bem sucedida está indicada com um asterisco. As

marcas da faixa referem-se aos aminoácidos no terminal C da sequência de repetição. "Neg." refere-se às células não transfectadas.

[036]A **FIG. 12B** retrata os resultados de um ensaio de avaliação que testa a efetividade das proteínas de edição gênica nas quais cada sequência de repetição tem 36 aminoácidos de comprimento. Os fibroblastos dérmicos humanos foram lisados aproximadamente 48h após a transfecção com RNA que codifica proteínas de edição gênica contendo a sequência de repetição indicada. A banda correspondente ao produto de digestão resultante da edição gênica bem sucedida está indicada com um asterisco. As marcas da faixa referem-se aos aminoácidos no terminal C das sequências de repetição. "Neg." refere-se às células não transfectadas.

[037]A **FIG. 13A** retrata os resultados de um estudo designado para testar a segurança e eficácia do vírus de replicação incompetente AAV da RiboSlice que carregam ácidos nucleicos que codificando as proteínas de edição gênica *in vivo*. O gráfico mostra o peso corporal médio dos três grupos de camundongos portando tumores subcutâneos compreendendo células de glioma humano, incluindo um grupo não tratado (nenhum controle de tratamento, "NTC", n = 6), um grupo tratado com AAV que codifica GFP ("GFP", n=2) através de injeção intratumoral, e um grupo tratado com AAV da RiboSlice que codifica as proteínas de edição gênica que se direcionam ao gene BIRC5 ("RiboSlice", n=2) através de injeção intratumoral. Os animais foram dosados no dia 1 para o grupo GFP, e os dias 1 e 15 para o grupo RiboSlice. Os animais foram acompanhados até o dia 25. A falta de uma

diferença estatisticamente significativa entre os pesos corporais médios dos três grupos demonstra a segurança *in vivo* do AAV da RiboSlice.

[038]A **FIG. 13B** retrata os volumes tumorais normalizados dos animais no estudo mostrado na **FIG. 13A**. O aumento mais lento do volume tumoral normalizado no grupo tratado com AAV da RiboSlice, em comparação aos grupos NTC e GFP, demonstra a eficácia *in vivo* do AAV da RiboSlice.

[039]A **FIG. 14** retrata os resultados de um ensaio de avaliação que testa a efetividade das proteínas de edição gênica, conforme na **FIG. 12B**. "RiboSlice" refere-se a proteínas de edição gênica nas quais cada sequência de repetição tem 36 aminoácidos de comprimento. "w.t." refere-se às células não transfectadas.

[040]A **FIG. 15** retrata o RNA codificando as proteínas indicadas e contendo adenosina, 50% de guanossina, 50% de 7-deazaguanossina, 60% de uridina, 40% de 5-metiluridina, e 5-metilcitidina, dissolvidas em um gel desnaturante de formaldeído-agarose.

[041]A **FIG. 16** retrata os resultados de um ensaio que testa a integração de um modelo de reparo no gene APP. O aparecimento das bandas de 562bp e 385bp na amostra gerada a partir das células transfectadas com RNA e um modelo de reparo indicam a integração bem sucedida de um sítio de restrição da PstI. "-" refere-se a uma amostra não digerida, "+" refere-se a uma amostra tratada com a nuclease de restrição PstI.

Definições

[042]Por "molécula" entende-se uma entidade molecular (molécula, íon, complexo, etc.).

[043] Por "molécula de RNA" entende-se uma molécula que compreende RNA.

[044] Por "molécula de RNA sintética" entende-se uma molécula de RNA que é produzida fora de uma célula ou que é produzida dentro de uma célula usando bioengenharia, à título de exemplo não limitante, uma molécula de RNA que é produzida numa reação de transcrição *in vitro*, uma molécula de RNA que é produzida por síntese química direta ou uma molécula de RNA que é produzida numa célula de *E.coli* geneticamente projetada.

[045] Por "transfecção" entende-se o contato de uma célula com uma molécula, em que a molécula é internalizada pela célula.

[046] Por "após a transfecção" entende-se durante ou após a transfecção.

[047] Por "reagente de transfecção" entende-se uma substância ou mistura de substâncias que se associa com uma molécula e facilita a distribuição da molécula e/ou internalização da molécula por uma célula, à título de exemplo não limitante, um lipídio catiônico, um polímero carregado ou um peptídeo penetrante na célula.

[048] Por "transfecção à base de reagente" entende-se transfecção que usa um reagente de transfecção.

[049] Por "meio de cultura celular" entende-se um meio que pode ser usado para cultura de células, à título de exemplo não limitante, o Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) ou DMEM + 10% de soro bovino fetal (FBS).

[050] Por "meio de complexação" entende-se um meio ao qual um reagente de transfecção e uma molécula a ser transfectada são adicionados e no qual o reagente de

transfecção se associa à molécula a ser transfectada.

[051] Por "meio de transfecção" entende-se um meio que pode ser usado para transfecção, à título de exemplo não limitante, o Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) ou DMEM/F12.

[052] Por "proteína recombinante" entende-se uma proteína ou peptídeo que não é produzido em animais ou humanos. Exemplos não limitantes incluem a transferrina humana que é produzida em bactérias, fibronectina humana que é produzida numa cultura *in vitro* de células de camundongo, e albumina de soro humano que é produzida numa planta de arroz.

[053] Por "carreador de lipídio" entende-se uma substância que pode aumentar a solubilidade de um lipídio ou molécula solúvel em lipídio numa solução aquosa, à título de exemplo não limitante, albumina de soro humano ou metil-beta-ciclodextrina.

[054] Por "proteína Oct4" entende-se uma proteína que é codificada pelo gene POU5F1, ou uma variante natural ou projetada, membro da família, ortólogo, fragmento ou construto de fusão do mesmo, à título de exemplo não limitante, a proteína Oct4 humana (SEQ ID NO: 8), proteína Oct4 de camundongo, proteína Oct1, uma proteína codificada pelo pseudogene 2 de POU5F1, um domínio de ligação de DNA da proteína Oct4 ou uma proteína de fusão Oct4-GFP. Em algumas modalidades, a proteína Oct4 compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 8, ou, em outras modalidades, pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de identidade com a SEQ ID NO: 8. Em algumas modalidades, a proteína Oct4

compreende uma sequência de aminoácidos tendo inserções, deleções ou substituições de 1 a 20 aminoácidos (coletivamente) em relação à SEQ ID NO: 8. Ou em outras modalidades, a proteína Oct4 compreende uma sequência de aminoácidos tendo inserções, deleções ou substituições de 1 a 15 ou de 1 a 10 aminoácidos (coletivamente) em relação à SEQ ID NO: 8.

[055] Por “proteína Sox2” entende-se uma proteína que é codificada pelo gene SOX2, ou uma variante natural ou projetada, membro da família, ortólogo, fragmento ou construto de fusão do mesmo, à título de exemplo não limitante, a proteína Sox2 humana (SEQ ID NO: 9), proteína Sox2 de camundongo, um domínio de ligação de DNA da proteína Sox2 ou uma proteína de fusão Sox2-GFP. Em algumas modalidades, a proteína Sox2 compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 9, ou, em outras modalidades, pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de identidade com a SEQ ID NO: 9. Em algumas modalidades, a proteína Sox2 compreende uma sequência de aminoácidos tendo inserções, deleções ou substituições de 1 a 20 aminoácidos (coletivamente) em relação à SEQ ID NO: 9. Ou em outras modalidades, a proteína Sox2 compreende uma sequência de aminoácidos tendo inserções, deleções ou substituições de 1 a 15 ou de 1 a 10 aminoácidos (coletivamente) em relação à SEQ ID NO: 9.

[056] Por “proteína Klf4” entende-se uma proteína que é codificada pelo gene KLF4, ou uma variante natural ou projetada, membro da família, ortólogo, fragmento ou construto de fusão do mesmo, à título de exemplo não limitante, a proteína Klf4 humana (SEQ ID NO: 10), proteína

Klf4 de camundongo, um domínio de ligação de DNA da proteína Klf4 ou uma proteína de fusão Klf4-GFP. Em algumas modalidades, a proteína Klf4 compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 10, ou, em outras modalidades, pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de identidade com a SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, a proteína Klf4 compreende uma sequência de aminoácidos tendo inserções, deleções ou substituições de 1 a 20 aminoácidos (coletivamente) em relação à SEQ ID NO: 10. Ou em outras modalidades, a proteína Klf4 compreende uma sequência de aminoácidos tendo inserções, deleções ou substituições de 1 a 15 ou de 1 a 10 aminoácidos (coletivamente) em relação à SEQ ID NO: 10.

[057] Por “proteína c-Myc” entende-se uma proteína que é codificada pelo gene MYC, ou uma variante natural ou projetada, membro da família, ortólogo, fragmento ou construto de fusão do mesmo, a título de exemplo não limitante, a proteína c-Myc humana (SEQ ID NO: 11), proteína c-Myc de camundongo, proteína l-Myc, proteína c-Myc (T58A), um domínio de ligação de DNA da proteína c-Myc ou uma proteína de fusão c-Myc-GFP. Em algumas modalidades, a proteína c-Myc compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade com a SEQ ID NO: 11, ou, em outras modalidades, pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de identidade com a SEQ ID NO: 11. Em algumas modalidades, a proteína c-Myc compreende uma sequência de aminoácidos tendo inserções, deleções ou substituições de 1 a 20 aminoácidos (coletivamente) em relação à SEQ ID NO: 11. Ou em outras modalidades, a proteína c-Myc compreende uma sequência de aminoácidos tendo inserções, deleções ou

substituições de 1 a 15 ou de 1 a 10 aminoácidos (coletivamente) em relação à SEQ ID NO: 11.

[058] Por "reprogramação" entende-se a provocação de uma alteração no fenótipo de uma célula, à título de exemplo não limitante, fazendo com que um progenitor da célula β se diferencie numa célula β madura, fazendo com que um fibroblasto se diferencie numa célula-tronco pluripotente, fazendo com que um queratinócito se transdiferencie numa célula-troco cardíaca ou fazendo com que o axônio de um neurônio cresça.

[059] Por "fator de reprogramação" entende-se uma molécula que, quando uma célula entre em contato com a molécula e/ou a célula expressa a molécula, pode, tanto sozinha quanto em combinação com outras moléculas, provocar a reprogramação, à título de exemplo não limitante, a proteína Oct4.

[060] Por "alimentador" entende-se uma célula que pode ser usada para condicionar o meio ou para suportar, de outra forma, o crescimento de outras células em cultura.

[061] Por "condicionamento" entende-se o contato de um ou mais alimentadores com um meio.

[062] Por "ácido graxo" entende-se uma molécula que compreende uma cadeia alifática de pelo menos dois átomos de carbono, à título de exemplo não limitante, ácido linoleico, ácido α -linolenico, ácido octanoico, um leucotrieno, uma prostaglandina, colesterol, um glicocorticoide, uma resolvina, uma protectina, um tromboxano, uma lipoxina, uma maresina, um esfingolipídeo, triptofano, N-acetil triptofano ou um sal, éster metílico ou derivado dos mesmos.

[063] Por "ácido graxo de cadeia curta" entende-se um ácido graxo que compreende uma cadeia alifática de entre dois e 30 átomo de carbono.

[064] Por "albumina" entende-se uma proteína que é altamente solúvel em água, à título de exemplo não limitante, albumina de soro humano.

[065] Por "molécula associada" entende-se uma molécula que está ligada de forma não covalente a outra molécula.

[066] Por "componente de molécula associada da albumina" entende-se uma ou mais moléculas que estão ligadas a um polipeptídeo de albumina, à título de exemplo não limitante, lipídeos, hormônios, colesterol, íons de cálcio, etc. que estão ligados a um polipeptídeo de albumina.

[067] Por "albumina tratada" entende-se albumina que é tratada para reduzir, remover, substituir ou inativar de outra forma o componente de molécula associada da albumina, à título de exemplo não limitante, albumina de soro humano que é incubada numa temperatura elevada, albumina de soro humano que é posta em contato com octanoato de sódio ou albumina de soro humano que é posta em contato com um material poroso.

[068] Por "resina de troca iônica" entende-se um material que, quando posto em contato com uma solução contendo íons, pode substituir um ou mais dos íons por um ou mais íons diferentes, à título de exemplo não limitante, um material que pode substituir um ou mais íons de cálcio por um ou mais íons de sódio.

[069] Por "célula germinativa" entende-se um espermatozoide ou um óvulo.

[070] Por "célula-tronco pluripotente" entende-se uma célula que pode se diferenciar em células das três camadas germinativas (endoderma, mesoderma e ectoderma) *in vivo*.

[071] Por "célula somática" entende-se uma célula que não é uma célula-tronco pluripotente ou uma célula germinativa, à título de exemplo não limitante, uma célula da pele.

[072] Por "célula produtora de insulina responsiva à glicose" entende-se uma célula que, quando exposta a uma determinada concentração de glicose, pode produzir e/ou secretar uma quantidade de insulina que seja diferente (tanto menor quanto maior) da quantidade de insulina que a célula produz e/ou secreta quando a célula é exposta a uma concentração diferente de glicose, à título de exemplo não limitante, uma célula β .

[073] Por "célula hematopoiética" entende-se uma célula do sangue ou uma célula que pode se diferenciar numa célula do sangue, à título de exemplo não limitante, uma célula-tronco hematopoiética ou uma célula branca do sangue.

[074] Por "célula cardíaca" entende-se uma célula do coração ou uma célula que possa se diferenciar numa célula do coração, à título de exemplo não limitante, uma célula-tronco cardíaca ou um cardiomiócito.

[075] Por "célula da retina" entende-se uma célula da retina ou uma célula que possa se diferenciar numa célula da retina, à título de exemplo não limitante, uma célula epitelial pigmentada da retina.

[076] Por "célula da pele" entende-se uma célula que é normalmente encontrada na pele, à título de exemplo não limitante, um fibroblasto, um queratinócito, um melanócito,

um adipócito, uma célula-tronco mesenquimal, uma célula-tronco adiposa ou uma célula sanguínea.

[077] Por "agonista de sinalização Wnt" entende-se uma molécula que pode realizar uma ou mais funções biológicas de um ou mais membros da família Wnt de proteínas, à título de exemplo não limitante, Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a ou 2-amino-4-[3,4-(metilenodioxibenzilamino)-6-(3-metoxifenil)pirimidina.

[078] Por "agonista de sinalização IL-6" entende-se uma molécula que possa realizar uma ou mais funções biológicas da proteína IL-6, à título de exemplo não limitante, proteína IL-6 ou receptor de IL-6 (também conhecido como receptor de IL-6 solúvel, IL-6R, IL-6R alfa, etc.).

[079] Por "agonista de sinalização TGF- β " entende-se uma molécula que possa realizar uma ou mais funções biológicas de um ou mais membros da superfamília de TGF- β de proteínas, à título de exemplo não limitante, TGF- β 1, TGF- β 3, Activina A, BMP-4 ou Nodal.

[080] Por "imunossupressor" entende-se uma substância que possa suprimir um ou mais aspectos de um sistema imune, e que não esteja normalmente presente em um mamífero, à título de exemplo não limitante, B18R ou dexametasona.

[081] Por "ruptura de fita única" entende-se uma região de DNA de fita única ou de fita dupla, na qual uma ou mais das ligações covalentes que ligam os nucleotídeos foi rompida em uma das fitas.

[082] Por "ruptura de fita dupla" entende-se uma região de DNA de fita dupla, na qual uma ou mais ligações covalentes que ligam os nucleotídeos foi rompida em cada uma das duas fitas.

[083] Por "nucleotídeo" entende-se um nucleotídeo ou um fragmento ou derivado do mesmo, à título de exemplo não limitante, uma nucleobase, um nucleosídeo, um nucleotídeo trifosfato, etc.

[084] Por "nucleosídeo" entende-se um nucleotídeo ou fragmento ou derivado do mesmo, à título de exemplo não limitante, uma nucleobase, um nucleosídeo, um nucleotídeo trifosfato, etc.

[085] Por "edição gênica" entende-se a alteração da sequência de DNA de uma célula, à título de exemplo não limitante, pela transferência da célula com uma proteína que provoca uma mutação no DNA da célula.

[086] Por "proteína de edição gênica" entende-se uma proteína que possa, tanto sozinha quanto em combinação com uma ou mais outras moléculas, alterar a sequência de DNA de uma célula, à título de exemplo não limitante, uma nucleobase, uma nuclease efetora semelhante ao ativador de transcrição (TALEN), uma nuclease de dedo de zinco, uma meganuclease, uma nickase, uma proteína associada à repetição palindrômica curta regularmente interespaçada e aglomerada (CRISPR) ou uma variante natural ou projetada, membro de família, ortólogo, fragmento ou construto de fusão dos mesmos.

[087] Por "modelo de reparo" entende-se um ácido nucleico contendo uma região de pelo menos cerca de 70% de homologia com uma sequência que está dentro de 10kb de um sítio alvo de uma proteína de edição gênica.

[088] Por "sequência de repetição" entende-se uma sequência de aminoácidos que está presente em mais de uma cópia numa proteína, dentro de pelo menos 10% de homologia,

à título de exemplo não limitante, uma repetição de monômero de um efector semelhante ao ativador de transcrição.

[089] Por "domínio de ligação de DNA" entende-se uma região de uma molécula que é capaz de se ligar a uma molécula de DNA, à título de exemplo não limitante, um domínio de proteína compreendendo um ou mais dedos de zinco, um domínio de proteína compreendendo uma ou mais sequências de repetição efectoras semelhantes ao ativador de transcrição (TAL) ou um bolso de ligação de uma molécula pequena que seja capaz de se ligar a uma molécula de DNA.

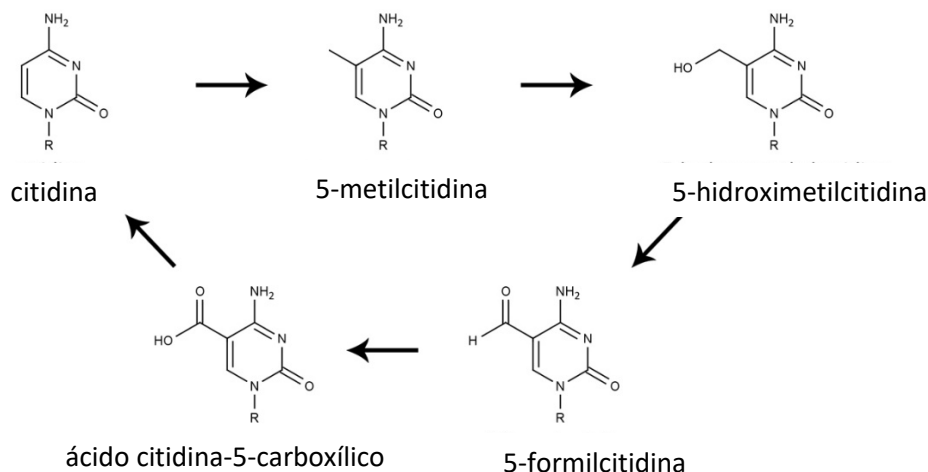
[090] Por "sítio de ligação" entende-se uma sequência de ácido nucleico que é capaz de ser reconhecida por uma proteína de edição gênica, proteína de ligação de DNA, domínio de ligação de DNA ou um fragmento biologicamente ativo ou variante do mesmo ou uma sequência de ácido nucleico pela qual uma proteína de edição gênica, proteína de ligação de DNA, domínio de ligação de DNA ou um fragmento biologicamente ativo ou variante do mesmo tem alta afinidade, à título de exemplo não limitante, uma sequência de cerca de 20 pares de base de DNA no éxon 1 do gene BIRC5 humano.

[091] Por "alvo" entende-se um ácido nucleico que contém um sítio de ligação.

[092] Outras definições estão estabelecidas no Pedido U.S. Nº. 13/465.490, Pedido Provisório U.S. Nº. 61/664.494, Pedido Provisório U.S. Nº. 61/721.302, Pedido Internacional Nº. PCT/US12/67966, Pedido Provisório U.S. Nº. 61/785.404, e Pedido Provisório U.S. Nº. 61/842.874, cujos conteúdos estão incorporados em sua totalidade por meio deste por referência.

[093] Foi descoberto agora que os membros de nucleotídeo não canônicos da via de desmetilação da 5-metilcitidina, quando incorporados no RNA sintético, podem aumentar a eficiência com a qual o RNA sintético pode ser traduzido em proteína, e podem diminuir a toxicidade do RNA sintético. Esses nucleotídeos não canônicos incluem, por exemplo: 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-formilcitidina e 5-carboxicitidina (também conhecida como “ácido citidina-5-carboxílico”). Determinadas modalidades são portanto direcionadas a um ácido nucleico. Em uma modalidade, o ácido nucleico é uma molécula de RNA sintética. Em outra modalidade, o ácido nucleico compreende um ou mais nucleotídeos não canônicos. Em uma modalidade, o ácido nucleico compreende um ou mais membros não canônicos da via de desmetilação da 5-metilcitidina. Em outra modalidade, o ácido nucleico compreende pelo menos um de: 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-formilcitidina e 5-carboxicitidina ou um derivado das mesmas. Em outra modalidade, o ácido nucleico compreende pelo menos um de: pseudouridina, 5-metilpseudouridina, 5-metiluridina, 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, N4-metilcitidina, N4-acetilcitidina e 7-deazaguanosina ou um derivado das mesmas.

Via de Desmetilação da 5-Metilcitidina



[094] Determinadas modalidades são direcionadas a uma proteína. Outras modalidades são direcionadas a um ácido nucleico que codifica uma proteína. Em uma modalidade, a proteína é uma proteína de interesse. Em outra modalidade, a proteína é selecionada a partir de: uma proteína de reprogramação e uma proteína de edição gênica. Em uma modalidade, o ácido nucleico é um plasmídeo. Em outra modalidade, o ácido nucleico está presente em um vírus ou vetor viral. Em outra modalidade, o vírus ou o vetor viral é de replicação incompetente. Ainda em outra modalidade, o vírus ou o vetor viral é de replicação competente. Em uma modalidade, o vírus ou o vetor viral inclui pelo menos um de: um adenovírus, um retrovírus, um lentivírus, um herpes vírus, um vírus adenoassociado ou uma variante natural ou projetada dos mesmos, e um vírus projetado.

[095] Também foi descoberto que determinadas combinações de nucleotídeos não canônicos podem ser particularmente eficazes em aumentar a eficiência com a qual o RNA sintético pode ser traduzido em proteína, e em diminuir a toxicidade do RNA sintético, por exemplo, as combinações: 5-metiluridina e 5-metilcitidina, 5-metiluridina e 7-deazaguanosina, 5-metilcitidina e 7-deazaguanosina, 5-metiluridina, 5-metilcitidina, e 7-

deazaguanosina, e 5-metiluridina, 5-hidroximetilcitidina, e 7-deazaguanosina. Determinadas modalidades estão portanto direcionadas a um ácido nucleico que compreende pelo menos dois de: 5-metiluridina, 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, e 7-deazaguanosina ou um ou mais derivados das mesmas. Outras modalidades estão direcionadas a um ácido nucleico que compreende pelo menos três de: 5-metiluridina, 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, e 7-deazaguanosina ou um ou mais derivados das mesmas. Outras modalidades estão direcionadas a um ácido nucleico que compreende todos de: 5-metiluridina, 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, e 7-deazaguanosina ou um ou mais derivados das mesmas. Em uma modalidade, o ácido nucleico compreende um ou mais resíduos de 5-metiluridina, um ou mais resíduos de 5-metilcitidina, e um ou mais resíduos de 7-deazaguanosina ou um ou mais resíduos de 5-metiluridina, um ou mais resíduos de 5-hidroximetilcitidina, e um ou mais resíduos de 7-deazaguanosina.

[096] Foi descoberto ainda que moléculas de RNA sintético contendo determinadas frações de determinados nucleotídeos não canônicos e combinações dos mesmos podem exibir eficiência de tradução particularmente alta e baixa toxicidade. Determinadas modalidades estão portanto direcionadas a um ácido nucleico que compreende pelo menos um de: um ou mais resíduos de uridina, um ou mais resíduos de citidina, e um ou mais resíduos de guanosina, e compreendendo um ou mais nucleotídeos não canônicos. Em uma modalidade, entre cerca de 20% e cerca de 80% dos resíduos de uridina são resíduos de 5-metiluridina. Em outra modalidade, entre cerca de 30% e cerca de 50% dos resíduos

de uridina são resíduos de 5-metiluridina. Em outra modalidade, cerca de 40% dos resíduos de uridina são resíduos de 5-metiluridina. Em uma modalidade, entre cerca de 60% e cerca de 80% dos resíduos de citidina são resíduos de 5-metilcitidina. Em outra modalidade, entre cerca de 80% e cerca de 100% dos resíduos de citidina são resíduos de 5-metilcitidina. Em outra modalidade, cerca de 100% dos resíduos de citidina são resíduos de 5-metilcitidina. Em ainda outra modalidade, entre cerca de 20% e cerca de 100% dos resíduos de citidina são resíduos de 5-hidroximetilcitidina. Em uma modalidade, entre cerca de 20% e cerca de 80% dos resíduos de guanosina são resíduos de 7-deazaguanosina. Em outra modalidade, entre cerca de 40% e cerca de 60% dos resíduos de guanosina são resíduos de 7-deazaguanosina. Em outra modalidade, cerca de 50% dos resíduos de guanosina são resíduos de 7-deazaguanosina. Em uma modalidade, entre cerca de 20% e cerca de 80% ou entre cerca de 30% e cerca de 60% ou cerca de 40% dos resíduos de citidina são resíduos de N4-metilcitidina e/ou de N4-acetilcitidina. Em outra modalidade, cada resíduos de citidina é um resíduo de 5-metilcitidina. Em outra modalidade, cerca de 100% dos resíduos de citidina são resíduos de 5-metilcitidina e/ou resíduos de 5-hidroximetilcitidina e/ou resíduos de N4-metilcitidina e/ou resíduos de N4-acetilcitidina e/ou um ou mais derivados dos mesmos. Em ainda outra modalidade, cerca de 40% dos resíduos de uridina são resíduos de 5-metiluridina, entre cerca de 20% e cerca de 100% dos resíduos de citidina são resíduos de N4-metilcitidina e/ou de N4-acetilcitidina, e cerca de 50% dos resíduos de guanosina são resíduos de 7-

deazaguanosina. Em uma modalidade, cerca de 40% dos resíduos de uridina são resíduos de 5-metiluridina e cerca de 100% dos resíduos de citidina são resíduos de 5-metilcitidina. Em outra modalidade, cerca de 40% dos resíduos de uridina são resíduos de 5-metiluridina e cerca de 50% dos resíduos de guanosina são resíduos de 7-deazaguanosina. Em outra modalidade, cerca de 100% dos resíduos de citidina são resíduos de 5-metilcitidina e cerca de 50% dos resíduos de guanosina são resíduos de 7-deazaguanosina. Em uma modalidade, cerca de 40% dos resíduos de uridina são resíduos de 5-metiluridina, cerca de 100% dos resíduos de citidina são resíduos de 5-metilcitidina, e cerca de 50% dos resíduos de guanosina são resíduos de 7-deazaguanosina. Em outra modalidade, cerca de 40% dos resíduos de uridina são resíduos de 5-metiluridina, entre cerca de 20% e cerca de 100% dos resíduos de citidina são resíduos de 5-hidroximetilcitidina, e cerca de 50% dos resíduos de guanosina são resíduos de 7-deazaguanosina. Em algumas modalidades, menos de 100% dos resíduos de citidina são resíduos de 5-metilcitidina. Em outras modalidades, menos de 100% dos resíduos de citidina são resíduos de 5-hidroximetilcitidina. Em uma modalidade, cada resíduos de uridina na molécula de RNA sintético é um resíduo de pseudouridina ou um resíduo de 5-metilpseudouridina. Em outra modalidade, cerca de 100% dos resíduos de uridina são resíduos de pseudouridina e/ou resíduos de 5-metilpseudouridina. Em outra modalidade, cerca de 100% dos resíduos de uridina são resíduos de pseudouridina e/ou resíduos de 5-metilpseudouridina, cerca de 100% dos resíduos de citidina são resíduos de 5-metilcitidina, e

cerca de 50% dos resíduos de guanosina são resíduos de 7-deazaguanosina.

[097] Outros nucleotídeos não canônicos que podem ser usados no lugar de, ou em combinação com, 5-metiluridina incluem, mas não estão limitados a: pseudouridina e 5-metilpseudouridina (também conhecida como "1-metilpseudouridina", também conhecida como "N1-metilpseudouridina") ou um ou mais derivados da mesma. Outros nucleotídeos não canônicos que podem ser usados no lugar de, ou em combinação com, 5-metilcitidina e/ou 5-hidroximetilcitidina incluem, mas não estão limitados a: pseudoisocitidina, 5-metilpseudoisocitidina, 5-hidroximetilcitidina, 5-formilcitidina, 5-carboxicitidina, N4-metilcitidina, N4-acetilcitidina ou um ou mais derivados das mesmas. Em determinadas modalidades, por exemplo, ao realizar apenas uma transfecção simples ou quando as células sendo transfectadas não são particularmente sensíveis à toxicidade associada à transfecção ou à sinalização inata imune, as frações de nucleotídeos não canônicos podem ser reduzidas. A redução da fração de nucleotídeos não canônicos pode ser benéfica, em parte, porque a redução da fração de nucleotídeos não canônicos pode reduzir o custo do ácido nucleico. Em determinadas situações, por exemplo, quando é desejada mínima imunogenicidade do ácido nucleico, as frações de nucleotídeos não canônicos podem ser aumentadas.

[098] Enzimas, tais como a T7 RNA polimerase, podem incorporar preferencialmente nucleotídeos canônicos numa reação de transcrição *in vitro* contendo nucleotídeos canônicos e não canônicos. Como um resultado, uma reação de

transcrição *in vitro* contendo uma determinada fração de um nucleotídeo não canônico pode gerar um RNA contendo uma fração diferente, geralmente inferior, do nucleotídeo não canônico que o da fração na qual o nucleotídeo não canônico estava presente na reação. Em determinadas modalidades, as referências às frações de incorporação de nucleotídeo (por exemplo, "50% de 5-metiluridina") podem, portanto, se referir aos ácidos nucleicos contendo a fração citada do nucleotídeo, e aos ácidos nucleicos sintetizados numa reação contendo a fração citada do nucleotídeo (ou derivado de nucleotídeo, por exemplo, nucleotídeo-trifosfato), até mesmo tal reação pode gerar um ácido nucleico contendo uma fração diferente do nucleotídeo que o da fração na qual o nucleotídeo não canônico estava presente na reação. Além disso, diferentes sequências de nucleotídeos podem codificar a mesma proteína, utilizando códons alternativos. Em determinadas modalidades, referências às frações de incorporação de nucleotídeo podem, portanto, se referir aos ácidos nucleicos contendo a fração citada do nucleotídeo, e aos ácidos nucleicos que codificam a mesma proteína que um ácido nucleico diferente, em que o ácido nucleico diferente contém a fração citada do nucleotídeo.

[099]A sequência de DNA de uma célula pode ser alterada pelo contato da célula com uma proteína de edição gênica ou pela indução da célula a expressar uma proteína de edição gênica. No entanto, proteínas de edição gênica anteriormente divulgadas sofrem de baixa eficiência de ligação e excessiva atividade inespecífica, o que pode introduzir mutações indesejadas no DNA da célula, limitando gravemente seu uso em aplicações terapêuticas, nas quais a

introdução de mutações indesejadas nas células de um paciente poderia levar ao desenvolvimento de câncer. Foi descoberto agora que as proteínas de edição gênica, que compreendem o domínio de clivagem da endonuclease StsI, (SEQ ID NO: 1) podem exibir atividade inespecífica substancialmente menor do que as proteínas de edição gênica anteriormente divulgadas, enquanto mantêm um alto nível de atividade específica. Outras proteínas projetadas novas também foram descobertas como podendo exibir alta atividade específica, baixa atividade inespecífica, pequeno tamanho, solubilidade, e outras características desejáveis quando elas são usadas como o domínio da nuclease de uma proteína de edição gênica: StsI-HA (SEQ ID NO: 2), StsI-HA2 (SEQ ID NO: 3), StsI-UHA (SEQ ID NO: 4), StsI-UHA2 (SEQ ID NO: 5), StsI-HF (SEQ ID NO: 6), e StsI-UHF (SEQ ID NO: 7). StsI-HA, StsI-HA2 (alta atividade), StsI-UHA e StsI-UHA2 (atividade ultra-alta) podem exibir maior atividade específica do que StsI do tipo selvagem e FokI do tipo selvagem, devido, em parte, a substituições de aminoácidos específicos dentro da região N-terminal nas posições 34 e 61, enquanto o StsI-HF (alta fidelidade) e o StsI-UHF (fidelidade ultra-alta) podem exibir menor atividade inespecífica do que StsI do tipo selvagem e FokI do tipo selvagem, devido, em parte, a substituições de aminoácidos específicos dentro da região C-terminal nas posições 141 e 152. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a uma proteína que compreende um domínio de nuclease. Em uma modalidade, o domínio de nuclease compreende um ou mais de: o domínio de clivagem da FokI endonuclease (SEQ ID NO: 53), o domínio de clivagem da StsI endonuclease (SEQ ID NO: 1), StsI-HA (SEQ ID NO: 2),

StsI-HA2 (SEQ ID NO: 3), StsI-UHA (SEQ ID NO: 4), StsI-UHA2 (SEQ ID NO: 5), StsI-HF (SEQ ID NO: 6), e StsI-UHF (SEQ ID NO: 7) ou um fragmento biologicamente ativo ou variante dos mesmos.

[0100] Também foi descoberto que as proteínas de edição gênica projetadas que compreendem domínios de ligação de DNA compreendendo determinadas sequências de repetição novas podem exibir menor atividade inespecífica do que as proteínas de edição gênica anteriormente divulgadas, enquanto mantêm um alto nível de atividade específica. Algumas dessas proteínas de edição gênica projetadas podem fornecer várias vantagens sobre as proteínas de edição gênica anteriormente divulgadas, incluindo, por exemplo, maior flexibilidade da região ligadora que conecta as sequências de repetição, o que pode resultar em maior eficiência de ligação. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a uma proteína que compreende uma pluralidade de sequências de repetição. Em uma modalidade, pelo menos uma das sequências de repetição contém a sequência de aminoácidos: GabG, onde "a" e "b", cada um, representam qualquer aminoácido. Em uma modalidade, a proteína é uma proteína de edição gênica. Em outra modalidade, uma ou mais das sequências de repetição estão presentes em um domínio de ligação de DNA. Em outra modalidade, "a" e "b" são, cada um, independentemente selecionados do grupo: H e G. Em ainda outra modalidade, "a" e "b" são H e G, respectivamente. Em uma modalidade, a sequência de aminoácidos está presente dentro de cerca de 5 aminoácidos do terminal C da sequência de repetição. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos está presente

no terminal C da sequência de repetição. Em algumas modalidades, um ou mais G na sequência de aminoácidos GabG são substituídos por um ou mais aminoácidos diferentes de G, por exemplo A, H ou GG. Em uma modalidade, a sequência de repetição tem um comprimento de entre cerca de 32 e cerca de 40 aminoácidos ou entre cerca de 33 e cerca de 39 aminoácidos ou entre cerca de 34 e 38 aminoácidos ou entre cerca de 35 e cerca de 37 aminoácidos ou cerca de 36 aminoácidos ou mais de cerca de 32 aminoácidos ou mais de cerca de 33 aminoácidos ou mais de cerca de 34 aminoácidos ou mais de cerca de 35 aminoácidos. Outras modalidades são direcionadas a uma proteína que compreende um ou mais domínios efetores semelhante ao ativador de transcrição. Em uma modalidade, pelo menos um dos domínios efetores semelhante ao ativador de transcrição compreende uma sequência de repetição. Outras modalidades são direcionadas a uma proteína que compreende uma pluralidade de sequências de repetição geradas pela inserção de um ou mais aminoácidos entre pelo menos duas das sequências de repetição de um domínio efector semelhante ao ativador de transcrição. Em uma modalidades, um ou mais aminoácidos são inseridos a cerca de 1 ou cerca de 2 ou cerca de 3 ou cerca de 4 ou cerca de 5 aminoácidos do terminal C de pelo menos uma sequência de repetição. Ainda outras modalidades são direcionadas a uma proteína que compreende uma pluralidade de sequências de repetição, em que cerca de a cada sequência de repetição tem um comprimento diferente da sequência de repetição imediatamente anterior ou posterior à sequência de repetição. Em uma modalidade, cada sequência de repetição tem cerca de 36 aminoácidos de comprimento. Em

outra modalidade, cada sequência de repetição intercalada tem 36 aminoácidos de comprimento. Ainda outras modalidades são direcionadas a uma proteína que compreende uma pluralidade de sequências de repetição, em que a pluralidade de sequências de repetição compreende pelo menos duas sequências de repetição que têm, cada uma, pelo menos 36 aminoácidos de comprimento, e em que pelo menos duas das sequências de repetição que têm pelo menos 36 aminoácidos de comprimento são separadas por pelo menos uma sequência de repetição que é menor que 36 aminoácidos de comprimento. Algumas modalidades são direcionadas a uma proteína que compreende uma ou mais sequências selecionadas, por exemplo, da SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, e SEQ ID NO: 60.

[0101] Outras modalidades são direcionadas a uma proteína que compreende um domínio de ligação de DNA. Em algumas modalidades, o domínio de ligação de DNA compreende uma pluralidade de sequências de repetição. Em uma modalidade, a pluralidade de sequências de repetição permite um reconhecimento de alta especificidade de um sítio de ligação em uma molécula de DNA alvo. Em outra modalidade, pelo menos duas das sequências de repetições têm pelo menos cerca de 50%, ou cerca de 60%, ou cerca de 70%, ou cerca de 80%, ou cerca de 90%, ou cerca de 95%, ou cerca de 98%, ou cerca de 99% de homologia entre si. Em outra modalidades, pelo menos uma das sequências de repetição compreende uma ou mais regiões capazes de se ligar a um sítio de ligação numa molécula de DNA alvo. Em outra modalidade, o sítio de ligação compreende uma

sequência definida de entre cerca de 1 a cerca de 5 bases de comprimento. Em uma modalidade, o domínio de ligação de DNA compreende um dedo de zinco. Em outra modalidade, o domínio de ligação de DNA compreende um efetor semelhante ao ativador de transcrição (TALE). Em outra modalidade, a pluralidade de sequências de repetição inclui pelo menos uma sequência de repetição tendo pelo menos cerca de 50% ou cerca de 60% ou cerca de 70% ou cerca de 80% ou cerca de 90% ou cerca de 95% ou cerca de 98%, ou cerca de 99% de homologia a um TALE. Em ainda outra modalidade, a proteína de edição gênica compreende uma proteína associada à repetição palindrômica curta regularmente interespaçada e agrupada (CRISPR). Em uma modalidade, a proteína de edição gênica compreende uma sequência de localização nuclear. Em outra modalidade, a sequência de localização nuclear compreende a sequência de aminoácidos: PKKKRKV. Em uma modalidade, a proteína de edição gênica compreende uma sequência de localização mitocondrial. Em outra modalidade, a sequência de localização mitocondrial compreende a sequência de aminoácidos: LGRVIPRKIASRASLM. Em uma modalidade, a proteína de edição gênica compreende um ligador. Em outra modalidade, o ligador conecta um domínio de ligação de DNA a um domínio de nuclease. Em outra modalidade, o ligador tem entre cerca de 1 e cerca de 10 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, o ligador tem cerca de 1, cerca de 2, ou cerca de 3, ou cerca de 4, ou cerca de 5, ou cerca de 6, ou cerca de 7, ou cerca de 8, ou cerca de 9, ou cerca de 10 aminoácidos de comprimento. Em uma modalidade, a proteína de edição gênica é capaz de gerar um corte ou uma ruptura de fita dupla numa

molécula de DNA alvo.

[0102] Determinadas modalidades são direcionadas a um método para modificar o genoma de uma célula, o método compreendendo a introdução na célula de uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão de ocorrência não natural compreendendo um domínio de repetição efetor semelhante ao ativador de transcrição artificial (TAL) compreendendo uma ou mais unidades de repetição de 36 aminoácidos de comprimento e um domínio de endonuclease, em que o domínio de repetição é projetado para o reconhecimento de uma sequência nucleotídica predeterminada, e em que a proteína de fusão reconhece a sequência nucleotídica predeterminada. Em uma modalidade, a célula é uma célula eucariótica. Em outra modalidade, a célula é uma célula animal. Em outra modalidade, a célula é uma célula de mamífero. Em ainda outra modalidade, a célula é uma célula humana. Em uma modalidade, a célula é uma célula vegetal. Em outra modalidade, a célula é uma célula procariótica. Em algumas modalidades, a proteína de fusão introduz uma clivagem endonucleolítica em um ácido nucleico da célula, pela qual o genoma da célula é modificado.

[0103] Outras modalidades são direcionadas a uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão de ocorrência não natural compreendendo um domínio de repetição efetor semelhante ao ativador de transcrição artificial (TAL) compreendendo uma ou mais unidades de repetição de 36 aminoácidos de comprimento e atividade de endonuclease de restrição, em que o domínio de repetição é projetado para o reconhecimento de uma sequência nucleotídica predeterminada e em que a proteína de fusão

reconhece a sequência nucleotídica predeterminada. Em uma modalidade, as unidades de repetição diferem em não mais de cerca de sete aminoácidos. Em outra modalidade, cada uma das unidades de repetição contém a sequência de aminoácidos: LTPXQVVAIAS, onde X pode ser E ou Q, e a sequência de aminoácidos: LTPXQVVAIAS é seguida nos terminais carboxil por um ou dois aminoácidos que determinam o reconhecimento para um de adenina, citosina, guanina ou timina. Em uma modalidade, o ácido nucleico codifica cerca de 1,5 a cerca de 28,5 unidades de repetição. Em outra modalidade, o ácido nucleico codifica cerca de 11,5, cerca de 14,5, cerca de 17,5 ou cerca de 18,5 unidades de repetição. Em outra modalidade, a sequência nucleotídica predeterminada é uma região promotora. Algumas modalidades são direcionadas a um vetor compreendendo uma molécula ou sequência de ácido nucleico. Em uma modalidade, o vetor é um vetor viral. Em outra modalidade, o vetor viral compreende um ou mais de: um adenovírus, um retrovírus, um lentivírus, um herpes vírus, um vírus adenoassociado ou uma variante natural ou projetada dos mesmos, e um vírus projetado.

[0104] Determinadas modalidades são direcionadas a uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão de ocorrência não natural compreendendo uma primeira região que reconhece uma sequência nucleotídica predeterminada e uma segunda região com atividade de endonuclease, em que a primeira região contém um domínio de repetição efetor TAL artificial que compreende uma ou mais unidades de repetição de cerca de 36 aminoácidos de comprimento que diferem entre si em não mais de sete

aminoácidos, e em que o domínio de repetição é projetado para o reconhecimento da sequência nucleotídica predeterminada. Em uma modalidade, a primeira região contém a sequência de aminoácidos: LTPXQVVAIAS, onde X pode ser E ou Q. Em outra modalidade, a sequência de aminoácidos LTPXQVVAIAS da proteína de fusão de ocorrência não natural codificada é imediatamente seguida por uma sequência de aminoácidos selecionada de: HD, NG, NS, NI, NN, e N. Em outra modalidade, a proteína de fusão compreende a atividade de endonuclease de restrição. Algumas modalidades são direcionadas a uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína que compreende uma ou mais sequências selecionadas de: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60.

[0105] Em uma modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwxyzHG, em que “v” é D ou E, “w” é S ou N, “x” é N, H ou I, “y” é qualquer aminoácido ou nenhum aminoácido, e “z” é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQDHG, GGKQALETVQRLLPVLCQAHG, GGKQALETVQRLLPVLCQDHG ou GGKQALETVQRLLPVLCQAHG. Em outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwxyzHG, em que “v” é D ou E, “w” é S ou N, “x” é N, H ou I, “y” é selecionado de: D, A, I, N, H, K, S, e G, e “z” é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQDHG, GGKQALETVQRLLPVLCQAHG, GGKQALETVQRLLPVLCQDHG ou GGKQALETVQRLLPVLCQAHG. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwxyzHG, em que “v” é D ou E, “w” é S ou N, “x” é qualquer aminoácido diferente de N, H e I, “y” é qualquer

aminoácido ou nenhum aminoácido, e “z” é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQDHG, GGKQALETVQRLLPVLCQAHG, GKQALETVQRLLPVLCQDHG ou GKQALETVQRLLPVLCQAHG. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwIyzHG, em que “v” é D ou E, “w” é S ou N, “y” é qualquer aminoácido diferente de G, e “z” é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQDHG, GGKQALETVQRLLPVLCQAHG, GKQALETVQRLLPVLCQDHG ou GKQALETVQRLLPVLCQAHG. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwIAzHG, em que “v” é D ou E, “w” é S ou N, e “z” é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQDHG, GGKQALETVQRLLPVLCQAHG, GKQALETVQRLLPVLCQDHG ou GKQALETVQRLLPVLCQAHG. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwxyzHG, em que “v” é D ou E, “w” é S ou N, “x” é S, T ou Q, “y” é qualquer aminoácido ou nenhuma aminoácido, e “z” é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQDHG, GGKQALETVQRLLPVLCQAHG, GKQALETVQRLLPVLCQDHG ou GKQALETVQRLLPVLCQAHG. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwxyzHG, em que “v” é D ou E, “w” é S ou N, “x” é S, T ou Q, “y” é selecionado de: D, A, I, N, H, K, S, e G, e “z” é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQDHG, GGKQALETVQRLLPVLCQAHG, GKQALETVQRLLPVLCQDHG ou GKQALETVQRLLPVLCQAHG. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwx, em que “v” é D ou E, “w” é S ou N, e “x” é S, T ou Q. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwxy, em que “v” é D ou E, “w” é S ou N, “x” é S, T ou Q, e “y” é selecionado de: D, A, I, N, H, K, S, e G. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição

compreende: LTPvQVVAIAwxyzGHGG, em que “v” é Q, D ou E, “w” é S ou N, “x” é N, H ou I, “y” é qualquer aminoácido ou nenhum aminoácido, e “z” é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQD, GGKQALETVQRLLPVLCQA, GKQALETVQRLLPVLCQD ou GKQALETVQRLLPVLCQA. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwxyzGHGG, em que “v” é Q, D ou E, “w” é S ou N, “x” é N, H ou I, “y” é selecionado de: D, A, I, N, H, K, S, e G, e “z” é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQD, GGKQALETVQRLLPVLCQA, GKQALETVQRLLPVLCQD ou GKQALETVQRLLPVLCQA. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwxyzGHGG, em que “v” é Q, D ou E, “w” é S ou N, “x” é qualquer aminoácido diferente de N, H e I, “y” é qualquer aminoácido ou nenhum aminoácido, e “z” é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQD, GGKQALETVQRLLPVLCQA, GKQALETVQRLLPVLCQD ou GKQALETVQRLLPVLCQA. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwIyzGHGG, em que “v” é Q, D ou E, “w” é S ou N, “y” é qualquer aminoácido diferente de G, e “z” é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQD, GGKQALETVQRLLPVLCQA, GKQALETVQRLLPVLCQD ou GKQALETVQRLLPVLCQA. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwIAzGHGG, em que “v” é Q, D ou E, “w” é S ou N, e “z” é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQD, GGKQALETVQRLLPVLCQA, GKQALETVQRLLPVLCQD ou GKQALETVQRLLPVLCQA. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwxyzGHGG, em que “v” é Q, D ou E, “w” é S ou N, “x” é S, T ou Q, “y” é qualquer aminoácido ou nenhum aminoácido, e “z” é GGRPALE, GGKQALE,

GGKQALETVQRLLPVLCQD, GGKQALETVQRLLPVLCQA, GKQALETVQRLLPVLCQD ou GKQALETVQRLLPVLCQA. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwxyzGHGG, em que "v" é Q, D ou E, "w" é S ou N, "x" é S, T ou Q, "y" é selecionado de: D, A, I, N, H, K, S, e G, e "z" é GGRPALE, GGKQALE, GGKQALETVQRLLPVLCQD, GGKQALETVQRLLPVLCQA, GKQALETVQRLLPVLCQD ou GKQALETVQRLLPVLCQA. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwx, em que "v" é Q, D ou E, "w" é S ou N, e "x" é S, T ou Q. Em ainda outra modalidade, a sequência de repetição compreende: LTPvQVVAIAwxy, em que "v" é Q, D ou E, "w" é S ou N, "x" é S, T ou Q, e "y" é selecionado de: D, A, I, N, H, K, S, e G.

[0106] Determinados fragmentos de um domínio de clivagem de endonuclease, incluindo os fragmentos que são truncados nos terminais N, fragmentos que são truncados nos terminais C, fragmentos que têm deleções internas, e fragmentos que combinam terminais N, terminais C, e/ou deleções internas, podem manter parte ou toda a atividade catalítica do domínio de clivagem de endonuclease completo. A determinação de se um fragmento pode manter parte ou toda a atividade catalítica do domínio completo pode ser realizada, por exemplo, sintetizando uma proteína de edição gênica que contém o fragmento de acordo com os métodos da presente invenção, induzindo a células a expressarem a proteína de edição gênica de acordo com os métodos da presente invenção, e medindo a eficiência da edição gênica. Desta forma, uma medida da eficiência de edição gênica pode ser usada para determinar se qualquer fragmento específico pode manter parte ou toda a atividade catalítica do domínio

de clivagem de endonuclease completo. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a um fragmento biologicamente ativo de um domínio de clivagem de endonuclease. Em uma modalidade, o domínio de clivagem de endonuclease é selecionado de: FokI, StsI, StsI-HA, StsI-HA2, StsI-UHA, StsI-UHA2, StsI-HF, e StsI-UHF ou uma variante natural ou projetada ou um fragmento biologicamente ativo da mesma.

[0107] Determinados fragmentos de um domínio de ligação de DNA ou sequência de repetição, incluindo os fragmentos que são truncados nos terminais N, fragmentos que são truncados nos terminais C, fragmentos que têm deleções internas, e fragmentos que combinam terminais N, terminais C, e/ou deleções internas, podem manter parte ou toda a atividade de ligação do domínio de ligação de DNA ou sequência de repetição. Exemplos de fragmentos de domínios de ligação de DNA ou sequências de repetição que podem manter parte ou toda a atividade de ligação da sequência de repetição completa incluem proteínas semelhantes a TALE (RTLS) de *Ralstonia solanacearum*. A determinação de se um fragmento pode manter parte ou toda a atividade de ligação do domínio de ligação de DNA completo ou sequência de repetição pode ser realizada, por exemplo, sintetizando uma proteína de edição gênica que contém o fragmento de acordo com os métodos da presente invenção, induzindo as células a expressarem a proteína de edição gênica de acordo com os métodos da presente invenção, e medindo a eficiência da edição gênica. Desta forma, uma medida da eficiência de edição gênica pode ser usada para determinar se qualquer fragmento específico pode manter parte ou toda a atividade

de ligação do domínio de ligação de DNA ou sequência de repetição. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a um fragmento biologicamente ativo de um domínio de ligação de DNA ou sequência de repetição. Em uma modalidade, o fragmento permite o reconhecimento de alta especificidade de um sítio de ligação numa molécula de DNA alvo. Em outra modalidade, o fragmento compreende uma sequência que codifica uma proteína semelhante a TALE de *Ralstonia solanacearum* ou um fragmento biologicamente ativo da mesma.

[0108] Determinadas modalidades são direcionadas a uma composição para alterar a sequência de DNA de uma célula compreendendo um ácido nucleico, em que o ácido nucleico codifica uma proteína de edição gênica. Outras modalidades são direcionadas a uma composição para alterar a sequência de DNA de uma célula compreendendo uma mistura de ácido nucleico, em que a mistura de ácido nucleico compreende: um primeiro ácido nucleico que codifica uma primeira proteína de edição gênica, e um segundo ácido nucleico que codifica uma segunda proteína de edição gênica. Em uma modalidade, o sítio de ligação da primeira proteína de edição gênica e o sítio de ligação da segunda proteína de edição gênica estão presentes na mesma molécula de DNA alvo. Em outra modalidade, o sítio de ligação da primeira proteína de edição gênica e o sítio de ligação da segunda proteína de edição gênica são separados por menos de cerca de 50 bases, ou menos de cerca de 40 bases, ou menos de cerca de 30 bases ou menos de cerca de 20 bases, ou menos de cerca de 10 bases, ou entre cerca de 10 bases e cerca de 25 bases ou cerca de 15 bases. Em uma modalidade, o domínio

de nuclease da primeira proteína de edição gênica e o domínio de nuclease da segunda proteína de edição gênica são capazes de formar um dímero. Em outra modalidade, o dímero é capaz de gerar um corte ou uma ruptura de fita dupla numa molécula de DNA alvo. Em uma modalidade, a composição é uma composição terapêutica. Em outra modalidade, a composição compreende um modelo de reparo. Em outra modalidade, o modelo de reparo é uma molécula de DNA de fita única ou uma molécula de DNA de fita dupla.

[0109] Outras modalidades são direcionadas a um artigo de manufatura para sintetizar uma proteína ou um ácido nucleico que codifica uma proteína. Em uma modalidade, o artigo é um ácido nucleico. Em outra modalidade, a proteína compreende um domínio de ligação de DNA. Em outra modalidade, o ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica que codifica um domínio de ligação de DNA. Em uma modalidade, a proteína compreende um domínio de nuclease. Em outra modalidade, o ácido nucleico compreende uma sequência nucleotídica que codifica um domínio de nuclease. Em uma modalidade, a proteína compreende uma pluralidade de sequências de repetição: Em outra modalidade, o ácido nucleico codifica uma pluralidade de sequências de repetição. Em outra modalidade, o domínio de nuclease é selecionado de: FokI, StsI, StsI-HA, StsI-HA2, StsI-UHA, StsI-UHA2, StsI-HF, e StsI-UHF ou uma variante natural ou projetada ou um fragmento biologicamente ativo da mesma. Em uma modalidade, o ácido nucleico compreende um promotor de RNA-polimerase. Em outra modalidade, o promotor da RNA-polimerase é um promotor T7 ou um promotor SP6. Em outra modalidade, o ácido nucleico compreende um promotor viral.

Em uma modalidade, o ácido nucleico compreende uma região não traduzida. Em outra modalidade, o ácido nucleico é um modelo de transcrição *in vitro*.

[0110] Determinadas modalidades são direcionadas a um método para incluir uma célula para expressar uma proteína. Outras modalidades são direcionadas a um método para alterar a sequência de DNA de uma célula compreendendo a transfecção da célula com uma proteína de edição gênica ou a indução da célula a expressar uma proteína de edição gênica. Ainda outras modalidades são direcionadas a um método para reduzir a expressão de uma proteína de interesse numa célula. Em uma modalidade, a célula é induzida para expressar uma proteína de edição gênica, em que a proteína de edição gênica é capaz de criar um corte ou uma ruptura de fita dupla numa molécula de DNA alvo. Em outra modalidade, o corte ou ruptura de fita dupla resulta na inativação de um gene. Ainda outras modalidades são direcionadas a um método para gerar uma forma inativa, de atividade reduzida ou negativa dominante de uma proteína. Em uma modalidade, a proteína é a survivina. Ainda outras modalidades são direcionadas a um método para reparar uma ou mais mutações numa célula. Em uma modalidade, a célula é posta em contato com um modelo de reparo. Em outra modalidade, o modelo de reparo é uma molécula de DNA. Em outra modalidade, o modelo de reparo não contém um sítio de ligação da proteína de edição gênica. Em ainda outra modalidade, o modelo de reparo codifica uma sequência de aminoácidos que é codificada por uma sequência de DNA que compreende um sítio de ligação da proteína de edição gênica.

[0111] Outras modalidades são direcionadas a um

método para tratar um paciente compreendendo a administração ao paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma proteína ou um ácido nucleico que codifica uma proteína. Em uma modalidade, o tratamento resulta na melhora de um mais mais sintomas do paciente. Determinadas modalidades são direcionadas a um método para tratar um paciente compreendendo: a. remoção de uma célula do paciente, b. indução da célula para expressar uma proteína de edição gênica pela transfecção da célula com um ácido nucleico que codifica uma proteína de edição gênica, c. reprogramação da célula, e e. introdução da célula no paciente. Em uma modalidade, a célula é reprogramada para um estado menos diferenciado. Em outra modalidade, a célula é reprogramada pela transfecção da célula com uma ou mais moléculas de RNA sintéticas que codificam uma ou mais proteínas de reprogramação. Em outra modalidade, a célula é diferenciada. Em ainda outra modalidade, a célula é diferenciada em uma de: uma célula da pele, uma célula produtora de insulina responsiva à glicose, uma célula hematopoiética, uma célula cardíaca, uma célula retinal, uma célula renal, uma célula neural, uma célula do estroma, uma célula de gordura, uma célula óssea, uma célula muscular, um oócito, e um espermatozoide. Outras modalidades são direcionadas a um método para tratar um paciente compreendendo: a. remoção de uma célula hematopoiética ou uma célula-tronco do paciente, b. indução da célula para expressar uma proteína de edição gênica pela transfecção da célula com um ácido nucleico que codifica uma proteína de edição gênica, e c. introdução da célula no paciente.

[0112] Foi descoberto agora que um meio de cultura celular consistido essencialmente em ou compreendendo: DMEM/F12, ácido ascórbico, insulina, transferrina, selenito de sódio, etanolamina, fator de crescimento de fibroblasto básico, e fator de crescimento transformante beta são suficientes para suprir as células-tronco pluripotentes, incluindo células-tronco pluripotentes humanas, *in vitro*. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a um meio de cultura de células consistindo essencialmente em ou compreendendo: DMEM/F12, ácido ascórbico, insulina, transferrina, selenito de sódio, etanolamina, fator de crescimento de fibroblasto básico, e fator de crescimento transformante beta. Em uma modalidade, o ácido ascórbico está presente em cerca de 50 µg/mL. Em outra modalidade, a insulina está presente em cerca de 10 µg/mL. Em outra modalidade, a transferrina está presente em cerca de 5,5 µg/mL. Em ainda outra modalidade, o selenito de sódio está presente em cerca de 6,7 ng/mL. Em ainda outra modalidade, a etanolamina está presente em cerca de 2 µg/mL. Em ainda outra modalidade, o fator de crescimento de fibroblasto básico está presente em cerca de 20 ng/mL. Em ainda outra modalidade, o fator de crescimento transformante beta está presente em cerca de 2 ng/mL. Em uma modalidade, o ácido ascórbico é o ácido ascórbico-2-fosfato. Em outra modalidade, o fator de crescimento transformante beta é o fator de crescimento transformante beta 1 ou fator de crescimento transformante beta 3. Em uma modalidade, o meio de cultura celular é usado para a cultura das células-tronco pluripotentes. Em outra modalidade, as células-tronco pluripotentes são células-tronco pluripotentes

humanas. Em outra modalidade, o meio de cultura celular é usado para a cultura de células durante ou após a reprogramação. Em uma modalidade, o meio de cultura celular não contém nenhum componente derivado de animal. Em outra modalidade, o meio de cultura celular é fabricado de acordo com um padrão de fabricação. Em outra modalidade, o padrão de fabricação é GMP. Em uma modalidade, as células são postas em contato com uma molécula de adesão celular. Em outra modalidade, a molécula de adesão celular é selecionada de: fibronectina e vitronectina ou um fragmento biologicamente ativo das mesmas. Em outra modalidade, as células são postas em contato com a fibronectina e vitronectina. Em ainda outra modalidade, a molécula de adesão celular é recombinante.

[0113] Em determinadas situações, por exemplo, ao produzir um produto terapêutico, pode ser benéfico substituir os componentes derivados de animal por componentes não derivados de animal, em parte para reduzir o risco de contaminação com vírus e/ou outros patógenos transmitidos por animais. Foi descoberto agora que o colesterol sintético, incluindo o colesterol derivado de vegetal semissintético, pode ser substituído pelo colesterol derivado de animal no meio de transfecção sem diminuir a eficiência da transfecção ou aumentar a toxicidade associada à transfecção. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a um meio de transfecção contendo colesterol sintético ou semissintético. Em uma modalidade, o colesterol semissintético é derivado de vegetal. Em outra modalidade, o meio de transfecção não contém colesterol derivado de animal. Em outra modalidade,

o meio de transfecção é um meio de reprogramação. Outras modalidades são direcionadas a um meio de complexação. Em uma modalidade, o meio de complexação tem um pH maior que cerca de 7, ou maior que cerca de 7,2, ou maior que cerca de 7,4, ou maior que cerca de 7,6, ou maior que cerca de 7,8, ou maior que cerca de 8,0, ou maior que cerca de 8,2, ou maior que cerca de 8,4, ou maior que cerca de 8,6, ou maior que cerca de 8,8, ou maior que cerca de 9,0. Em outra modalidades, o meio de complexação compreende a transferrina. Em outra modalidade, o meio de complexação compreende DMEM. Em ainda outra modalidade, o meio de complexação compreende DMEM/F12. Ainda outras modalidades são direcionadas a um método para formar complexos de ácido nucleico-transfecção-reagente. Em uma modalidade, o reagente de transfecção é incubado com um meio de complexação. Em outra modalidade, a incubação ocorre antes de uma etapa de mistura. Em outra modalidade, a etapa de incubação é entre cerca de 5 segundos e cerca de 5 minutos ou entre cerca de 10 segundos e cerca de 2 minutos ou entre cerca de 15 segundos e cerca de 1 minuto ou entre cerca de 30 segundos e cerca de 45 segundos. Em uma modalidade, o reagente de transfecção é selecionado da Tabela 1. Em outra modalidade, o reagente de transfecção é um lipídio ou lipidoide. Em outra modalidade, o reagente de transfecção compreende um cátion. Em ainda outra modalidade, o cátion é um cátion multivalente. Em ainda outra modalidade, o reagente de transfecção é N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropil)amino]-4-[di(3-amino-propil)amino]butilcarboxamido)etil]-3,4-di[oleiloxi]-benzamida (também conhecida como MVL5) ou um derivado da

mesma.

[0114] Determinadas modalidades são direcionadas a um método para induzir uma célula a expressar uma proteína pelo contato da célula com um ácido nucleico. Em uma modalidade, a célula é uma célula de mamífero. Em outra modalidade, a célula é uma célula humana ou uma célula de roedor. Outras modalidades são direcionadas a uma célula produzida usando um ou mais dos métodos da presente invenção. Em uma modalidade, a célula está presente em um paciente. Em outra modalidade, a célula é isolada de um paciente. Outras modalidades são direcionadas a uma biblioteca de triagem que compreende uma célula produzida usando um ou mais dos métodos da presente invenção. Em uma modalidade, a biblioteca de triagem é usada para pelo menos um de: triagem de toxicidade, incluindo: triagem de cardiotoxicidade, triagem de neurotoxicidade, e triagem de hepatotoxicidade, triagem de eficácia, triagem de alto rendimento, triagem de alto conteúdo, e outras triagens.

[0115] Outras modalidades são direcionadas a um kit contendo um ácido nucleico. Em uma modalidades, o kit contém um reagente de distribuição (também conhecido como “reagente de transfecção”). Em outra modalidade, o kit é um kit de reprogramação. Em outra modalidade, o kit é um kit de edição gênica. Outras modalidades são direcionadas a um kit para produção de ácidos nucleicos. Em uma modalidade, o kit contém pelo menos dois de: pseudouridina-trifosfato, 5-metiluridina trifosfato, 5-metilcitidina trifosfato, 5-hidroximetilcitidina trifosfato, N4-metilcitidina trifosfato, N4-acetilcitidina trifosfato, e 7-deazaguanosina trifosfato ou um ou mais derivados dos

mesmos. Outras modalidades estão direcionadas a um produto terapêutico que compreende um ácido nucleico. Em uma modalidade, o produto terapêutico é uma composição farmacêutica. Em outra modalidade, a composição farmacêutica é formulada. Em outra modalidade, a formulação compreende uma suspensão aquosa de lipossomos. Exemplos de componentes de lipossomo estão estabelecidos na Tabela 1, e são dados à título de exemplo, e não à título de limitação. Em uma modalidade, os lipossomos incluem uma ou mais cadeias de polietileno glicol (PEG). Em outra modalidade, o PEG é PEG2000. Em outra modalidade, os lipossomos incluem 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) ou um derivado da mesma. Em uma modalidade, o produto terapêutico compreende um ou mais ligantes. Em outra modalidade, o produto terapêutico compreende pelo menos um de: androgênio, CD30 (TNFRSF8), um peptídeo penetrante de célula, CXCR, estrogênio, fator de crescimento epidérmico, EGFR, HER2, folato, insulina, fator de crescimento semelhante a insulina I, interleucina-13, integrina, progesterona, fator 1 derivado do estroma, trombina, vitamina D, e transferrina ou um fragmento biologicamente ativo ou variante dos mesmos. Ainda outras modalidades são direcionadas a um produto terapêutico que compreende uma célula gerada usando um ou mais dos métodos da presente invenção. Em uma modalidade, o produto terapêutico é administrado a um paciente para o tratamento de pelo menos um de: diabetes tipo 1, doença cardíaca, incluindo cardiomiopatia isquêmica e dilatada, degeneração macular, doença de Parkinson, fibrose cística, anemia falciforme, talassemia, anemia de Fanconi, imunodeficiência combinada grave, neuropatia sensorial

hereditária, xeroderma pigmentoso, doença de Huntington, distrofia muscular, esclerose lateral amiotrófica, mal de Alzheimer, câncer, e doenças infecciosas incluindo: hepatite e HIV/AIDS.

Tabela 1. Lipídios Biocompatíveis Exemplares

1	3 β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-Colesterol)
2	1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP / 18:1 TAP)
3	N-(4-carboxibenzil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)propan-1-amínio (DOBAQ)
4	1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio-propano (14:0 TAP)
5	1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (16:0 TAP)
6	1,2-estearoil-3-trimetilamonio-propano (18:0 TAP)
7	1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP / 18:1 DAP)
8	1,2-dimiristoil-3-dimetilamonio-propano (14:0 DAP)
9	1,2-dipalmitoil-3-dimetilamonio-propano (16:0 DAP)
10	1,2-diestearoil-3-dimetilamonio-propano (18:0 DAP)
11	dimetildioctadecilamônio (18:0 DDAB)
12	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (12:0 EtilPC)
13	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (14:0 EtilPC)
14	1,2-dimiristoleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (14:1 EtilPC)
15	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (16:0 EtilPC)
16	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (18:0 EtilPC)
17	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (18:1 EtilPC)

18	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (16:1-18:1 EtilPC)
19	1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA)
20	N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropil)amino]-4-[di(3-amino-propil)amino]butilcarboxamido)etil]-3,4-di[oleiloxi]-benzamida (MVL5)
21	Trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2-espermina carboxamida]etil-N,N-dimetil-1-propanamonio (DOSPA)
22	1,3-di-oleiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER)
23	Brometo de N-[1-(2,3-dimiristiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)amonio (DMRIE)
24	dioctadecil amidogliceril espermina (DOGS)
25	dioleoil fosfatidil etanolamina (DOPE)

[0116] Determinadas modalidades são direcionadas a um ácido nucleico que compreende uma estrutura de revestimento em 5' selecionada de Cap 0, Cap 1, Cap 2, e Cap 3 ou um derivado das mesmas. Em uma modalidade, o ácido nucleico compreende uma ou mais UTRs. Em outra modalidade, a uma ou mais UTRs aumentam a estabilidade do ácido nucleico. Em outra modalidade, a uma ou mais UTRs compreendem uma 5'-UTR de alfa-globina ou beta-globina. Em ainda outra modalidade, a uma ou mais UTRs compreendem uma 3'-UTR de alfa-globina ou beta-globina. Em ainda outra modalidade, a molécula de RNA sintética compreende uma 5'-UTR de alfa-globina ou beta-globina e uma 3'-UTR de alfa-globina ou beta-globina. Em uma modalidade, a 5'-UTR compreende uma sequência de Kozak que é substancialmente semelhante à sequência consenso de Kozak. Em outra modalidade, o ácido nucleico compreende uma cauda 3'-

poli(A). Em outra modalidade, a cauda 3'-poli(A) tem entre cerca de 20nt e cerca de 250nt ou entre cerca de 120nt e cerca de 150nt de comprimento. Em outra modalidade, a cauda 3'-poli(A) tem cerca de 20nt, ou cerca de 30nt, ou cerca de 40nt, ou cerca de 50nt, ou cerca de 60nt, ou cerca de 70nt, ou cerca de 80nt, ou cerca de 90nt, ou cerca de 100nt, ou cerca de 110nt, ou cerca de 120nt, ou cerca de 130nt, ou cerca de 140nt, ou cerca de 150nt, ou cerca de 160nt, ou cerca de 170nt, ou cerca de 180nt, ou cerca de 190nt, ou cerca de 200nt, ou cerca de 210nt, ou cerca de 220nt, ou cerca de 230nt, ou cerca de 240nt, ou cerca de 250nt de comprimento.

[0117] Outras modalidades são direcionadas a um método para reprogramar uma célula. Em uma modalidade, a célula é reprogramada pelo contato da célula com um ou mais ácidos nucleicos. Em uma modalidade, a célula é posta em contato com uma pluralidade de ácidos nucleicos que codificam pelo menos um de: proteína Oct4, proteína Sox2, proteína Klf4, proteína c-Myc, proteína Lin28 ou um fragmento biologicamente ativo, variante ou derivado das mesmas. Em outra modalidade, a célula é posta em contato com uma pluralidade de ácidos nucleicos que codificam uma pluralidade de proteínas, incluindo: proteína Oct4, proteína Sox2, proteína Klf4, e proteína c-Myc ou um ou mais fragmentos biologicamente ativos, variantes ou derivados das mesmas. Ainda outras modalidades são direcionadas a um método para edição gênica de uma célula. Em uma modalidade, a célula é editada geneticamente pelo contato da célula com um ou mais ácidos nucleicos.

[0118] Modelos animais são rotineiramente usados

para estudar os efeitos dos processos biológicos. Em determinadas situações, por exemplo, ao estudar uma doença humana, um modelo animal contendo um genoma modificado pode ser benéfico, em parte porque esse modelo animal pode imitar mais estreitamente o fenótipo da doença humana. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a um método para criar um organismo contendo uma ou mais modificações genéticas (também conhecidas como "mutações", também conhecidas como "edições gênicas"). Em uma modalidade, uma ou mais modificações genéticas são geradas pela transfecção de uma célula com um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais proteínas de edição gênica. Em outra modalidade, um ou mais ácidos nucleicos incluem uma molécula de RNA sintética. Em uma modalidade, uma ou mais proteínas de edição gênica incluem pelo menos uma de: uma dedo de zinco nuclease, uma TALEN, uma proteína associada de repetição palindrômica curta regularmente interespaçada e agrupada (CRISPR), uma nuclease, uma meganuclease, e uma nickase ou um fragmento biologicamente ativo ou variante das mesmas. Em uma modalidade, a célula é uma célula pluripotente. Em outra modalidade, a célula é uma célula-tronco embrionária. Em outra modalidade, a célula é um embrião. Em ainda outra modalidade, a célula é um membro de: uma célula animal, uma célula vegetal, uma célula de levedura e uma célula bacteriana. Em uma modalidade, a célula é uma célula de roedor. Em outra modalidade, a célula é uma célula humana. Em determinadas modalidades, a célula é transfectada com um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais proteínas de edição gênica e um ou mais ácidos nucleicos que codificam um ou

mais modelos de reparo. Em uma modalidade, a célula é introduzida em um blastocisto. Em outra modalidade, a célula é introduzida em uma fêmea pseudográvida. Em outra modalidade, é determinada a presença ou ausência da modificação genética na descendência. Em ainda outra modalidade, a determinação é por sequenciamento direto. Em uma modalidade, o organismo são aminsais de criação, por exemplo, um porco, uma vaca, etc. Em outra modalidade, o organismo é um animal doméstico, por exemplo, um cão, um gato, um peixe, etc.

[0119] Em determinadas situações, por exemplo, ao modificar o genoma de uma célula alvo pela adição de uma sequência de ácido nucleico, pode ser vantajoso inserir a sequência de ácido nucleico em uma localização segura, em parte, para reduzir os riscos associados à inserção aleatória. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a um método para inserir uma sequência de ácido nucleico numa localização segura. Em uma modalidade, a célula é uma célula humana e a localização segura é o locus AAVS1. Em outra modalidade, a célula é uma célula de roedor e a localização segura é o locus Rosa26. Em uma modalidade, a célula é posta em contato ainda com um ou mais ácidos nucleicos que codificam um ou mais modelos de reparo. Outras modalidades são direcionadas a um kit para alterar a sequência de DNA de uma célula. Em uma modalidade, a célula é uma célula humana, e a molécula de DNA alvo compreende uma sequência nucleotídica que codifica o locus AAVS1. Em outra modalidade, a célula é uma célula de roedor, e a molécula de DNA alvo compreende uma sequência nucleotídica que codifica o locus Rosa26. Outras

modalidades são direcionadas a um método para gerar uma célula repórter pelo contato da célula com um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais proteínas de edição gênica e um ou mais ácidos nucleicos que codificam um ou mais modelos de reparo. Em uma modalidade, um ou mais modelos de reparo compreendem o DNA. Em outra modalidade, um ou mais modelos de reparo codificam uma ou mais proteínas fluorescentes. Em outra modalidade, um ou mais modelos de reparo codificam pelo menos parte da região promotora de um gene.

[0120] Em determinadas situações, por exemplo, ao gerar uma biblioteca de células editadas geneticamente, pode ser benéfico aumentar a eficiência da edição gênica, em parte, para reduzir o custo de caracterização celular. Foi descoberto agora que a eficiência da edição gênica pode ser aumentada, pelo contato repetido de uma célula com o RNA sintético que codifica uma ou mais proteínas de edição gênica. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a um método para a edição gênica de uma célula pelo contato repetido da célula com ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais proteínas de edição gênica. Em uma modalidade, a célula é posta em contato pelo menos duas vezes durante cinco dias consecutivos. Em outra modalidade, a célula é posta em contato duas vezes em um intervalo de entre cerca de 24 horas e cerca de 48 horas.

[0121] No câncer, a sobrevivência e a proliferação de células malignas podem ser devida, em parte, à presença de anormalidades genéticas específicas que não estão geralmente presentes no paciente. Foi descoberto agora que as proteínas de edição gênica podem ser usadas para alvejar

as vias associadas à sobrevivência e à proliferação, e que, quando usadas desta forma, as proteínas de edição gênica e os ácidos nucleicos que codificam proteínas de edição gênica podem constituir potentes produtos terapêuticos anticâncer. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a uma terapêutica anticâncer. Em uma modalidade, o produto terapêutico é uma composição terapêutica que inibe a sobrevivência e/ou previne, diminui ou limita de outra forma a proliferação de uma célula. Em outra modalidade, a célula é uma célula de câncer. Em outra modalidade, o produto terapêutico compreende uma ou mais proteínas de edição gênica ou um ácido nucleico que codifica uma ou mais proteínas de edição gênica. Em ainda outra modalidade, uma ou mais proteínas de edição gênica se direcionam a uma ou mais sequências que promovem a sobrevivência e/ou a proliferação da célula. Essas sequências incluem, mas não estão limitadas a: genes relacionados à apoptose, incluindo genes da família de inibidor da apoptose (IAP) (*ver, por exemplo*, Tabela 2 e Tabela 2 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/721.302, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência), tais como BIRC5, sequências associadas à manutenção do telômero, tais como o gene da telomerase reversa transcriptase (TERT) e o componente de RNA da telomerase (TERC), sequências que afetam a angiogênese, tais como o gene de VEGF, e outros genes associados a câncer, incluindo: BRAF, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, CTNNB1, EGFR, a família MYC, a família RAS, PIK3CA, PIK3R1, PKN3, TP53, PTEN, RET, SMAD4, KIT, MET, APC, RB1, a família VEGF, TNF, e genes da família da ribonucleotídeo redutase. Exemplos de sequências alvo de proteína de edição

gênica para BIRC5 estão estabelecidos na Tabela 3 e na Tabela 3 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/721.302, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, e são dados à título de exemplo, e não à título de limitação. Em uma modalidade, pelo menos uma das uma ou mais sequências está presente em células malignas e não malignas. Em outra modalidade, pelo menos uma das uma ou mais sequências é enriquecida em células malignas. Em outra modalidade, pelo menos uma das uma ou mais sequências é enriquecida em células não malignas. Em uma modalidade, a composição terapêutica compreende ainda um ácido nucleico que codifica um ou mais modelos de reparo. Em outra modalidade, uma ou mais proteínas de edição gênica induzem as células a expressarem uma forma inativa ou dominante negativa de uma proteína. Em outra modalidade, a proteína é um membro da família IAP. Em ainda outra modalidade, a proteína é a survivina.

Tabela 2. Inibidor Exemplar de Genes de Apoptose (IAP)

Nome	Comprimento/aa	Domínios BIR	Domínio CARD	Domínio RING
BIRC1 (proteína inibitória de apoptose neuronal)	1.403	3	N	N
BIRC2 (proteína c-IAP1)	604	3	Y	Y
BIRC3 (proteína c-IAP2)	618	3	Y	Y
BIRC4 (IAP ligada ao X)	497	3	N	Y

BIRC5 (proteína survivina)	142	1	N	N
BIRC6 (proteína BRUCE/apollon)	4845	1	N	N
BIRC7 (proteína livina)	298	1	N	Y
ILP2 (homólogo de BIRC4 específico para tecido)	236	1	N	Y

Tabela 3. Sequências Alvo de Proteína de Edição Gênica Exemplares para BIRC5

Alvo	Esquerdo	Direito
UTR	TAAGAGGGCGTGCGCTCCCG	TCAAATCTGGCGGTTAATGG
Códon de início	TTGGCAGAGGTGGCGGCGGC	TGCCAGGCAGGGGGCAACGT
Éxon 1	TTGCCCCCTGCCTGGCAGCC	TTCTTGAATGTAGAGATGCG
Éxon 2	TCCACTGCCCCACTGAGAAC	TCCTTGAAGCAGAAGAAACA
Éxon 4	TAAAAAGCATTTCGTCCGGTT	TTCTTCAAAGTCTTCTTGA
Éxon 5	TTGAGGAAACTGCGGAGAAA	TCCATGGCAGCCAGCTGCTC

[0122] Outras modalidades são direcionadas a um método para tratar câncer compreendendo a administração a um paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de edição gênica ou de um ácido nucleico que codifica uma ou mais proteínas de edição gênica. Em uma modalidade, o tratamento resulta na redução ou interrupção do crescimento de células de câncer no paciente. Em outra modalidade, o tratamento resulta na progressão retardada ou na remissão do câncer. Em uma modalidade, a molécula de DNA alvo compreende o gene de BIRC5. Em outra modalidade, a molécula de DNA alvo compreende uma sequência selecionada

de: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, e SEQ ID NO: 15. Em outra modalidade, uma pluralidade de sítios de ligação adjacentes são pelo menos cerca de 50% ou pelo menos cerca de 60% ou pelo menos cerca de 70% ou pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 90% ou pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% homólogos a uma ou mais sequências listadas na Tabela 3, Tabela 4, Tabela 3 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/721.302, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, Tabela 1 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/785.404, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, ou Tabela 1 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/842.874, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência. Em determinadas situações, uma proteína de edição gênica com um domínio N-terminal truncado pode ser usada para eliminar a restrição de primeira base T na sequência do sítio de ligação. Em algumas modalidades, o câncer é o glioma. Em uma modalidade, o paciente foi anteriormente submetido a cirurgia e/ou radioterapia e/ou atualmente passa por cirurgia e/ou radioterapia. Em outra modalidade, a administração é por uma ou mais de: injeção intratecal, injeção intracraniana, injeção intravenosa, perfusão, injeção subcutânea, injeção intraperitoneal, injeção intraportal, e distribuição tópica.

Tabela 4. Sítios de Ligação de BIRC5 Exemplares

Gene	#	Esquerdo	Direito	Espaçamento
BIRC5	1	TGGGTGCCCCGACGTTGCCC	TGCGGTGGTCCTTGAGAAAG	14
BIRC5	2	TGGGTGCCCCGACGTTGCCC	TAGAGATGCGGTGGTCCTTG	20
BIRC5	3	TGCCCCGACGTTGCCCCCTG	TAGAGATGCGGTGGTCCTTG	16
BIRC5	4	TGCCCCGACGTTGCCCCCTG	TGTAGAGATGCGGTGGTCCT	18

BIRC5	5	TCAAGGACCACCGCATCTCT	TGCAGGCGCAGCCCTCCAAG	20
BIRC5	6	TCTCTACATTCAAGAACTGG	TCACCCGCTCCGGGGTGCAG	20
BIRC5	7	TCTACATTCAAGAACTGGCC	TCACCCGCTCCGGGGTGCAG	18
BIRC5	8	TCTACATTCAAGAACTGGCC	TCTCACCCGCTCCGGGGTGC	20
BIRC5	9	TACATTCAAGAACTGGCCCT	TCACCCGCTCCGGGGTGCAG	16
BIRC5	10	TACATTCAAGAACTGGCCCT	TCTCACCCGCTCCGGGGTGC	18
BIRC5	11	TTCAAGAACTGGCCCTTCTT	TCTCACCCGCTCCGGGGTGC	14
BIRC5	1	TCCCTTGCAGATGGCCGAGG	TGGCTCGTTCTCAGTGGGGC	15
BIRC5	2	TCCCTTGCAGATGGCCGAGG	TCTGGCTCGTTCTCAGTGGG	17
BIRC5	3	TGGCCGAGGCTGGCTTCATC	TGGGCCAAGTCTGGCTCGTT	15
BIRC5	4	TCCACTGCCCCACTGAGAAC	TCCTTGAAGCAGAAGAAACA	18
BIRC5	5	TGCCCCACTGAGAACGAGCC	TCCAGCTCCTTGAAGCAGAA	19
BIRC5	6	TGCCCCACTGAGAACGAGCC	TTCCAGCTCCTTGAAGCAGA	20
BIRC5	7	TTGGCCCAGTGTTTCTTCTG	TCGTCATCTGGCTCCCAGCC	16
BIRC5	8	TGGCCCAGTGTTTCTTCTGC	TCGTCATCTGGCTCCCAGCC	15
BIRC5	9	TGGCCCAGTGTTTCTTCTGC	TGGGGTCGTCATCTGGCTCC	20
BIRC5	10	TGTTTCTTCTGCTTCAAGGA	TACATGGGGTCGTCATCTGG	16
BIRC5	11	TGTTTCTTCTGCTTCAAGGA	TTACATGGGGTCGTCATCTG	17
BIRC5	12	TTTCTTCTGCTTCAAGGAGC	TACATGGGGTCGTCATCTGG	14
BIRC5	13	TTTCTTCTGCTTCAAGGAGC	TTACATGGGGTCGTCATCTG	15
BIRC5	14	TTCTTCTGCTTCAAGGAGCT	TTACATGGGGTCGTCATCTG	14
BIRC5	1	TTTTCTAGAGAGGAACATAA	TGACAGAAAGGAAAGCGCAA	15
BIRC5	2	TTTTCTAGAGAGGAACATAA	TTGACAGAAAGGAAAGCGCA	16
BIRC5	3	TTTTCTAGAGAGGAACATAA	TCTTGACAGAAAGGAAAGCG	18
BIRC5	4	TAGAGAGGAACATAAAAAGC	TGCTTCTTGACAGAAAGGAA	17
BIRC5	5	TAAAAAGCATTTCGTCCGGTT	TCTTCAAACCTGCTTCTTGAC	14
BIRC5	6	TAAAAAGCATTTCGTCCGGTT	TTCTTCAAACCTGCTTCTTGA	15
BIRC5	7	TAAAAAGCATTTCGTCCGGTT	TAATTCTTCAAACCTGCTTCT	18
BIRC5	8	TAAAAAGCATTTCGTCCGGTT	TTAATTCTTCAAACCTGCTTC	19

BIRC5	9	TTCGTCCGGTTGCGCTTTCC	TCACCAAGGGTTAATTCTTC	20
BIRC5	10	TCGTCCGGTTGCGCTTTCCT	TCACCAAGGGTTAATTCTTC	19
BIRC5	11	TCGTCCGGTTGCGCTTTCCT	TTCACCAAGGGTTAATTCTT	20
BIRC5	12	TCCGGTTGCGCTTTCCTTTC	TCACCAAGGGTTAATTCTTC	16
BIRC5	13	TCCGGTTGCGCTTTCCTTTC	TTCACCAAGGGTTAATTCTT	17
BIRC5	14	TTGCGCTTTCCTTCTGTCA	TCAAAAATTCACCAAGGGT	19
BIRC5	15	TTGCGCTTTCCTTCTGTCA	TTCAAAAATTCACCAAGGGT	20
BIRC5	16	TGCGCTTTCCTTCTGTCAA	TCAAAAATTCACCAAGGGT	18
BIRC5	17	TGCGCTTTCCTTCTGTCAA	TTCAAAAATTCACCAAGGGT	19
BIRC5	18	TGCGCTTTCCTTCTGTCAA	TTTCAAAAATTCACCAAGGG	20
BIRC5	19	TTTCCTTCTGTCAAGAAGC	TTCAAAAATTCACCAAGGGT	14
BIRC5	20	TTTCCTTCTGTCAAGAAGC	TTTCAAAAATTCACCAAGGG	15
BIRC5	21	TTTCCTTCTGTCAAGAAGC	TCCAGTTTCAAAAATTCACC	20
BIRC5	22	TTTCCTTCTGTCAAGAAGCA	TTTCAAAAATTCACCAAGGG	14
BIRC5	23	TTTCCTTCTGTCAAGAAGCA	TCCAGTTTCAAAAATTCACC	19
BIRC5	24	TCCTTCTGTCAAGAAGCAG	TCCAGTTTCAAAAATTCACC	18
BIRC5	25	TCCTTCTGTCAAGAAGCAG	TGTCCAGTTTCAAAAATTCA	20
BIRC5	26	TTTCTGTCAAGAAGCAGTTT	TCCAGTTTCAAAAATTCACC	15
BIRC5	27	TTTCTGTCAAGAAGCAGTTT	TGTCCAGTTTCAAAAATTCA	17
BIRC5	28	TTTCTGTCAAGAAGCAGTTT	TCTGTCCAGTTTCAAAAATT	19
BIRC5	29	TTCTGTCAAGAAGCAGTTTG	TCCAGTTTCAAAAATTCACC	14
BIRC5	30	TTCTGTCAAGAAGCAGTTTG	TGTCCAGTTTCAAAAATTCA	16
BIRC5	31	TTCTGTCAAGAAGCAGTTTG	TCTGTCCAGTTTCAAAAATT	18
BIRC5	32	TTCTGTCAAGAAGCAGTTTG	TCTGTCCAGTTTCAAAAA	20
BIRC5	33	TCTGTCAAGAAGCAGTTTGA	TGTCCAGTTTCAAAAATTCA	15
BIRC5	34	TCTGTCAAGAAGCAGTTTGA	TCTGTCCAGTTTCAAAAATT	17
BIRC5	35	TCTGTCAAGAAGCAGTTTGA	TCTGTCCAGTTTCAAAAA	19
BIRC5	36	TCTGTCAAGAAGCAGTTTGA	TTCTGTCCAGTTTCAAAA	20
BIRC5	37	TGTCAAGAAGCAGTTTGAAG	TCTGTCCAGTTTCAAAAATT	15

BIRC5	38	TGTCAAGAAGCAGTTTGAAG	TCTCTGTCCAGTTTCAAAAA	17
BIRC5	39	TGTCAAGAAGCAGTTTGAAG	TTCTCTGTCCAGTTTCAAAA	18
BIRC5	40	TGTCAAGAAGCAGTTTGAAG	TTTCTCTGTCCAGTTTCAAA	19
BIRC5	41	TCAAGAAGCAGTTTGAAGAA	TCTCTGTCCAGTTTCAAAAA	15
BIRC5	42	TCAAGAAGCAGTTTGAAGAA	TTCTCTGTCCAGTTTCAAAA	16
BIRC5	43	TCAAGAAGCAGTTTGAAGAA	TTTCTCTGTCCAGTTTCAAA	17
BIRC5	44	TTTGAAGAATTAACCCTTG	TCTTGGCTCTTTCTCTGTCC	15
BIRC5	45	TTGAAGAATTAACCCTTGGT	TCTTGGCTCTTTCTCTGTCC	14
BIRC5	46	TTGAAGAATTAACCCTTGGT	TTCTTGGCTCTTTCTCTGTC	15
BIRC5	47	TGAAGAATTAACCCTTGGTG	TTCTTGGCTCTTTCTCTGTC	14
BIRC5	48	TGAAGAATTAACCCTTGGTG	TGTTCTTGGCTCTTTCTCTG	16
BIRC5	49	TTAACCCTTGGTGAATTTTT	TACAATTTTGTTCTTGGCTC	17
BIRC5	50	TAACCCTTGGTGAATTTTTG	TACAATTTTGTTCTTGGCTC	16
BIRC5	51	TAACCCTTGGTGAATTTTTG	TACATACAATTTTGTTCTTG	20
BIRC5	52	TTGGTGAATTTTTGAACTG	TACATACAATTTTGTTCTTG	14
BIRC5	1	TTATTTCCAGGCAAAGGAAA	TCCGCAGTTTCCTCAAATTC	17
BIRC5	2	TTATTTCCAGGCAAAGGAAA	TCTCCGCAGTTTCCTCAAAT	19
BIRC5	3	TTATTTCCAGGCAAAGGAAA	TTCTCCGCAGTTTCCTCAAA	20
BIRC5	4	TATTTCCAGGCAAAGGAAAC	TCCGCAGTTTCCTCAAATTC	16
BIRC5	5	TATTTCCAGGCAAAGGAAAC	TCTCCGCAGTTTCCTCAAAT	18
BIRC5	6	TATTTCCAGGCAAAGGAAAC	TTCTCCGCAGTTTCCTCAAA	19
BIRC5	7	TATTTCCAGGCAAAGGAAAC	TTTCTCCGCAGTTTCCTCAA	20
BIRC5	8	TCCAGGCAAAGGAAACCAAC	TCTCCGCAGTTTCCTCAAAT	14
BIRC5	9	TCCAGGCAAAGGAAACCAAC	TTCTCCGCAGTTTCCTCAAA	15
BIRC5	10	TCCAGGCAAAGGAAACCAAC	TTTCTCCGCAGTTTCCTCAA	16
BIRC5	11	TTTGAGGAACTGCGGAGAA	TCCATGGCAGCCAGCTGCTC	16
BIRC5	12	TTTGAGGAACTGCGGAGAA	TCAATCCATGGCAGCCAGCT	20
BIRC5	13	TTGAGGAACTGCGGAGAAA	TCCATGGCAGCCAGCTGCTC	15
BIRC5	14	TTGAGGAACTGCGGAGAAA	TCAATCCATGGCAGCCAGCT	19

BIRC5	15	TGAGGAAACTGCGGAGAAAG	TCCATGGCAGCCAGCTGCTC	14
BIRC5	16	TGAGGAAACTGCGGAGAAAG	TCAATCCATGGCAGCCAGCT	18

[0123] Determinadas modalidades são direcionadas a um método para tratar câncer que compreende: a. remoção de uma biópsia contendo uma ou mais células cancerosas de um paciente, b. determinação da sequência de um marcador genético associado a câncer na uma ou mais células cancerosas, e c. administração ao paciente de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma proteína de edição gênica ou de um ácido nucleico que codifica uma proteína de edição gênica, em que a sequência da molécula de DNA alvo é pelo menos cerca de 50% ou cerca de 60% ou cerca de 70% ou cerca de 80% ou cerca de 90% ou cerca de 95% ou cerca de 98%, ou cerca de 99% homóloga à sequência do marcador genético associado ao câncer. Em uma modalidade, o método compreende ainda a comparação da sequência de um ou mais marcadores genéticos associados ao câncer em uma ou mais células cancerosas à sequência dos mesmos marcadores genéticos associados ao câncer em uma ou mais células não cancerosas, selecionando um marcador enético associado ao câncer tendo uma sequência que é diferente na uma ou mais células cancerosas e a uma ou mais células não cancerosas, e em que a sequência da molécula de DNA alvo ou sítio de ligação é pelo menos cerca de 50% ou cerca de 60% ou cerca de 70% ou cerca de 80% ou cerca de 90% ou cerca de 95% ou cerca de 98% ou cerca de 99% homóloga à sequência do marcador genético associado ao câncer selecionado.

[0124] Muitas células de câncer expressam a survivina, um membro da família da proteína inibidora de apoptose (IAP) que, em humanos, é codificada pelo gene de

BIRC5. O uso do RNA de interferência para reduzir a expressão de determinadas moléculas de mRNA, incluindo o mRNA da survivina, pode inibir transitoriamente o crescimento de determinadas células de câncer. No entanto, métodos anteriores de uso do RNA de interferência para reduzir a expressão do mRNA da survivina produziram efeitos temporários, e resultaram apenas num pequeno aumento do tempo médio para a morte (TTD) em modelos animais. Foi descoberto agora que a indução de uma célula a expressar uma ou mais proteínas de edição gênica que alvejam o gene de BIRC5 pode resultar no rompimento do gene de BIRC5, pode induzir a célula a expressar e/ou secretar uma variante não funcional da proteína survivina, pode induzir a célula a expressar e/ou secretar uma variante dominante negativa da proteína survivina, pode desencadear a ativação de uma ou mais vias de apoptose na célula e células próximas, pode diminuir ou interromper o crescimento da célula ou células próximas, pode resultar na morte da célula ou das células próximas, pode inibir a progressão do câncer, e pode resultar na remissão em um paciente com câncer. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a uma proteína de edição gênica que se direciona ao gene de BIRC5. Em uma modalidade, a proteína de edição gênica se liga a uma ou mais regiões no gene de BIRC5. Em outra modalidade, a proteína de edição gênica se liga a uma ou mais regiões de uma sequência selecionada de: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, e SEQ ID NO: 15. Em outra modalidade, a proteína de edição gênica se liga a uma ou mais sequências selecionadas de: SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO:

22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, e SEQ ID NO: 27. Em ainda outra modalidade, a proteína de edição gênica se liga a uma ou mais sequências de ácido nucleico que codificam a SEQ ID NO: 34 ou um fragmento biologicamente ativo ou variante ou análogo do mesmo. Em ainda outra modalidade, a proteína de edição gênica se liga a uma ou mais sequências selecionadas da Tabela 3, Tabela 4, Tabela 3 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/721.302, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, Tabela 1 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/785.404, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, ou Tabela 1 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/842.874, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, a uma ou mais sequências que são pelo menos cerca de 50% ou pelo menos cerca de 60% ou pelo menos cerca de 70% ou pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 90% ou pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 98%, ou cerca de 99% homólogas a uma ou mais sequências selecionadas da Tabela 3, Tabela 4, Tabela 3 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/721.302, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, Tabela 1 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/785.404, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, ou Tabela 1 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/842.874, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência. Em uma modalidade, a proteína de edição gênica cria um ou mais cortes ou rupturas de fita dupla no DNA da célula. Em outra modalidade, o um ou mais cortes ou rupturas de fita dupla são criados no gene de BIRC5. Em outra modalidade, o um ou mais cortes ou rupturas de fita dupla são criados em um ou mais éxons do gene de

BIRC5. Em ainda outra modalidade, o um ou mais cortes ou rupturas de fita dupla são criados numa sequência selecionada de: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, e SEQ ID NO: 15. Em ainda outra modalidade, o um ou mais cortes ou rupturas de fita dupla são criados dentro de uma sequência que codifica um inibidor do domínio de apoptose (também conhecido como "IAP", "domínio de IAP", "repetição de IAP", "inibidor de baculovírus da repetição de proteína de apoptose", "BIR", etc.). Em ainda outra modalidade, a proteína de edição gênica se liga a uma ou mais sequências selecionadas da Tabela 5, Tabela 2 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/785.404, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, ou Tabela 2 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/842.874, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, ou a uma ou mais sequências que são pelo menos cerca de 50% ou pelo menos cerca de 60% ou pelo menos cerca de 70% ou pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 90% ou pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 98% homólogas a uma ou mais sequências selecionadas da Tabela 5, Tabela 2 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/785.404, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, ou Tabela 2 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/842.874, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência. Em ainda outra modalidade, a proteína de edição gênica se liga a uma sequência que codifica um ou mais genes selecionados da Tabela 2, Tabela 5, Tabela 6, Tabela 7, Tabela 4 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/721.302, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, Tabela 2 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/785.404, cujos conteúdos estão incorporados por meio

deste por referência, ou Tabela 2 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/842.874, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência.

Tabela 5. Sítios de Ligação de Gene Associado a Câncer Exemplar

Gene	#	Esquerdo	Direito	Espaçamento
CDK1	1	TTTAGGATCTACCATACCCA	TCTCTATTTTGGTATAATCT	15
CDK1	2	TTTAGGATCTACCATACCCA	TTCTCTATTTTGGTATAATC	16
CDK1	3	TTTAGGATCTACCATACCCA	TTTCTCTATTTTGGTATAAT	17
CDK1	4	TTAGGATCTACCATACCCAT	TCTCTATTTTGGTATAATCT	14
CDK1	5	TTAGGATCTACCATACCCAT	TTCTCTATTTTGGTATAATC	15
CDK1	1	TCACACAGCATATTATTTAC	TACCCTTATACACAACCTCCA	17
CDK1	2	TCACACAGCATATTATTTAC	TCTACCCTTATACACAACCTC	19
CDK1	3	TACTTTGTTTCAGGTACCTA	TGTAGTTTTGTGTCTACCTT	14
CDK1	4	TACTTTGTTTCAGGTACCTA	TGACCTGTAGTTTTGTGTCT	19
CDK1	5	TTTGTTTCAGGTACCTATGG	TGACCTGTAGTTTTGTGTCT	16
CDK2	1	TGACCCGACTCGCTGGCGCT	TCCGATCTTTTCCACCTTTT	15
CDK2	2	TGACCCGACTCGCTGGCGCT	TCTCCGATCTTTTCCACCTT	17
CDK2	3	TCGCTGGCGCTTCATGGAGA	TACGTGCCCTCTCCGATCTT	17
CDK2	4	TTCATGGAGAACTTCCAAAA	TACACAACCTCCGTACGTGCC	19
CDK2	5	TCATGGAGAACTTCCAAAAG	TACACAACCTCCGTACGTGCC	18
CDK2	1	TTTCCCAACCTCTCCAAGTG	TCTCGGATGGCAGTACTGGG	14
CDK2	2	TTCCCAACCTCTCCAAGTGA	TCTCTCGGATGGCAGTACTG	15
CDK2	3	TCCCAACCTCTCCAAGTGAG	TCTCTCGGATGGCAGTACTG	14
CDK2	4	TCTCCAAGTGAGACTGAGGG	TAAGCAGAGAGATCTCTCGG	18
CDK2	5	TCTCCAAGTGAGACTGAGGG	TTAAGCAGAGAGATCTCTCG	19
CDK3	1	TGTTTCCCAGGCAGCTCTGT	TCTCCGATCTTCTCTACCTT	19
CDK3	2	TTTCCCAGGCAGCTCTGTGG	TCTCCGATCTTCTCTACCTT	17
CDK3	3	TTCCCAGGCAGCTCTGTGGC	TCTCCGATCTTCTCTACCTT	16

CDK3	4	TCCCAGGCAGCTCTGTGGCC	TCTCCGATCTTCTCTACCTT	15
CDK3	5	TGGATATGTTCCAGAAGGTA	TACACCACCCCATAGGTGCC	15
CDK3	1	TGCCCACGGCTGTGCCCTTG	TGGCAGTGCTTGGGACCCCC	19
CDK3	2	TGTGCCCTTGTTTCTTGCA	TCCCTGATGGCAGTGCTTGG	16
CDK3	3	TTTCTTGCAAGGAGATGGAG	TGAGCAGCGAGATCTCCCTG	20
CDK3	4	TTCTTGCAAGGAGATGGAGG	TGAGCAGCGAGATCTCCCTG	19
CDK3	5	TTCTTGCAAGGAGATGGAGG	TTGAGCAGCGAGATCTCCCT	20
CDK4	1	TGTGATTGTAGGGTCTCCCT	TGGCTCATATCGAGAGGTAG	14
CDK4	2	TGATTGTAGGGTCTCCCTTG	TCAGCCACTGGCTCATATCG	20
CDK4	3	TTGTAGGGTCTCCCTTGATC	TCAGCCACTGGCTCATATCG	17
CDK4	4	TGTAGGGTCTCCCTTGATCT	TCAGCCACTGGCTCATATCG	16
CDK4	5	TAGGGTCTCCCTTGATCTGA	TCAGCCACTGGCTCATATCG	14
CDK4	1	TTGAAAAGTGAGCATTTACT	TCGGGATGTGGCACAGACGT	16
CDK4	2	TTGAAAAGTGAGCATTTACT	TTCGGGATGTGGCACAGACG	17
CDK4	3	TGAAAAGTGAGCATTTACTC	TCGGGATGTGGCACAGACGT	15
CDK4	4	TGAAAAGTGAGCATTTACTC	TTCGGGATGTGGCACAGACG	16
CDK4	5	TGAAAAGTGAGCATTTACTC	TCAGTTCGGGATGTGGCACA	20
CDK5	1	TACGAGAACTGGAAAAGAT	TGCAGGAACATCTCGAGATT	15
CDK5	2	TACGAGAACTGGAAAAGAT	TTGCAGGAACATCTCGAGAT	16
CDK5	3	TACGAGAACTGGAAAAGAT	TCTTGCAGGAACATCTCGAG	18
CDK5	1	TCCTTCCCCTAGGCACCTAC	TGAGTCTCCCGGTTTTTGGC	15
CDK5	2	TCCTTCCCCTAGGCACCTAC	TCATGAGTCTCCCGGTTTTT	18
CDK5	3	TCCTTCCCCTAGGCACCTAC	TCTCATGAGTCTCCCGGTTT	20
CDK5	4	TTCCCCTAGGCACCTACGGA	TCATGAGTCTCCCGGTTTTT	15
CDK5	5	TTCCCCTAGGCACCTACGGA	TCTCATGAGTCTCCCGGTTT	17
CDK6	1	TGTGCCGCGCTGACCAGCAG	TAGGCGCCCTCCCCGATCTC	15
CDK6	2	TGTGCCGCGCTGACCAGCAG	TCCCATAGGCGCCCTCCCCG	20
CDK6	3	TGCCGCGCTGACCAGCAGTA	TCCCATAGGCGCCCTCCCCG	18
CDK6	4	TGCCGCGCTGACCAGCAGTA	TTCCCATAGGCGCCCTCCCC	19

CDK6	5	TGACCAGCAGTACGAATGCG	TGAACACCTTCCCATAGGCG	19
CDK6	1	TCTAGGTTGTTTGATGTGTG	TAGTTTGGTTTCTCTGTCTG	14
CDK6	2	TCTAGGTTGTTTGATGTGTG	TAAAGTTAGTTTGGTTTCTC	20
CDK6	3	TAGGTTGTTTGATGTGTGCA	TAAAGTTAGTTTGGTTTCTC	18
CDK6	4	TTGTTTGATGTGTGCACAGT	TAAAGTTAGTTTGGTTTCTC	14
CDK6	5	TTGATGTGTGCACAGTGTC	TCAAACACTAAAGTTAGTTT	18
EGFR	1	TCCGGGACGGCCGGGGCAGC	TCGCCGGGCAGAGCGCAGCC	15
EGFR	1	TCTTCCAGTTTGCCAAGGCA	TCAAAAGTGCCCAACTGCGT	14
EGFR	2	TCTTCCAGTTTGCCAAGGCA	TGATCTTCAAAAGTGCCCAA	20
EGFR	3	TTCCAGTTTGCCAAGGCACG	TGATCTTCAAAAGTGCCCAA	18
EGFR	4	TCCAGTTTGCCAAGGCACGA	TGATCTTCAAAAGTGCCCAA	17
EGFR	5	TCACGCAGTTGGGCACTTTT	TGAACATCCTCTGGAGGCTG	14
HIF1A	1	TGAAGACATCGCGGGGACCG	TGTCGTTTCGCGCCGCCGGCG	15
HIF1A	2	TGAAGACATCGCGGGGACCG	TTGTCGTTTCGCGCCGCCGGC	16
HIF1A	3	TGAAGACATCGCGGGGACCG	TCTTGTCGTTTCGCGCCGCCG	18
HIF1A	4	TGAAGACATCGCGGGGACCG	TTCTTGTCGTTTCGCGCCGCC	19
HIF1A	5	TGAAGACATCGCGGGGACCG	TTTCTTGTCGTTTCGCGCCGC	20
HIF1A	1	TCTCGTGTTTTTCTTGTTGT	TCTTTTCGACGTTCAGAACT	14
HIF1A	2	TCTCGTGTTTTTCTTGTTGT	TTCTTTTCGACGTTCAGAAC	15
HIF1A	3	TCTCGTGTTTTTCTTGTTGT	TTTCTTTTCGACGTTCAGAA	16
HIF1A	4	TCTCGTGTTTTTCTTGTTGT	TTTTCTTTTCGACGTTCAGA	17
HIF1A	5	TTCTTGTTGTTGTTAAGTAG	TCGAGACTTTTCTTTTCGAC	14
HSPA4	1	TGGTGGGCATAGACCTGGGC	TGCCGCCGGCGCGGGCCACA	20
HSPA4	2	TGGGCATAGACCTGGGCTTC	TGCCGCCGGCGCGGGCCACA	17
HSPA4	3	TAGACCTGGGCTTCCAGAGC	TCGATGCCGCCGGCGCGGGC	15
HSPA4	4	TAGACCTGGGCTTCCAGAGC	TCTCGATGCCGCCGGCGCGG	17
HSPA4	5	TAGACCTGGGCTTCCAGAGC	TAGTCTCGATGCCGCCGGCG	20
HSPA4	1	TCTTAAGTGCTTTTTTTGTCT	TGAACGATTCTTAGGACCAA	20
HSPA4	2	TTAAGTGCTTTTTTTGTCTT	TGAACGATTCTTAGGACCAA	18

HSPA4	3	TTAAGTGCTTTTTTTGTCTT	TTGAACGATTCTTAGGACCA	19
HSPA4	4	TAAGTGCTTTTTTTGTCTTC	TGAACGATTCTTAGGACCAA	17
HSPA4	5	TAAGTGCTTTTTTTGTCTTC	TTGAACGATTCTTAGGACCA	18
HSP90AA1	1	TGCCCCCGTGTTTCGGGCGGG	TCCCGAAGGGAGGGCCCAGG	15
HSP90AA1	2	TGCCCCCGTGTTTCGGGCGGG	TGTCCCGAAGGGAGGGCCCA	17
HSP90AA1	3	TCCTGGGCCCTCCCTTCGGG	TCGCGCGGGTATTCAGCACT	20
HSP90AA1	4	TGGGCCCTCCCTTCGGGACA	TCGCGCGGGTATTCAGCACT	17
HSP90AA1	5	TCCCTTCGGGACAGGGACTG	TCCAGACGGTCGCGCGGGTA	19
HSP90AA1	1	TCCAGAAGATTGTGTTTATG	TCTTGGTACCAGTTAACAGG	14
HSP90AA1	2	TGTGTTTATGTTCCAGCAG	TTGGGCCTTTTCTTGGTACC	14
HSP90AA1	3	TCCCAGCAGGGCACCTGTTA	TGCCAGAGAAACACTTGGGC	17
HSP90AA1	4	TAACTGGTACCAAGAAAAGG	TCCAGACACCATCAGATGCC	15
HSP90AA1	5	TAACTGGTACCAAGAAAAGG	TGGATCCAGACACCATCAGA	19
MYC	1	TCCAGCAGCCTCCCGCGACG	TAGTTCCTGTTGGTGAAGCT	15
MYC	2	TCCAGCAGCCTCCCGCGACG	TCATAGTTCCTGTTGGTGAA	18
MYC	3	TCCCGCGACGATGCCCTCA	TCGAGGTCATAGTTCCTGTT	14
MYC	4	TCCCGCGACGATGCCCTCA	TAGTCGAGGTCATAGTTCCT	17
MYC	5	TCCCGCGACGATGCCCTCA	TCGTAGTCGAGGTCATAGTT	20
PKN3	1	TGCAGCCTGGGCCGAGCCAG	TGGCCCGGCGGATCACCTCC	20
PKN3	2	TGGGCCGAGCCAGTGGCCCC	TGGATGGCCCGGCGGATCAC	17
PKN3	3	TGGGCCGAGCCAGTGGCCCC	TCTGGATGGCCCGGCGGATC	19
PKN3	4	TGGGCCGAGCCAGTGGCCCC	TTCTGGATGGCCCGGCGGAT	20
PKN3	5	TGGCCCCAGAGGATGAGAA	TCAGCTCTTTCTGGATGGCC	15
RRM2	1	TGGGAAGGGTCGGAGGCATG	TGGCTTTGGTGCCCCGGCCC	16
RRM2	2	TGGGAAGGGTCGGAGGCATG	TTGGCTTTGGTGCCCCGGCC	17
RRM2	3	TCGGAGGCATGGCACAGCCA	TTCCCATTGGCTTTGGTGCC	14
RRM2	4	TGGCACAGCCAATGGGAAGG	TCCCGGCCCTTCCCATTGGC	14
RRM2	5	TGCACCCTGTCCCAGCCGTC	TGGAGGCGCAGCGAAGCAGA	17
APC	1	TATGTACGCCTCCCTGGGCT	TGGTACAGAAGCGGGCAAAG	15

APC	2	TGTACGCCTCCCTGGGCTCG	TGAGGGTGGTACAGAAGCGG	19
APC	3	TACGCCTCCCTGGGCTCGGG	TGAGGGTGGTACAGAAGCGG	17
APC	4	TCGGGTCCGGTCGCCCCCTTT	TCCAGGACCCGAGAACTGAG	18
APC	5	TCCGGTCGCCCCCTTTGCCCCG	TGCTCCAGGACCCGAGAACT	16
APC	1	TTAAACAACCTACAAGGAAGT	TCAATCTGTCCAGAAGAAGC	18
APC	2	TAAACAACCTACAAGGAAGTA	TCAATCTGTCCAGAAGAAGC	17
APC	3	TACAAGGAAGTATTGAAGAT	TAATAAATCAATCTGTCCAG	16
APC	4	TATTGAAGATGAAGCTATGG	TAAGACGCTCTAATAAATCA	16
APC	5	TATTGAAGATGAAGCTATGG	TTAAGACGCTCTAATAAATC	17
BRCA1	1	TGGATTTATCTGCTCTTCGC	TGCATAGCATTAAATGACATT	15
BRCA1	2	TGGATTTATCTGCTCTTCGC	TCTGCATAGCATTAAATGACA	17
BRCA1	3	TTATCTGCTCTTCGCGTTGA	TAAGATTTTCTGCATAGCAT	20
BRCA1	4	TATCTGCTCTTCGCGTTGAA	TAAGATTTTCTGCATAGCAT	19
BRCA1	5	TCTGCTCTTCGCGTTGAAGA	TAAGATTTTCTGCATAGCAT	17
BRCA1	1	TGCTAGTCTGGAGTTGATCA	TGCAAAATATGTGGTCACAC	19
BRCA1	2	TGCTAGTCTGGAGTTGATCA	TTGCAAAATATGTGGTCACA	20
BRCA1	3	TAGTCTGGAGTTGATCAAGG	TGCAAAATATGTGGTCACAC	16
BRCA1	4	TAGTCTGGAGTTGATCAAGG	TTGCAAAATATGTGGTCACA	17
BRCA1	5	TAGTCTGGAGTTGATCAAGG	TACTTGCAAAATATGTGGTC	20
BRCA2	1	TGCCTATTGGATCCAAAGAG	TGCAGCGTGTCTTAAAAATT	17
BRCA2	2	TGCCTATTGGATCCAAAGAG	TTGCAGCGTGTCTTAAAAAT	18
BRCA2	3	TGCCTATTGGATCCAAAGAG	TGTTGCAGCGTGTCTTAAAA	20
BRCA2	4	TATTGGATCCAAAGAGAGGC	TTGCAGCGTGTCTTAAAAAT	14
BRCA2	5	TATTGGATCCAAAGAGAGGC	TGTTGCAGCGTGTCTTAAAA	16
BRCA2	1	TAGATTTAGGACCAATAAGT	TGGAGCTTCTGAAGAAAGTT	16
BRCA2	2	TTAGGACCAATAAGTCTTAA	TAGGGTGGAGCTTCTGAAGA	16
BRCA2	3	TTAGGACCAATAAGTCTTAA	TATAGGGTGGAGCTTCTGAA	18
BRCA2	4	TTAGGACCAATAAGTCTTAA	TTATAGGGTGGAGCTTCTGA	19
BRCA2	5	TAGGACCAATAAGTCTTAAT	TATAGGGTGGAGCTTCTGAA	17

TP53	1	TCAGTCCATGGAGGAGCCG	TGACTCAGAGGGGGCTCGAC	15
TP53	2	TCAGTCCATGGAGGAGCCG	TCCTGACTCAGAGGGGGCTC	18
TP53	3	TCAGTCCATGGAGGAGCCG	TTCCTGACTCAGAGGGGGCT	19
TP53	4	TCAGTCCATGGAGGAGCCG	TTTCCTGACTCAGAGGGGGC	20
TP53	5	TGCCATGGAGGAGCCGAGT	TCCTGACTCAGAGGGGGCTC	14
APP	1	TTCTTTTCAAGTACCCACTGA	TGGCAATCTGGGGTTTCAAGC	18
APP	2	TCTTTTCAAGTACCCACTGAT	TGGCAATCTGGGGTTTCAAGC	17
APP	3	TTTCAGGTACCCACTGATGG	TGGCAATCTGGGGTTTCAAGC	15
APP	4	TTCAGGTACCCACTGATGGT	TGGCAATCTGGGGTTTCAAGC	14
APP	5	TACCCACTGATGGTAATGCT	TGCCACAGAACATGGCAATC	20
IAPP	1	TGGGCATCCTGAAGCTGCAA	TGGTTCAATGCAACAGAGAG	15
IAPP	2	TGGGCATCCTGAAGCTGCAA	TCAGATGGTTCAATGCAACA	20
IAPP	3	TGCAAGTATTTCTCATTGTG	TGGGTGTAGCTTTTCAAGTGG	17
IAPP	4	TGCTCTCTGTTGCATTGAAC	TTACCAACCTTTTCAATGGGT	14
IAPP	1	TGTTACCAGTCATCAGGTGG	TGCGTTGCACATGTGGCAGT	17
IAPP	2	TTACCAGTCATCAGGTGGAA	TGCGTTGCACATGTGGCAGT	15
IAPP	3	TACCAGTCATCAGGTGGAAA	TGCGTTGCACATGTGGCAGT	14
IAPP	4	TCATCAGGTGGAAAAGCGGA	TGCCAGGCGCTGCGTTGCAC	18
IAPP	5	TCATCAGGTGGAAAAGCGGA	TTGCCAGGCGCTGCGTTGCA	19
SNCA	1	TTTTGTAGGCTCCAAAACCA	TTACCTGTTGCCACACCATG	14
SNCA	2	TTTTGTAGGCTCCAAAACCA	TGGAGCTTACCTGTTGCCAC	20
SNCA	3	TTTGTAGGCTCCAAAACCAA	TGGAGCTTACCTGTTGCCAC	19
SNCA	4	TTGTAGGCTCCAAAACCAAG	TGGAGCTTACCTGTTGCCAC	18
SNCA	5	TGTAGGCTCCAAAACCAAGG	TGGAGCTTACCTGTTGCCAC	17
SOD1	1	TAGCGAGTTATGGCGACGAA	TGCACTGGGCCGTCGCCCTT	16
SOD1	2	TTATGGCGACGAAGGCCGTG	TGCCCTGCACTGGGCCGTCG	14
SOD1	3	TTATGGCGACGAAGGCCGTG	TGATGCCCTGCACTGGGCCG	17
SOD1	4	TTATGGCGACGAAGGCCGTG	TGATGATGCCCTGCACTGGG	20
SOD1	5	TATGGCGACGAAGGCCGTGT	TGATGCCCTGCACTGGGCCG	16

SOD1	1	TAATGGACCACTGAAGGTGT	TGCAGGCCTTCAGTCAGTCC	14
SOD1	2	TAATGGACCACTGAAGGTGT	TCCATGCAGGCCTTCAGTCA	18
SOD1	3	TGGACCACTGAAGGTGTGGG	TCCATGCAGGCCTTCAGTCA	15
SOD1	4	TGGACCACTGAAGGTGTGGG	TGGAATCCATGCAGGCCTTC	20
SOD1	5	TGTGGGGAAGCATTAAAGGA	TCATGAACATGGAATCCATG	15

[0125] Em algumas modalidades, a molécula de DNA alvo compreende um gene que é superexpresso em câncer. Exemplos que genes que são superexpressos em câncer incluem, mas não estão limitados a: ABL1, BIRC5, BLK, BTK, membros da família CDK, EGFR, ERBB2, FAS, FGR, FLT4, FRK, FYN, HCK, HIF1A, HRAS, HSP90AA1, HSP90AA1, HSPA4, KDR, KIF11, KIF11, KIF20A, KIF21A, KIF25, KIT, KRAS, LCK, LYN, MAPK1, MET, MYC, MYH1, MYO1G, NRAS, NTRK1, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PKN3, PLK1, RAF1, RB1, RET, RRM1, RRM2, SRC, TNF, TPM2, TYRO3, VEGFA, VEGFB, VEGFC, YES1, e ZAP70. Em algumas modalidades, a molécula de DNA alvo compreende um gene selecionado de: ABL1, BIRC5, BLK, BTK, um membro da família CDK, EGFR, ERBB2, FAS, FGR, FLT4, FRK, FYN, HCK, HIF1A, HRAS, HSP90AA1, HSP90AA1, HSPA4, KDR, KIF11, KIF11, KIF20A, KIF21A, KIF25, KIT, KRAS, LCK, LYN, MAPK1, MET, MYC, MYH1, MYO1G, NRAS, NTRK1, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PKN3, PLK1, RAF1, RB1, RET, RRM1, RRM2, SRC, TNF, TPM2, TYRO3, VEGFA, VEGFB, VEGFC, YES1, e ZAP70 ou um fragmento ou variante dos mesmos. Em outras modalidades, a molécula de DNA alvo compreende um gene que é mutante em câncer. Exemplos que genes que são mutantes em câncer incluem, mas não estão limitados a: AIM1, APC, BRCA1, BRCA2, CDKN1B, CDKN2A, FAS, membros da família FZD, HNF1A, HOPX, KLF6, MEN1, MLH1, NTRK1, PTEN, RARRES1, RB1, SDHB, SDHD, SFRP1, membros da família ST, TNF, TP53, TP63, TP73, VBP1, VHL, membros da família WNT, BRAF, CTNNB1,

PIK3CA, PIK3R1, SMAD4, e YPEL3. Em algumas modalidades, a molécula de DNA alvo compreende um gene selecionado de: AIM1, APC, BRCA1, BRCA2, CDKN1B, CDKN2A, FAS, um membro da família FZD, HNF1A, HOPX, KLF6, MEN1, MLH1, NTRK1, PTEN, RARRES1, RB1, SDHB, SDHD, SFRP1, um membro da família ST, TNF, TP53, TP63, TP73, VBP1, VHL, um membro da família WNT, BRAF, CTNNB1, PIK3CA, PIK3R1, SMAD4, e YPEL3 um fragmento ou variante dos mesmos. Em uma modalidade, o método compreende ainda a administração a um paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um modelo de reparo.

[0126] As mutações em determinados genes podem aumentar a probabilidade de uma célula se tornar cancerosa. Em determinadas situações, no entanto, pode ser prejudicial inativar um gene associado a câncer em células não cancerosas, por exemplo, se a forma não mutante do gene associado a câncer for benéfica. Foi descoberto agora que as proteínas de edição gênica podem ser usadas para inativar especificamente, parcial ou completamente, as formas mutantes dos genes. Exemplos de mutações associadas a câncer incluem, mas não estão limitados a: ALK (F1174, R1275), APC (R876, Q1378, R1450), BRAF (V600), CDKN2A (R58, R80, H83, D84, E88, D108G, W110, P114), CTNNB1 (D32, S33, G34, S37, T41, ou S45), EGFR (G719, T790, L858), EZH2 (Y646), FGFR3 (S249, Y373), FLT3 (D835), GNAS (R201), HRAS (G12, G13, Q61), IDH1 (R132), JAK2 (V617), KIT (D816), KRAS (G12, G13), NRAS (G12, G13, Q61), PDGFRA (D842), PIK3CA (E542, E545, H1047), PTEN (R130), e TP53 (R175, H179, G245, R248, R249, R273, W282). Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a uma proteína de edição gênica que se liga a uma mutação associada a doença. Em uma modalidade,

a proteína de edição gênica se liga ao DNA contendo uma mutação específica com maior afinidade que o DNA que não contém a mutação. Em outra modalidade, a doença é câncer.

[0127] Doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer, mal de Parkinson, e demência com corpos de Lewy, são caracterizadas pela perda progressiva de função e/ou morte de células dos sistemas nervosos central e/ou periférico. A progressão da doença pode se acompanhada pelo acúmulo de placas ricas em proteína que podem compreender a proteína α -sinucleína (codificada, em humanos, pelo gene de SNCA). Como resultado, os pesquisadores têm procurado desenvolver produtos terapêuticos que possam romper essas placas, por exemplo, por meio de um anticorpo que se ligue à placa e a marque para destruição pelo sistema imune. No entanto, em muitos casos, o rompimento das placas tem pouco ou nenhum efeito nos sintomas do paciente ou na progressão da doença. Foi descoberto agora que a falha das terapias existente que alvejam as placas associadas a doença neurodegenerativa é devido, em parte, à incapacidade do sistema nervoso em reparar o dano às células que ocorre durante os estágios iniciais da formação da placa. Foi descoberto ainda que a indução de uma célula a expressar uma ou mais proteínas de edição gênica que se direcionam ao gene de SNCA pode resultar no rompimento do gene de SNCA, pode induzir a célula a expressar uma variante resistente à placa da proteína α -sinucleína, pode diminuir ou interromper o crescimento das placas associadas a doença neurodegenerativa, pode proteger a célula e células próximas contra os efeitos danificadores das placas associadas à doença neurodegenerativa, pode diminuir e/ou

interromper a progressão das doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, mal de Parkinson, e demência com corpos de Lewy, e pode resultar numa redução dos sintomas e/ou ganho de função em pacientes com doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer, mal de Parkinson, e demência com corpos de Lewy. Outras doenças neurodegenerativas incluem, por exemplo, perda de visão, incluindo cegueira, perda de audição, incluindo surdez, distúrbios de equilíbrio, perda de paladar e/ou olfato, e outros distúrbios sensoriais. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a uma proteína de edição gênica que se direciona ao gene de SNCA. Em uma modalidade, a proteína de edição gênica se liga a uma ou mais regiões no gene de SNCA. Em outra modalidade, a proteína de edição gênica se liga a uma ou mais sequências de ácido nucleico que codificam a SEQ ID NO: 51 ou um fragmento biologicamente ativo ou variante ou análogo do mesmo. Outras modalidades são direcionadas a um método para tratar uma doença neurodegenerativa que compreende a administração a um paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de edição gênica ou um ácido nucleico que codifica uma proteína de edição gênica, em que a proteína de edição gênica é capaz de se ligar a uma sequência nucleotídica que codifica uma proteína que forma placas associadas à doença, e resultando numa redução das placas associadas à doença no paciente e/ou progressão retardada ou interrompida da doença. Em uma modalidade, a sequência nucleotídica compreende o gene de SNCA. Em outra modalidade, a sequência nucleotídica codifica a α -sinucleína. Em outra modalidade, a doença neurodegenerativa é selecionada de: mal de

Parkinson, doença de Alzheimer e demência.

[0128] Determinadas modalidades são direcionadas a um método para identificar um tóxico causador de doença que compreende a transfecção de uma célula com uma proteína de edição gênica ou de um ácido nucleico que codifica uma proteína de edição gênica para alterar a sequência de DNA da célula, em que a sequência de DNA alterada confere susceptibilidade a uma doença, pondo em contato a célula com um tóxico causador da doença suspeito, e avaliando o grau no qual a célula exibe um fenótipo associado à doença. Em uma modalidade, a doença é uma doença neurodegenerativa, doença autoimune, doença respiratória, distúrbio reprodutivo ou câncer. Outras modalidades são direcionadas a um método para avaliar a segurança de uma substância terapêutica que compreende a transfecção de uma célula com uma proteína de edição gênica ou de um ácido nucleico que codifica uma proteína de edição gênica para alterar a sequência de DNA da célula, em que a sequência de DNA alterada confere susceptibilidade a um ou mais efeitos tóxicos da substância terapêutica, pondo em contato a célula com a substância terapêutica, e medindo um ou mais efeitos tóxicos da substância terapêutica na célula. Ainda outras modalidades são direcionadas a um método para avaliar a eficácia de uma substância terapêutica que compreende a transfecção de uma célula com uma proteína de edição gênica ou de um ácido nucleico que codifica uma proteína de edição gênica para alterar a sequência de DNA da célula, em que a sequência de DNA alterada faz com que a célula exiba um ou mais fenótipos associados à doença, pondo em contato a célula com a substância terapêutica, e

medindo o grau no qual o um ou mais fenótipos associados à doença são reduzidos.

[0129] Em algumas modalidades, o paciente é diagnosticado com uma proteopatia. Exemplos de proteopatias e genes associados à proteopatia são dados na Tabela 6, e são incluídos à título de exemplo, e não à título de limitação. Em uma modalidade, a proteopatia é selecionada de: amiloidose (secundária) AA, doença de Alexander, doença de Alzheimer, esclerose amiotrófica lateral, amiloidose aórtica média, amiloidose ApoAI, amiloidose ApoAII, amiloidose ApoAIV, amiloidose do fibrinogênio, amiloidose cardíaca atrial, arteriopatia cerebral autossômica dominante com infarto subcortical e leucoencefalopatia, angiopatia β -amiloide cerebral, amiloidose de diálise, cardiomiopatia amiloide familiar, polineuropatia amiloide familiar, amiloidose familiar (tipo finlandês), demência familiar britânica, demência familiar dinamarquesa, degeneração lobar frontotemporal, angiopatia amiloide cerebral hereditária, distrofia da córnea entrelaçada hereditária, doença de Huntington, miosite/miopatia com corpos de inclusão, amiloidose de lisozima, carcinoma de tireoide medular, tumor amiloide odontogênico (Pindborg), mal de Parkinson, prolactinoma da pituitária, doenças de príon, proteinose pulmonária alveolar, degeneração de células do gânglio retinal em glaucoma, retinite pigmentosa com mutações de rodopsina, amiloidose sistêmica senil, serpinopatias, sinucleinopatias, tauopatias, diabetes tipo II, demência pugilística (encefalopatia traumática crônica), demência frontotemporal, degeneração lobar frontotemporal, gangliocitoma, ganglioglioma, doença de Hallervorden-Spatz,

encefalopatia por chumbo, lipofuscinose, doença de Lytico-Bodig, meningioangiomatose, paralisia supranuclear progressiva, panencefalite esclerosante subaguda, demência predominante confusa, e esclerose tuberosa. Em outra modalidade, a molécula de DNA alvo compreende um gene selecionado de: APOA1, APOA2, APOA4, APP, B2M, CALCA, CST3, FGA, FGB, FGG, FUS, GFAP, GSN, HTT, IAPP, ITM2B, LYZ, MAPT, MFGE8, NOTCH3, NPPA, ODAM, PRL, PRNP, RHO, um membro da família SAA, um membro da família SERPIN, SFTPC, SNCA, um membro da família SOD, TARDBP, TGFBI, e TRR ou um fragmento ou variante dos mesmos. Em outra modalidade, a molécula de DNA alvo codifica um gene selecionado da Tabela 6 ou um fragmento do mesmo, e o paciente é diagnosticado com a doença correspondente listada na Tabela 6.

Tabela 6. Proteopatias e Genes Associados à Proteopatia Exemplos

Gene / Família	Doença / Condição
APOA1	Amiloidose ApoAI
APOA2	Amiloidose ApoAII
APOA4	Amiloidose ApoAIV
APP	Angiopatia β -amiloide cerebral
APP	Degeneração de célula do gânglio retinal no glaucoma
APP	Miosite/miopatia com corpos de inclusão
APP, MAPT	Doença de Alzheimer
B2M	Amiloidose por diálise
CALCA	Carcinoma de tireoide medular
CST3	Angiopatia amiloide cerebral hereditária (Islandesa)
FGA, FGB, FGG	Amiloidose de fibrinogênio

GFAP	Doença de Alexander
GSN	Amiloidose familiar, tipo finlandês
HTT	Doença de Huntington
IAPP	Diabetes tipo II
ITM2B	Demência britânica familiar
ITM2B	Demência dinamarquesa familiar
LYZ	Amiloidose por lisozima
MAPT	Tauopatias (múltiplas)
MFGE8	Amiloidose aórtica média
NOTCH3	Arteriopatia autossômica dominante cerebral com infartos subcorticais e leucoencefalopatia (CADASIL)
NPPA	Amiloidose atrial cardíaca
ODAM	Tumor amiloide odontogênica (Pindborg)
PRL	Prolactinoma de pituitária
PRNP	Doenças de príon (múltiplas)
RHO	Retinite pigmentosa com mutações de rodopsina
Genes da família SAA	Amiloidose AA (secundária)
Genes da família SERPIN	Serpinopatias (múltiplas)
SFTPC	Proteinase pulmonar alveolar
SNCA	Mal de Parkinson e outras sinucleinopatias (múltiplas)
SNCA	Outras sinucleinopatias
Genes da família SOD, TARDBP, FUS	Esclerose amiotrófica lateral (ALS)

TARDBP, FUS	Degeneração lobar frontotemporal (FTLD)
TGFBI	Distrofia córnea entrelaçada hereditária
LMNA	Síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford
TRR	Amiloidose senil sistêmica (SSA), polineuropatia amiloide familiar (FAP), cardiomiopatia amiloide familiar (FAC)

[0130] Exemplos de tauopatias incluem, mas não estão limitados a, doença de Alzheimer, mal de Parkinson, e doença de Huntington. Outros exemplos de tauopatias incluem: demência pugilística (encefalopatia traumática crônica), demência frontotemporal, degeneração lobar frontotemporal, gangliocitoma, ganglioglioma, doença de Hallervorden-Spatz, encefalopatia por chumbo, lipofuscinose, doença de Lytico-Bodig, meningioangiomatose, paralisia supranuclear progressiva, panencefalite esclerosante subaguda, demência predominante confusa, e esclerose tuberosa. Em algumas modalidades, o paciente é diagnosticado com uma tauopatia. Em uma modalidade, a tauopatia é selecionada de: doença de Alzheimer, mal de Parkinson, e doença de Huntington. Em outra modalidade, a tauopatia é selecionada de: demência pugilística (encefalopatia traumática crônica), demência frontotemporal, degeneração lobar frontotemporal, gangliocitoma, ganglioglioma, doença de Hallervorden-Spatz, encefalopatia por chumbo, lipofuscinose, doença de Lytico-Bodig, meningioangiomatose, paralisia supranuclear progressiva, panencefalite esclerosante subaguda, demência predominante confusa, e esclerose tuberosa.

[0131] Doenças autoimunes, incluindo, mas não limitadas a, lúpus, esclerose múltipla (EM), esclerose

lateral amiotrófica (ALS), e rejeição a transplante, são caracterizadas por sintomas causadas, em parte, por um ou mais elementos do sistema imune que atacam células e/ou tecidos não infectados e isogênicos não cancerosos. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a um método para tratar uma doença autoimune. Em uma modalidade, a doença autoimune é selecionada de: lúpus, esclerose múltipla (EM), esclerose lateral amiotrófica (ALS), e rejeição a transplante. Em outra modalidade, a molécula de DNA alvo codifica uma sequência polipeptídica que pode ser reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro.

[0132] Agentes infecciosos podem conter sequências de ácido nucleico que não estão presentes no organismo do hospedeiro. Foi descoberto agora que as proteínas de edição gênica podem ser usadas para eliminar, reduzir ou alterar de outra forma, completamente ou em parte, agentes infecciosos e/ou os efeitos da infecção, e que quando usadas desta forma, as proteínas de edição gênica e ácidos nucleicos que codificam as proteínas de edição gênica, podem constituir potentes produtos terapêuticos anti-infecção. Agentes infecciosos que podem ser tratados dessa forma incluem, mas não estão limitados a: vírus, bactérias, fungos, leveduras e parasitas. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a um método para induzir uma célula a expressar uma proteína de edição gênica que se direciona a uma ou mais sequências associadas ao agente infeccioso. Em uma modalidade, a célula é um de: uma célula bacteriana, uma célula fúngica, uma célula de levedura, e uma célula de parasita. Em outra modalidade, a célula é uma célula de mamífero. Em outra modalidade, a célula é uma célula humana.

Outras modalidades são direcionadas a uma composição terapêutica que compreende um ácido nucleico que codifica uma ou mais proteínas de edição gênica que se direcionam a uma ou mais sequências associadas ao agente infeccioso. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a um método para induzir uma célula a expressar uma proteína de edição gênica que se direciona a uma ou mais sequências associadas à susceptibilidade ou resistência à infecção. Outras modalidades são direcionadas a uma composição terapêutica que compreende um ácido nucleico que codifica uma ou mais proteínas de edição gênica que se direcionam a uma ou mais sequências associadas à susceptibilidades ou resistência à infecção. Em uma modalidade, a célula é transfectada com um ácido nucleico que codifica uma ou mais proteínas de edição gênica e um ácido nucleico que codifica um ou mais modelos de reparo. Em outra modalidade, o modelo de reparo contém um gene de resistência ou um fragmento biologicamente ativo ou variante do mesmo. Em outra modalidade, o modelo de reparo contém uma sequência de RNAi. Em ainda outra modalidade, a sequência de RNAi é um shRNA. Outras modalidades são direcionadas a um método para tratar uma doença infecciosa que compreende a administração a um paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de edição gênica ou de um ácido nucleico que codifica uma proteína de edição gênica, em que a proteína de edição gênica é capaz de se ligar a uma ou mais sequências nucleotídicas que estão presentes no agente infeccioso.

[0133] Foi descoberto agora que a razão entre eventos de junção de extremidade não homólogos e eventos de

recombinação homóloga pode ser alterada, alterando-se a expressão e/ou função de um ou mais componentes de uma via de reparo de DNA. Exemplos não limitantes de genes que codificam componentes de uma via de reparo de DNA incluem, mas não estão limitados a: Artemis, BLM, CtIP, DNA-PK, DNA-PKcs, EXO1, FEN1, Ku70, Ku86, LIGIII, LIGIV, MRE11, NBS1, PARP1, RAD50, RAD54B, XLF, XRCC1, XRCC3, e XRCC4. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a um método para alterar a expressão e/ou função de um ou mais componentes de uma via de reparo de DNA. Em determinadas modalidades, a expressão e/ou função são aumentadas. Em outras modalidades, a expressão e/ou função são diminuídas. A proteína quinase dependente de DNA (PK-DNA) é um componente da via de reparo de DNA de junção de extremidade não homóloga. Foi descoberto agora que o reparo através da recombinação homóloga pode ser aumentado, alterando-se a expressão da DNA-PK. Em uma modalidade, uma célula é posta em contato com um inibidor da DNA-PK. Exemplos de inibidores da DNA-PK incluem, mas não estão limitados a: Composto 401 (2-(4-Morfolinil)-4H-pirimido[2,1-a]isoquinolin-4-ona), DMNB, IC87361, LY294002, NU7026, NU7441, OK-1035, cloridrato de PI 103, vanilina, e wortmannin.

[0134] Mutações genéticas podem afetar o comprimento de um produto de proteína, por exemplo, introduzindo um códon de parada e/ou rompendo um quadro de leitura aberta. Determinadas doenças, incluindo a distrofia muscular de Duchenne, podem ser causadas pela produção de proteínas truncadas e/ou em frameshift. Foi descoberto agora que as proteínas de edição gênica podem ser usadas

para tratar doenças que estão associadas à produção de uma ou mais proteínas truncadas e/ou em frameshift. Em uma modalidade, a proteína de edição gênica cria uma ruptura de fita dupla dentro de cerca de 1kb ou cerca de 0,5kb ou cerca de 0,1kb de um éxon contendo uma mutação contribuidora para a doença. Em outra modalidade, a proteína de edição gênica é coexpressa com uma sequência de DNA compreendendo uma ou mais sequências do tipo selvagem. Em determinadas modalidades, o DNA é de fita única. Em outras modalidades, o DNA é de fita dupla. As doenças causadas pela expressão de proteínas truncadas podem ser tratadas por exon skipping (salto de éxons). Foi descoberto agora que as proteínas de edição gênica podem ser usadas para induzir o salto de éxons. Em uma modalidade, a proteína de edição gênica cria uma ruptura de fita dupla dentro de cerca de 1kb ou cerca de 0,5kb ou cerca de 0,1kb do éxon a ser saltado. Em outra modalidade, a proteína de edição gênica cria uma ruptura de fita dupla dentro de cerca de 1kb ou cerca de 0,5kb ou cerca de 0,1kb de um íntron a montante do éxon a ser saltado. Em outra modalidade, a proteína de edição gênica cria uma ruptura de fita dupla dentro de cerca de 1kb ou cerca de 0,5kb ou cerca de 0,1kb do sítio acceptor de splice de um íntron a montante do éxon a ser saltado.

[0135] Ácidos nucleicos, incluindo formulações lipossômicas contendo ácidos nucleico, quando distribuídos *in vivo*, podem ser acumular no fígado e/ou baço. Foi descoberto agora que os ácidos nucleicos que codificam as proteínas de edição gênica podem modular a expressão gênica no fígado e baço, e que os ácidos nucleicos usados desta

forma podem constituir potentes produtos terapêuticos para o tratamento de doenças do fígado e baço. Determinadas modalidades são, portanto, direcionadas a um método para tratar uma doença do fígado e/ou baço, distribuindo a um paciente um ácido nucleico que codifica uma ou mais proteínas de edição gênica. Outras modalidades são direcionadas a uma composição terapêutica que compreende um ácido nucleico que codifica uma ou mais proteínas de edição gênica para o tratamento de doença do fígado e/ou baço. Doenças e condições do fígado e/ou baço que podem ser tratadas incluem, mas não estão limitadas a: hepatite, doença hepática induzida por álcool, doença hepática induzida por droga, infecção pelo vírus Epstein Barr, infecção por adenovírus, infecção por citomegalovírus, toxoplasmose, febre maculosa das Montanhas Rochosas, doença hepática gordurosa não alcoólica, hemocromatose, doença de Wilson, doença de Gilbert, e câncer do fígado e/ou baço. Outros exemplos de sequências (incluindo genes, famílias de genes, e loci) que podem ser alvejados pelas proteínas de edição gênica, que usam os métodos da presente invenção, estão estabelecidos na Tabela 7, e são dados à título de exemplo, e não à título de limitação.

*Tabela 7. Alvos de Proteína de Edição Gênica
Exemplares*

Doença/Condição	Gene/Família/Locus
Degeneração macular relacionada à idade	Família VEGF
Doença de Alzheimer	APP, PSEN1, PSEN2, APOE, CR1, CLU, PICALM, BIN1, MS4A4, MS4A6E, CD2AP, CD33, EPHA1

Esclerose amiotrófica lateral	SOD1
Câncer	BRCA1, EGFR, família MYC, TP53, PKN3, família RAS, BIRC5, PTEN, RET, KIT, MET, APC, RB1, BRCA2, família VEGF, TNF, HNPCC1, HNPCC2, HNPCC5
Fibrose cística	CFTR
Diabetes	GCK, HNF1A, HNF4A, HNF1B
Distrofia muscular de Duchenne	DMD
Anemia de Fanconi	BRCA2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCJ, FANCL, FANCM, FANCN, FANCP, RAD51C
Hemocromatose	HFE, HJV, HAMP, TFR2, SLC40A1
Hemofilia	F8, F9, F11
HIV/AIDS	CCR5, CXCR4
Doença de Huntington	HTT
Síndrome de Marfan	FBN1
Neurofibromatose	NF1, NF2
Mal de Parkinson	SNCA, PRKN, LRRK2, PINK1, PARK7, ATP13A2
Locus seguro em humanos	AAVS1
Locus seguro em camundongos e ratos	Rosa26
Anemia falciforme	HBB
Doença de Tay-Sachs	HEXA
Xeroderma pigmentoso	XPA, XPB, XPC, XPD, DDB2, ERCC4, ERCC5, ERCC6, RAD2,

	POLH
Psoríase, artrite reumatoide, espongilite anquilosante, doença de Crohn, Hidradenite supurativa, asma refratária	TNF
Psoríase, artrite reumatoide, policitemia vera, trombocitemia essencial, metaplasia mieloide com mielofibrose	Família JAK

[0136] Determinadas modalidades são direcionadas a uma terapia de combinação compreendendo uma ou mais composições terapêuticas da presente invenção e uma ou mais terapias adjuvantes. Exemplos de terapias adjuvantes estão estabelecidos na Tabela 8 e Tabela 5 do Pedido Provisório U.S. Nº. 61/721.302, cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência, e são dados à título de exemplo, e não à título de limitação.

Tabela 8. Terapias adjuvantes Exemplares

Classe da Terapia	Doença/Condição	Terapia de Exemplo
Inibidores da acetilcolinesterase	Miastenia grave, Glaucoma, doença de Alzheimer, demência com corpos de Lewy, síndrome de taquicardia postural	Edrofônio
Inibidor da enzima	Hipertensão,	Perindopril

conversora de angiotensina	insuficiência cardíaca congestiva	
Agentes alquilantes	Câncer	Cisplatina
Inibidores da angiogênese	Câncer, degeneração macular	Bevacizumab
Antagonistas do receptor da angiotensina II	Hipertensão, nefropatia diabética, insuficiência cardíaca congestiva	Valsartana
Antibióticos	Infecção bacteriana	Amoxicilina
Drogas antidiabéticas	Diabetes	Metformina
Antimetabólitos	Câncer, Infecção	5-fluorouracil (5FU)
Oligonucleotídeos antisense	Câncer, Diabetes, esclerose amiotrófica lateral (ALS), Hipercolesterolemia	Mipomersen
Antibióticos citotóxicos	Câncer	Doxorrubicina
Estimulação cerebral profunda	Dor crônica, mal de Parkinson, Tremor, Distonia	N/A
Agonistas de dopamina	Mal de Parkinson, diabetes tipo II, tumores da pituitária	Bromocriptina
Inibidores de entrada/fusão	HIV/AIDS	Maraviroc
Agonistas do peptídeo 1 semelhantes ao	Diabetes	Exenatida

glucagon		
Glicocorticoides	Astma, insuficiência da adrenal, doenças inflamatórias, doenças imunes, meningite bacteriana	Dexametasona
Drogas imunossupressoras	Transplante de órgão, doenças inflamatórias, doenças imunes	Azatioprina
Insulina/análogos da insulina	Diabetes	Insulina NPH
Inibidores da integrase	HIV/AIDS	Raltegravir
Inibidores da MAO-B	Mal de Parkinson, Depressão, Demência	Selegilina
Inibidores de maturação	HIV/AIDS	Bevirimat
Inibidores da transcriptase reversa análogos a nucleosídeos	HIV/AIDS, Hepatite B	Lamivudina
Inibidores da transcriptase reversa análogos a nucleotídeos	HIV/AIDS, Hepatite B	Tenofovir
Inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídeo	HIV/AIDS	Rilpivirina
Interferon peguillado	Hepatite B/C,	Interferon

	esclerose múltipla	beta-1a
alcaloides/terpenoides vegetais	Câncer	Paclitaxel
Inibidores da protease	HIV/AIDS, Hepatite C, Outras infecções virais	Telaprevir
Radioterapia	Câncer	Braquiterapia
Inibidores da renina	Hipertensão	Alisquireno
Estatinas	Hipercolesterolemia	Atorvastatina
Inibidores da topoisomerase	Câncer	Topotecano
Antagonista do receptor da vasopressina	Hiponatremia, doença renal	Tolvaptano

[0137] As preparações farmacêuticas podem adicionalmente compreender reagentes de distribuição (mais conhecidos como “reagentes de transfecção”) e/ou excipientes. Reagentes de distribuição farmacêuticamente aceitáveis, excipientes, e métodos de preparação e uso dos mesmos, incluindo métodos para preparação e administração de preparações farmacêuticas a pacientes (mais conhecidos como “sujeitos”) são bem conhecidos na técnica, e estão estabelecidos em inúmeras publicações, incluindo, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente US N°. US 2008/0213377, cuja totalidade está incorporada por meio deste por referência.

[0138] Por exemplo, as presentes composições podem estar na forma de sais farmacêuticamente aceitáveis. Esses sais incluem aqueles listados, por exemplo, em *J. Pharma. Sci.* 66, 2-19 (1977) e *The Handbook of Pharmaceutical*

Salts; Properties, Selection, and Use. P. H. Stahl e C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Suíça) 2002, que estão incorporados por meio deste em sua totalidade por referência. Exemplos não limitantes de sais farmaceuticamente aceitáveis incluem: sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloreto, brometo, iodeto, nitrato, bissulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartarato, oleato, tanato, pantotenato, bitartarato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanossulfonato, etanossulfonato, benzenossulfonato, p-toluenossulfonato, canforsulfonato, pamoato, fenilacetato, trifluoroacetato, acrilato, clorobenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, metilbenzoato, o-acetoxibenzoato, naftaleno-2-benzoato, isobutirato, fenilbutirato, α -hidroxibutirato, butino-1,4-dicarboxilato, hexino-1,4-dicarboxilato, caprato, caprilato, cinamato, glicolato, heptanoato, hipurato, malato, hidroximaleato, malonato, mandelato, mesilato, nicotinato, ftalato, teraftalato, propiolato, propionato, fenilpropionato, sebacato, suberato, p-bromobenzenossulfonato, clorobenzenossulfonato, etilsulfonato, 2-hidroxietilsulfonato, metilsulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, naftaleno-1,5-sulfonato, xilenossulfonato, sais de tartarato, hidróxidos de metais alcalinos, tais como sódio, potássio e lítio; hidróxidos de metais alcalinos terrosos, tais como cálcio e magnésio; hidróxidos de outros metais, tais como alumínio e zinco; amônia, e aminas orgânicas, tais como mono-, di-, ou tri-alquilaminas não substituídas ou

substituídas por hidróxi, diciclohexilamina; tributil amina; piridina; N-metil, N-etilamina; dietilamina; trietilamina; mono-, bis-, ou tris-(2-OH-alquilaminas inferiores), tais como mono-, bis-, ou tris-(2-hidroxietil)amina, 2-hidroxi-terc-butilamina, ou tris-(hidroximetil)etilamina, N,N-di-alquil inferior-N-(hidroxil-alquil inferior)-aminas, tais como N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)amina ou tri-(2-hidroxietil)amina; N-metil-D-glucamina; e aminoácidos, tais como arginina, lisina, e similares.

[0139] As presente composições farmacêuticas podem compreender excipientes, incluindo líquidos, tais como água e óleos, incluindo aqueles de origem de petróleo, animal, vegetal, ou sintética, tais como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de sésamo e similares. Os excipientes farmacêuticos podem ser, por exemplo, salina, goma arábica, gelatina, pasta de amido, talco, queratina, sílica coloidal, ureia e similares. Além disso, agentes auxiliares, estabilizantes, espessantes, lubrificantes e corantes podem ser usados. Em uma modalidade, os excipientes farmacêuticamente aceitáveis são estéreis quando administrados a um sujeito. Excipientes farmacêuticos adequados também incluem amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, gel de sílica, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado seco, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e similares. Qualquer agente descrito neste documento, se desejado, também pode compreender quantidades menores de agentes umidificantes ou emulsificantes, ou agentes tamponantes de

pH.

[0140] Em várias modalidades, as composições descritas neste documento podem ser administradas numa dose eficaz, por exemplo, de cerca de 1 mg/kg a cerca de 100 mg/kg, cerca de 2,5 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, ou cerca de 5 mg/kg a cerca de 25 mg/kg. A determinação precisa do que seria considerado uma dose eficaz pode ser baseada em fatores individuais para cada paciente, incluindo seu tamanho, idade, e tipo de doença. As dosagens podem ser facilmente verificadas pelos versados na técnica a partir desta divulgação e do conhecimento da técnica. Por exemplo, as doses podem ser determinadas com referência a *Physicians' Desk Reference*, 66^a Edição, PDR Network; Edição 2012 (27 de dezembro de 2011), cujos conteúdos estão incorporados por referência em sua totalidade.

[0141] As composições ativas da presente invenção podem incluir preparações farmacêuticas clássicas. A administração dessas composições, de acordo com a presente invenção, podem ser através de qualquer via comum, desde que o tecido alvo esteja disponível através dessa via. Isso inclui oral, nasal ou bucal. Alternativamente, a administração pode ser por injeção intradérmica, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa, ou por injeção direta no tecido com câncer. Os agentes divulgados neste documento também podem ser administrados por sistemas de cateteres. Tais composições normalmente seriam administradas como composições farmacêuticamente aceitáveis conforme descrito neste documento.

[0142] Após a formulação, as soluções podem ser administradas de forma compatível com a formulação de

dosagem e em tal quantidade que seja terapeuticamente eficaz. As formulações podem ser facilmente administradas em uma variedade de formas de dosagem, tais como soluções injetáveis, cápsulas de liberação de drogas e similares. Para a administração parentérica numa solução aquosa, por exemplo, a solução geralmente é adequadamente tamponada e o diluente líquido primeiro se tornou isotônico, por exemplo, com salina ou glicose suficiente. Tais soluções aquosas podem ser usadas, por exemplo, para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. Preferencialmente, os meios aquosos estéreis são empregados como é conhecido por aqueles versados na técnica, particularmente à luz da presente divulgação.

[0143] Sujeitos ou pacientes exemplares referem-se a qualquer vertebrado, incluindo, sem limitação, humanos e outros primatas (*por exemplo*, chimpanzés e outras espécies de símios e macacos), animais de fazenda (*por exemplo*, gado, ovelha, porcos, cabras e cavalos), mamíferos domésticos (*por exemplo*, cães e gatos), animais de laboratório (*por exemplo*, roedores, tais como camundongos, ratos e porquinhos-da-Índia), e aves (*por exemplo*, aves domésticas, selvagens e de jogos, tais como galinhas, perus e outras aves galináceas, patos, gansos, e similares). Em algumas modalidades, o sujeito é um mamífero. Em algumas modalidades, o sujeito é um humano.

[0144] Esta invenção é ilustrada ainda pelos seguintes exemplos não limitantes.

EXEMPLOS

Exemplo 1 Síntese de RNA

[0145] O RNA que codifica as proteínas humanas Oct4,

Sox2, Klf4, c-Myc-2 (T58A) e Lin28 ou TALENs que se direcionam aos genes humanos XPA, CCR5, TERT, MYC, e BIRC5, e que compreendem várias combinações de nucleotídeos canônicos e não canônicos, foi sintetizado a partir de modelos de DNA usando o kit de Síntese de RNA de Alta Produção T7 e o kit de Sistema de Revestimento de Vaccinia com mRNA Cap 2'-O-Metiltransferase (todos da New England Biolabs, Inc.), de acordo com as instruções do fabricante e com as invenções anteriormente divulgadas dos presentes inventores (Pedido U.S. Nº. 13/465.490 (agora Patente U.S. Nº. 8.497.124), Pedido Provisório U.S. Nº. 61/637.570, Pedido Provisório U.S. Nº. 61/664.494, Pedido Internacional Nº. PCT/US12/67966, Pedidod Provisório U.S. Nº. 61/785.404, Pedido U.S. Nº. 13/931.251, e Pedido Provisório U.S. Nº. 61/842.874, cujos conteúdos estão incorporados em sua totalidade por meio deste por referência) (Tabela 9, **FIG. 1A**, **FIG. 1B**, e **FIG. 15**). O RNA foi então diluído com nuclease sem água para entre 100 ng/μL e 200 ng/μL. Para determinados experimentos, um inibidor de RNase (Suprase·In, Life Technologies Corporation) foi adicionado numa concentração de 1 μL/100 μg de RNA. As soluções de RNA foram armazenadas em 4°C. Para experimentos de reprogramação, o RNA que codifica Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc-2 (T58A) e Lin28 foi misturado numa razão molar de 3:1:1:1:1.

Tabela 9. Síntese de RNA

Modelo	Nucleotídeos	Volume de reação/μL	Rendimento de ivT/μg
Oct4	A, G, U, C	10	64,9
Oct4	A, G, 0,25 4sU, C	10	64,3
Oct4	A, G, 0,5 4sU, C	10	62,8

Oct4	A, G, 0,75 4sU, C	10	51,9
Oct4	A, G, 4sU, C	10	0
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,75 4sU, 0,25 piC	20	70,1
Sox2	A, 0,5 7dG, 0,75 4sU, 0,25 piC	10	29,6
Klf4	A, 0,5 7dG, 0,75 4sU, 0,25 piC	10	29,5
c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7dG, 0,75 4sU, 0,25 piC	10	25,9
Lin28	A, 0,5 7dG, 0,75 4sU, 0,25 piC	10	36,7
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,75 4sU, 0,5 piC	20	51,7
Sox2	A, 0,5 7dG, 0,75 4sU, 0,5 piC	10	23,0
Klf4	A, 0,5 7dG, 0,75 4sU, 0,5 piC	10	22,3
c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7dG, 0,75 4sU, 0,5 piC	10	21,4
Lin28	A, 0,5 7dG, 0,75 4sU, 0,5 piC	10	23,3
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,8 4sU, 0,2 5mU, 0,5 piC	20	50,8
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,7 4sU, 0,3 5mU, 0,5 piC	20	58,3
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,6 4sU, 0,4 5mU, 0,5 piC	20	58,3

Oct4	A, 0,5 7dG, 0,5 4sU, 0,5 5mU, 0,5 piC	20	68,2
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,4 4sU, 0,6 5mU, 0,5 piC	20	78,7
Oct4	A, G, psU, 5mC	10	110,4
Oct4	A, G, psU, 0,5 piC	10	85,0
Oct4	A, 0,5 7dG, psU, 0,5 piC	10	58,3
Oct4	A, 0,5 7dG, psU, 5mC	10	27,0
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,5 5mU, 0,5 piC	20	109,0
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,6 5mU, 0,5 piC	20	114,8
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,7 5mU, 0,5 piC	20	107,2
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,8 5mU, 0,5 piC	20	110,9
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,9 5mU, 0,5 piC	20	103,4
Oct4	A, 0,5 7dG, 5mU, 0,5 piC	20	97,8
Oct4	A, 0,5 7dG, psU, 0,5 piC	20	124,5
Sox2	A, 0,5 7dG, psU, 0,5 piC	20	109,0
Klf4	A, 0,5 7dG, psU, 0,5 piC	20	112,8
c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7dG, psU, 0,5 piC	20	112,8
Lin28	A, 0,5 7dG, psU, 0,5 piC	20	126,5
Oct4	A, G, psU, 5mC	20	213,4
Sox2	A, G, psU, 5mC	10	107,2
Klf4	A, G, psU, 5mC	10	106,1

c-Myc-2 (T58A)	A, G, psU, 5mC	10	97,8
Lin28	A, G, psU, 5mC	10	95,9
Oct4	A, 0,5 7dG, psU, 0,5 piC	20	124,2
Sox2	A, 0,5 7dG, psU, 0,5 piC	10	57,3
Klf4	A, 0,5 7dG, psU, 0,5 piC	10	59,6
c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7dG, psU, 0,5 piC	10	66,7
Lin28	A, 0,5 7dG, psU, 0,5 piC	10	65,2
Oct4	A, 0,5 7dG, psU, 0,3 piC	10	60,5
Sox2	A, 0,5 7dG, psU, 0,3 piC	10	58,8
Klf4	A, 0,5 7dG, psU, 0,3 piC	10	57,9
c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7dG, psU, 0,3 piC	10	62,0
Lin28	A, 0,5 7dG, psU, 0,3 piC	10	64,3
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,5 5mU, 5mC	10	64,7
Sox2	A, 0,5 7dG, 0,5 5mU, 5mC	10	62,4
Klf4	A, 0,5 7dG, 0,5 5mU, 5mC	10	75,6
c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7dG, 0,5 5mU, 5mC	10	69,4
Lin28	A, 0,5 7dG, 0,5 5mU, 5mC	10	60,7
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,5 4sU, 0,5 5mU, 5mC	10	48,3
Sox2	A, 0,5 7dG, 0,5 4sU, 0,5 5mU, 5mC	10	54,0
Klf4	A, 0,5 7dG, 0,5 4sU, 0,5 5mU, 5mC	10	58,7
c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7dG, 0,5 4sU, 0,5 5mU, 5mC	10	54,7
Lin28	A, 0,5 7dG, 0,5 4sU, 0,5 5mU, 5mC	10	54,1

Oct4	A, 0,5 7dG, 0,3 5mU, 5mC	10	69,6
Sox2	A, 0,5 7dG, 0,3 5mU, 5mC	10	69,6
Klf4	A, 0,5 7dG, 0,3 5mU, 5mC	10	87,4
c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7dG, 0,3 5mU, 5mC	10	68,1
Lin28	A, 0,5 7dG, 0,3 5mU, 5mC	10	74,3
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	71,3
Sox2	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	69,7
Klf4	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	74,8
c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	83,7
Lin28	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	69,9
XPA-L1	A, G, psU, 5mC	20	120,0
XPA-L2	A, G, psU, 5mC	20	114,0
XPA-R1	A, G, psU, 5mC	20	159,6
CCR5-L1	A, G, psU, 5mC	20	170,4
CCR5-L2	A, G, psU, 5mC	20	142,8
CCR5-R1	A, G, psU, 5mC	20	132,0
CCR5-R2	A, G, psU, 5mC	20	154,8
CCR5-L1	A, G, psU, 5mC	10	56,6
CCR5-L2	A, G, psU, 5mC	10	58,5
CCR5-R1	A, G, psU, 5mC	10	56,8
CCR5-R2	A, G, psU, 5mC	10	58,7
TERT-L	A, G, U, C	10	49,4
TERT-R	A, G, U, C	10	37,6

MYC-L	A, G, U, C	10	39,6
MYC-R	A, G, U, C	10	33,7
BIRC5-L	A, G, U, C	10	63,0
BIRC5-R	A, G, U, C	10	44,5
TERT-L	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	50,8
TERT-R	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	58,3
MYC-L	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	40,8
MYC-R	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	41,4
BIRC5-L	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	35,8
BIRC5-R	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	41,5
Oct4 (SEQ ID NO: 8)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	300	2752,0
Sox2 (SEQ ID NO: 9)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	100	965,0
Klf4 (SEQ ID NO: 10)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	100	1093,8
c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	100	1265,6
Lin28	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	100	1197,8
Oct4	A, 0,5 7dG, 0,35 5mU, 5mC	30	155,7
Sox2	A, 0,5 7dG, 0,35 5mU, 5mC	15	79,8
Klf4	A, 0,5 7dG, 0,35 5mU, 5mC	15	90,0
c-Myc-2 (T58A)	A, 0,5 7dG, 0,35 5mU, 5mC	15	83,2
Lin28	A, 0,5 7dG, 0,35 5mU, 5mC	15	74,0
APP UTR_L (Rato)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	37,9

APP UTR_R (Rato)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	40,0
APP Exon2L (Rato)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	38,6
APP Exon2R (Rato)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	37,9
APP 6L (Humano)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	43,1
APP 6R (Humano)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	43,7
APP 7L (Humano)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	42,1
APP 7R (Humano)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	36,2
APP 670L (Rato)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	27,0
APP 670R (Rato)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	28,3
APP 678L (Rato)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	30,1
APP 678R (Rato)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	26,2
APP 680L (Rato)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	8,1
APP 680R (Rato)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	25,4
APP 6L (Humano)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	40	48,6
APP 6R	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	40	48,6

(Humano)			
APP 6L (Humano)	A, G, U, C	10	54,0
APP 6R (Humano)	A, G, U, C	10	61,0
APP 6L (Humano)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	35,4
APP 6R (Humano)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	10	48,0

Exemplo 2 Transfecção de Células com RNA Sintético

[0146] Para transfecção em placas de 6 poços, 2 µg de RNA e 6 µL de reagente de transfecção (Lipofectamine RNAiMAX, Life Technologies Corporation) foram primeiro diluídos separadamente em meio de complexação (Opti-MEM, Life Technologies Corporation ou DMEM/F12 + 10 µg/mL de insulina + 5,5 µg/mL de transferrina + 6,7 ng/mL de selenito de sódio + 2 µg/mL de etanolamina) para um volume total de 60 µL cada. O RNA diluído e o reagente de transfecção foram então misturados e incubados por 15 min em temperatura ambiente, de acordo com as instruções do fabricante do reagente de transfecção. Os complexos foram então adicionados às células em cultura. Entre 30 µL e 240 µL de complexos foram adicionados à cada poço de uma placa de 6 poços, que já continha 2 mL de meio de transfecção por poço. As placas foram agitadas gentilmente para distribuir os complexos por todo o poço. As células foram incubadas com os complexos por 4 horas durante a noite, antes de substituir o meio por meio de transfecção fresco (2

mL/poço). Os volumes foram aumentados em escala para a transfecção em placas de 24 poços e de 96 poços. Alternativamente, entre 0,5 µg e 5 µg de RNA e entre 2-3 µL de reagente de transfecção (Lipofectamine 2000, Life Technologies Corporation) por µg de RNA foram primeiro diluídos separadamente em meio de complexação (Opti-MEM, Life Technologies Corporation ou DMEM/F12 + 10 µg/mL de insulina + 5,5 µg/mL de transferrina + 6,7 ng/mL de selenito de sódio + 2 µg/mL de etanolamina) para um volume total de entre 5 µL e 100 µL cada. O RNA diluído e o reagente de transfecção foram então misturados e incubados por 10 min em temperatura ambiente. Os complexos foram então adicionados às células em cultura. Entre 10 µL e 200 µL de complexos foram adicionados à cada poço de uma placa de 6 poços, que já continha 2 mL de meio de transfecção por poço. Em determinados experimentos, DMEM + 10% FBS ou DMEM + 50% FBS foi usado no lugar do meio de transfecção. As placas foram agitadas gentilmente para distribuir os complexos por todo o poço. As células foram incubadas com os complexos por 4 horas durante a noite. Em determinados experimentos, o meio foi substituído por meio de transfecção fresco (2 mL/poço) 4h ou 24h após a transfecção.

Exemplo 3 Toxicidade e Tradução de Proteína a partir de RNA Sintético Contendo Nucleotídeos Não Canônicos

[0147] Os fibroblastos primários humanos foram transfectados de acordo com o Exemplo 2, usando RNA sintetizado de acordo com o Exemplo 1. As células foram fixadas e coradas 20-24h após a transfecção usando um anticorpo contra Oct4. A toxicidade relativa do RNA foi determinada, avaliando-se a densidade celular no momento da

fixação.

Exemplo 4 Formulação do Meio de Transfecção

[0148] Um meio de cultura celular foi desenvolvido para suportar a transfecção eficiente das células com os ácidos nucleicos e reprogramação eficiente ("meio de transfecção"):

[0149] DMEM/F12 + 15 mM HEPES + 2 mM L-alanil-L-glutamina + 10 µg/mL de insulina + 5,5 µg/mL de transferrina + 6,7 ng/mL de selenito de sódio + 2 µg/mL de etanolamina + 50 µg/mL de hidrato de sal de 2-fosfato sesquimagnésio de ácido L-ascórbico + 4 µg/mL de colesterol + 1 µM hidrocortisona + 25 µg/mL de mono-oleato de polioxietilenossorbitano + 2 µg/mL de acetato de D-alfa-tocoferol + 20 ng/mL de bFGF + 5 mg/mL de albumina de soro humano tratado.

[0150] Uma variante deste meio foi desenvolvida para suportar uma cultura de longo prazo forte de uma variedade de tipos celulares, incluindo células-tronco pluripotentes ("meio de manutenção"):

[0151] DMEM/F12 + 2 mM L-alanil-L-glutamina + 10 µg/mL de insulina + 5,5 µg/mL de transferrina + 6,7 ng/mL de selenito de sódio + 2 µg/mL de etanolamina + 50 µg/mL de hidrato de sal de 2-fosfato sesquimagnésio de ácido L-ascórbico + 20 ng/mL de bFGF + 2 ng/mL de TGF-β1.

[0152] O meio de transfecção, no qual a albumina de soro humano tratada, foi tratado pela adição de 32 mM de octanoato de sódio, seguido pelo aquecimento a 60°C por 4h, seguido pelo tratamento com resina de troca iônica (AG501-X8(D), Bio-Rad Laboratories, Inc.) por 6h em temperatura ambiente, seguido pelo tratamento com carvão ativado

revestido por dextrano (C6241, Sigma-Aldrich Co. LLC.) durante a noite em temperatura ambiente, seguido por centrifugação, filtração, ajuste para uma solução a 10% com nuclease sem água, seguido pela adição aos outros componentes do meio, foi usado como o meio de transfecção em todos os Exemplos descritos neste documento, a menos que observado de outra forma. Para os experimentos de reprogramação, as células foram plaqueadas em placas não revestidas em DMEM + 10%-20% de soro ou em placas revestidas com fibronectina e vitronectina no meio de transfecção, a menos que observado de outra forma. O meio de transfecção não foi condicionado, a menos que observado de outra forma. É reconhecido que a formulação do meio de transfecção pode ser ajustada para atender as necessidades dos tipos celulares específicos sendo cultivados. É reconhecido ainda que a albumina de soro humano tratada pode ser substituída por outra albumina tratada, por exemplo, albumina de soro bovino tratada, sem afetar negativamente a realização do meio. É reconhecido ainda que outras fontes de glutamina podem ser usadas em vez de, ou em adição à L-alanil-L-glutamina, por exemplo, L-glutamina, que outros sistemas tamponantes podem ser usados em vez de, ou em adição a HEPES, por exemplo, fosfato, bicarbonato, etc., que selênio pode ser fornecido em outras formas em vez de, ou em adição ao selenito de sódio, por exemplo, ácido selenoso, que outros antioxidantes podem ser usados em vez de, ou em adição ao hidrato de sal de 2-fosfato sesquimagnésio de ácido L-ascórbico e/ou acetato de D-alfa-tocoferol, por exemplo, ácido L-ascórbico, que outros surfactantes podem ser usados em vez de, ou em adição ao

mono-oleato de polioxietilenossorbitano, por exemplo, Plurônico F-68 e/ou Plurônico F-127, que outros meios de base podem ser usados em vez de, ou em adição ao DMEM/F12, por exemplo, MEM, DMEM, etc., e que os componentes do meio de cultura podem ser variados com o tempo, por exemplo, usando um meio sem TGF- β do dia 0 ao dia 5, e em seguida usando um meio contendo 2 ng/mL de TGF- β após o dia 5, sem afetar negativamente a realização do meio. É reconhecido ainda que outros ingredientes podem ser adicionados, por exemplo, ácidos graxos, ácido lisofosfatídico, lisosfingomielina, esfingosina-1-fosfato, outros esfingolipídeos, inibidores de ROCK, incluindo Y-27632 e tiazovivina, membros da família de proteínas TGF- β /NODAL, IL-6, membros da família de proteínas Wnt, etc., em concentrações apropriadas, sem afetar negativamente a performance do meio, e que os ingredientes que são conhecidos por promover ou inibir o crescimento de tipos celulares específicos e/ou agonistas e/ou antagonistas de proteínas ou outras moléculas, que são conhecidas por promover ou inibir o crescimento de tipos celulares específicos, podem ser adicionados ao meio em concentrações apropriadas quando eles são usados com aqueles tipos celulares sem afetar negativamente a performance do meio, por exemplo, esfingosina-1-fosfato e células-tronco pluripotentes. A presente invenção refere-se igualmente a ingredientes que são adicionados como compostos purificados, a ingredientes que são adicionados como partes de misturas bem definidas, a ingredientes que são adicionados como partes de complexos ou misturas indefinidas, por exemplo, óleos animais ou vegetais, e a ingredientes que são

adicionados por processos biológicos, por exemplo, condicionamento. As concentrações dos componentes podem ser variadas a partir dos valores listados dentro de intervalos que estarão óbvios para os versados na técnica, sem afetar negativamente a performance do meio. Uma versão sem componente animal do meio foi produzida usando versões recombinantes de todos os ingredientes de proteína, e versões derivadas de não animal de todos os outros componentes, incluindo colesterol derivado de planta semissintético (Avanti Polar Lipids, Inc.).

Exemplo 5 Reprogramação de Fibroblastos Humanos Usando RNA Sintético Contendo Nucleotídeos Não Canônicos

[0153] Os fibroblastos neonatais primários humanos foram plaqueados em placas de 6 poços revestidas com fibronectina humana recombinante e vitronectina humana recombinante (cada uma diluída em DMEM/F12 para uma concentração de 1 µg/mL, 1 mL/poço, e incubadas em temperatura ambiente por 1h) numa densidade de 10.000 células/poço no meio de transfecção. No dia seguinte, as células foram transfectadas como no Exemplo 2, usando RNA contendo A, 0,5 7dG, 0,5 5mU, e 5mC, e uma dose de RNA de 0,5 µg/poço no dia 1, 0,5 µg/poço no dia 2, 2 µg/poço no dia 3, 2 µg/poço no dia 4, e 4 µg/poço no dia 5. Pequenas colônias de células exibindo morfologia consistente com a reprogramação se tornaram visíveis já no dia 5. O médio foi substituído pelo meio de manutenção no dia 6. As células foram coradas usando um anticorpo contra Oct4. Colônias de células positivas para Oct4 exibindo uma morfologia consistente com a reprogramação foram visíveis por todo o poço (**FIG. 2**).

Exemplo 6 Reprogramação sem Alimentador, sem Passagem, sem Imunossupressor, sem Condicionamento de Fibroblastos Adultos Primários Humanos Usando RNA Sintético

[0154] Os poços de uma placa de 6 poços foram revestidos com uma mistura de fibronectina humana recombinante e vitronectina humana recombinante (1 µg/mL em DMEM/F12, 1 mL/poço) por 1h em temperatura ambiente. Os fibroblastos adultos primários humanos foram plaqueados nos poços revestidos no meio de transfecção numa densidade de 10.000 células/poço. As células foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, e 5% de O₂. Começando no dia seguinte, as células foram transfectadas de acordo com o Exemplo 2 diariamente por 5 dias com RNA sintetizado de acordo com o Exemplo 1. A quantidade total de RNA transfectado em cada um dos 5 dias foi de 0,5 µg, 0,5 µg, 2 µg, 2 µg, e 4 µg, respectivamente. Começando com a quarta transfecção, o meio foi substituído duas vezes por dia. No dia seguinte à transfecção final, o meio foi substituído pelo menos de transfecção, suplementado com 10 µM de Y-27632. Colônias de células compactas com uma morfologia reprogramada foram visíveis em cada poço transfectado no dia 4 (**FIG. 8**).

Exemplo 7 Derivação e Reprogramação de Células Rápida e Eficiente a partir de Tecido de Biópsia de Pele Adulta Humana

[0155] Uma biópsia de punção dérmica de espessura total foi realizada em um voluntário saudável de 31 anos de idade, de acordo com um protocolo aprovado. Brevemente, uma área da pele no braço superior esquerdo foi anestesiada por aplicação tópica de lidocaína 2,5%. O campo foi desinfectado com isopropanol 70%, e uma biópsia dérmica de

espessura total foi realizada usando uma punção de 1,5 mm de diâmetro. O tecido foi lavado em salina tamponada com fosfato (PBS), foi colocado em um tubo de 1,5 mL contendo 250 µL de TrypLE Select CTS (Life Technologies Corporation), e foi incubado a 37°C por 30 min. O tecido foi em seguida transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 250 µL de DMEM/F12-CTS (Life Technologies Corporation) + 5 mg/mL de collagenase, e foi incubado a 37°C por 2h. A epiderme foi removida usando fórceps, e o tecido foi mecanicamente dissociado. As células foram lavadas em DMEM/F12-CTS. Flebotomia também foi realizada no mesmo voluntário, e sangue venoso foi coletado em tubos Vacutainer SST (Becton, Dickinson and Company). O soro foi isolado de acordo com as instruções do fabricante. O meio de plaqueamento isogênico foi preparado, misturado-se DMEM/F12-CTS + 2 mM L-alanil-L-glutamina (Sigma-Aldrich Co. LLC.) + 20% de soro humano. As células da amostra de tecido dérmico foram plaqueadas em um poço revestido com fibronectina de uma placa de 6 poços no meio de plaqueamento isogênico. Muitas células com uma morfologia de fibroblasto foram fixadas e começaram a se espalhar no dia 2 (**FIG. 3A**). As células foram expandidas e congeladas em Synth-a-Freeze (Life Technologies Corporation).

[0156] As células foram passadas em placas de 6 poços numa densidade de 5.000 células/poço. No dia seguinte, o meio foi substituído pelo meio de transfecção, e as células foram transfectadas como no Exemplo 2, usando RNA contendo A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, e 5mC, e uma dose de RNA de 0,5 µg/poço no dia 1, 0,5 µg/poço no dia 2, 2 µg/poço no dia 3, 2 µg/poço no dia 4, e 2 µg/poço no dia 5.

Determinados poços receberam transfecções adicionais de 2 µg/poço no dia 6 e dia 7. Além disso, determinados poços receberam 2 ng/mL de TGF-β1 a partir do dia 4 em diante. O médio foi substituído pelo meio de manutenção no dia 6. As colônias de células exibindo morfologia consistente com a reprogramação se tornaram visíveis entre o dia 5 e dia 10 (**FIG. 3B**). As colônias cresceram rapidamente, e muitas exibiram uma morfologia semelhante àquela das colônias de células-tronco embrionárias (**FIG. 3C**). As colônias foram selecionadas e plaqueadas em poços revestidos com fibronectina humana recombinante e vitronectina humana recombinante (cada uma diluída em DMEM/F12 para uma concentração de 1 µg/mL, 1 mL/poço, incubadas em temperatura ambiente por 1h). Células cresceram rapidamente e foram passadas para estabelecer as linhagens.

Exemplo 8 Síntese de RiboSlice Direcionado a CCR5

[0157] Pares de RiboSlice direcionados às seguintes sequências: L1: TCATTTTCCATACAGTCAGT, L2: TTTTCCATACAGTCAGTATC, R1: TGA CTATCTTTAATGTCTGG, e R2: TATCTTTAATGTCTGGAAAT foram sintetizados de acordo com o Exemplo 1 (**FIG. 4A** e **FIG. 4B**). Esses pares se direcionam aos sítios de 20-bp dentro do gene de CCR5 humano na fita sense (L1 e L2) ou antisense (R1 e R2). Os seguintes pares foram preparados: L1&R1, L1&R2, L2&R1, e L2&R2.

Exemplo 9 Medição da Eficácia da Edição Gênica de CCR5 Usando uma Nuclease de Detecção de Não Correspondência

[0158] Os fibroblastos primários humanos foram plaqueados em placas de 6 poços revestidas com fibronectina humana recombinante e vitronectina humana recombinante (cada uma diluída em DMEM/F12 para uma concentração de 1

µg/mL, 1 mL/poço, e incubadas em temperatura ambiente por 1h) numa densidade de 10.000 células/poço no meio de transfecção. No dia seguinte, as células foram transfectadas como no Exemplo 2 com RNA sintetizado de acordo com o Exemplo 8. Dois dias após a transfecção, o DNA genômico foi isolado e purificado. Uma região dentro do gene de CCR5 foi amplificada por PCR usando os iniciadores F: AGCTAGCAGCAAACCTTCCCTTCA e R: AAGGACAATGTTGTAGGGAGCCCA. 150 ng do produto de PCR amplificado foram hibridizados com 150 ng de DNA de referência em 10 mM Tris-Cl + 50 mM KCl + 1,5 mM MgCl₂. O DNA hibridizado foi tratado com uma endonuclease de detecção de não correspondência (SURVEYOR nuclease, Transgenomic, Inc.) e os produtos resultantes foram analisados por eletroforese em gel de agarose (**FIG. 4C** e **FIG. 4D**).

Exemplo 10 Edição Gênica de Alta Eficiência por Transfecção Repetida com RiboSlice

[0159] Os fibroblastos primários humanos foram plaqueados como no Exemplo 9. No dia seguinte, as células foram transfectadas como no Exemplo 2 com RNA sintetizado de acordo com o Exemplo 8. As células do dia seguinte em um dos poços foram transfectadas uma segunda vez. Dois dias após a segunda transfecção, a eficácia da edição gênica foi medida como no Exemplo 9 (**FIG. 4E**).

Exemplo 11 Edição Gênica de CCR5 Usando RiboSlice e Reprogramação sem DNA, sem Alimentador, sem Imunossupressor, sem Condicionamento de Fibroblastos Humanos

[0160] Os fibroblastos primários humanos foram plaqueados como no Exemplo 9. No dia seguinte, as células foram transfectadas como no Exemplo 2 com RNA sintetizado

de acordo com o Exemplo 8. Aproximadamente 48h depois, as células foram reprogramadas de acordo com o Exemplo 5, usando o RNA sintetizado de acordo com o Exemplo 1. Colônias de células grandes com uma morfologia característica de reprogramação se tornaram visíveis como no Exemplo 5 (**FIG. 4F**). Colônias foram selecionadas para estabelecer as linhagens. As linhagens celulares foram submetidas ao sequenciamento direto para confirmar a edição gênica bem sucedida (**FIG. 4G**).

Exemplo 12 Terapia de Substituição Celular Personalizada para HIV/AIDS Compreendendo Células Reprogramadas Editadas Geneticamente

[0161] As células de pele do paciente são editadas geneticamente e reprogramadas a células hematopoiéticas de acordo com as invenções anteriormente divulgadas dos presentes inventores (Pedido U.S. N°. 13/465.490, Pedido Provisório U.S. N°. 61/637.570, e Pedido Provisório U.S. N°. 61/664.494) e/ou Exemplo 11. As células são então enzimaticamente liberadas do recipiente de cultura, e as células CD34+/CD90+/Lin- ou CD34+/CD49f+/Lin- são isoladas. Entre cerca de 1×10^3 e cerca de 1×10^5 células são infundidas numa veia principal do paciente. As células hematopoiéticas retornam à cavidade da medula óssea e se prendem (engraft).

Exemplo 13 Produção de Células-Tronco Embrionárias de Rato Inativadas por APP

[0162] As células-tronco embrionárias de rato são plaqueadas em placas de 6 poços numa densidade de 10.000 células/poço no meio de células-tronco de rato. No dia seguinte, as células são transfectadas como no Exemplo 2

com 0,5 µg/poço de RiboSlice sintetizado de acordo com o Exemplo 1 direcionadas às seguintes sequências: L: TTCTGTGGTAAACTCAACAT e R: TCTGACTCCCATTTCATT (0,25 µg de L e 0,25 µg de R).

Exemplo 14 Produção de Ratos Nocaute para APP Usando Células-Tronco Embrionárias de Rato Inativadas por APP

[0163] As células-tronco embrionárias de rato são editoras gênicas, de acordo com o Exemplo 13, e microinjetadas em blastocistos de rato. Os blastocistos microinjetados são em seguida transferidos para uma rata fêmea pseudográvida.

Exemplo 15 Produção de Embriões Inativados por APP para a Geração de Ratos Nocaute

[0164] Par de RiboSlice direcionados às seguintes sequências: L: TTCTGTGGTAAACTCAACAT e R: TCTGACTCCCATTTCATT é sintetizado de acordo com o Exemplo 1. RiboSlice numa concentração de 5 µg/µL é injetado no pronúcleo ou citoplasma de um embrião de rato no estágio celular 1. O embrião é então transferido para uma rata fêmea pseudográvida.

Exemplo 16 Transfecção de Células com RNA Sintético Contendo Nucleotídeos Não Canônicos e DNA Codificante de um Modelo de Reparo

[0165] Para a transfecção em placas de 6 poços, 1 µg de RNA que codifica proteínas de edição gênica direcionado ao éxon 16 do gene de APP humano, 1 µg de DNA modelo de reparo de fita única contendo um sítio de restrição de PstI que não estava presente nas células alvo, e 6 µL de reagente de transfecção (Lipofectamine RNAiMAX, Life Technologies Corporation) foram primeiro diluídos

separadamente no meio de complexação (Opti-MEM, Life Technologies Corporation) para um volume total de 120 µL. O RNA diluído, o modelo de reparo e o reagente de transfecção foram então misturados e incubados por 15 min em temperatura ambiente, de acordo com as instruções do fabricante do reagente de transfecção. Os complexos foram adicionados às células em cultura. Aproximadamente, 120 µL dos complexos foram adicionados à cada poço de uma placa de 6 poços, que já continha 2 mL de meio de transfecção por poço. As placas foram agitadas gentilmente para distribuir os complexos por todo o poço. As células foram incubadas com os complexos por 4 horas durante a noite, antes de substituir o meio por meio de transfecção fresco (2 mL/poço). No dia seguinte, o meio foi trocado para DMEM + 10% FBS. Dois dias após a transfecção, o DNA genômico foi isolado e purificado. Uma região dentro do gene de APP foi amplificada por PCR, e o produto amplificado foi digerido com PstI e analisado por eletroforese em gel (**FIG. 16**).

Exemplo 17 Inserção de um Transgene em Células-Tronco Embrionárias de Rato em uma Localização Segura

[0166] As células-tronco embrionárias de rato são plaqueadas em placas de 6 poços numa densidade de 10.000 células/poço no meio de células-tronco de rato. No dia seguinte, as células são transfectadas como no Exemplo 13 com RiboSlice direcionado às seguintes sequências: L: TATCTTCCAGAAAGACTCCA e R: TTCCCTTCCCCCTTCTTCCC, sintetizadas de acordo com o Exemplo 1, e um modelo de reparo contendo um transgene flanqueado por duas regiões com cada uma contendo aproximadamente 400 bases de homologia à região ao redor do locus Rosa26 do rato.

Exemplo 18 LRRK2 Humanizado de Rato

[0167] As células-tronco embrionárias de rato são plaqueadas e transfectadas como no Exemplo 13 com RiboSlice direcionadas às seguintes sequências: L: TTGAAGGCAAAAATGTCCAC e R: TCTCATGTAGGAGTCCAGGA, sintetizadas de acordo com o Exemplo 1. Dois dias após a transfecção, as células são transfectadas de acordo com o Exemplo 17, em que o transgene contém o gene de LRRK2 humano, e, opcionalmente, parte ou toda a região promotora de LRRK2 humano.

Exemplo 19 inserção de um Transgene em Fibroblastos Humanos numa Localização Segura

[0168] Os fibroblastos primários humanos são plaqueados como no Exemplo 9. No dia seguinte, as células são transfectadas como no Exemplo 2 com RiboSlice direcionado às seguintes sequências: L: TTATCTGTCCCCTCCACCCC e R: TTTTCTGTCACCAATCCTGT, sintetizadas de acordo com o Exemplo 1, e um modelo de reparo contendo um transgene flanqueado por duas regiões com cada uma contendo aproximadamente 400 bases de homologia à região ao redor do locus de AAVS1 humano.

Exemplo 20 Inserção de uma Sequência de RNAi numa Localização Segura

[0169] Os fibroblastos primários humanos são plaqueados e transfectados de acordo com o Exemplo 19, e que o transgene contém uma sequência que codifica um shRNA, precedida pelo promotor PolIII.

Exemplo 21 Edição Gênica de Myc usando RiboSlice

[0170] Os fibroblastos primários humanos foram plaqueados em placas de 6 poços numa densidade de 50.000

células/poço em DMEM + 10% FBS. Dois dias depois, o meio foi trocado para o meio de transfecção. Quatro horas depois, as células foram transfectadas como no Exemplo 2 com 1 µg/poço de RiboSlice direcionadas às seguintes sequências: L: TCGGCCGCCGCCAAGCTCGT e R: TGC GCGCAGCCTGGTAGGAG, sintetizadas de acordo com o Exemplo 1. No dia seguinte, a eficácia da edição gênica foi medida como no Exemplo 9 usando os seguintes iniciadores: F: TAACTCAAGACTGCCTCCCGCTTT e R: AGCCCAAGGTTTCAGAGGTGATGA (**FIG. 5**).

Exemplo 22 Terapia de Câncer Compreendendo RiboSlice Direcionado a Myc

[0171] As células de carcinoma cervical HeLa foram plaqueadas em placas de 6 poços numa densidade de 50.000 células/poço em DMEM sem folato + 2 mM L-alanil-L-glutamina + 10% FBS. No dia seguinte, o meio foi trocado para o meio de transfecção. No dia seguinte, as células foram transfectadas como no Exemplo 21.

Exemplo 23 Edição Gênica de BIRC5 usando RiboSlice

[0172] Os fibroblastos primários humanos foram plaqueados em placas de 6 poços numa densidade de 50.000 células/poço em DMEM + 10% FBS. Dois dias depois, o meio foi trocado para o meio de transfecção. Quatro horas depois, as células foram transfectadas como no Exemplo 2 com 1 µg/poço de RiboSlice direcionadas às seguintes sequências: L: TTGCCCCCTGCCTGGCAGCC e R: TTCTTGAATGTAGAGATGCG, sintetizadas de acordo com o Exemplo 1. No dia seguinte, a eficácia da edição gênica foi medida como no Exemplo 9 usando os seguintes iniciadores: F: GCGCCATTAACCGCCAGATTTGAA e R: TGGGAGTTCACAACAACAGGGTCT (**FIG.**

6).

Exemplo 24 Terapia de Câncer Compreendendo RiboSlice Direcionado a BIRC5

[0173] As células de carcinoma cervical HeLa foram plaqueadas em placas de 6 poços numa densidade de 50.000 células/poço em DMEM sem folato + 2 mM L-alanil-L-glutamina + 10% FBS. No dia seguinte, o meio foi trocado para o meio de transfecção. No dia seguinte, as células foram transfectadas como no Exemplo 23 (**FIG. 7A** e **FIG. 7B**).

Exemplo 25 Cultura de Linhagens Celulares de Câncer

[0174] As linhagens celulares de câncer HeLa (carcinoma cervical), MDA-MB-231 (mama), HCT 116 (cólon), U87 MG (glioma), e U-251 (glioma) foram propagadas na cultura. As células foram cultivadas em DMEM + 10% FBS ou DMEM + 50% FBS e mantidas em 37°C, 5% de CO₂, e o ambiente tanto com O₂ ou 5% de O₂. As células cresceram rapidamente sob todas as condições, e foram rotineiramente passadas a cada 2 a 5 dias usando uma solução de tripsina em HBSS.

Exemplo 26 Processo de Algoritmo de Design de RNA de Edição Gênica com RiboSlice

[0175] A sequência de DNA anotada do gene de BIRC5 foi obtida pelo NCBI usando a utilidade eFetch e um script python. O mesmo script python foi usado para identificar as sequências de DNA que codificam a proteína dentro de cada um dos quatro éxons do gene de BIRC5. O script então procurou essas sequências e as 40 bases que flanqueiam cada lado, para os elementos de sequência que satisfaçam as seguintes condições: (i) um elemento existe na fita primária, o outro na fita complementar, (ii) cada elemento começa com um T, e (iii) os elementos são separados por não

menos que 12 bases e não mais que 20 bases. A cada elemento foi então atribuída uma pontuação representando sua probabilidade de se ligar a outros elementos dentro do genoma humano usando o Qblast (NCBI). Esta pontuação foi calculada como a soma do inverso dos nove valores E mais baixos, excluindo-se a correspondência à sequência alvo. Pontuações de pares foram calculadas, adicionando-se as pontuações para os elementos individuais.

Exemplo 27 Síntese de RNA Codificador de Proteínas de Edição Gênica (RiboSlice)

[0176] O RNA que codifica as proteínas de edição gênica foi projetado de acordo com o Exemplo 26, e sintetizado de acordo com o Exemplo 1 (Tabela 10, **FIG. 9**). O RNA foi diluído com nuclease sem água para entre 200 ng/μL e 500 ng/μL, e foi armazenado a 4°C.

Tabela 10. Síntese de RiboSlice

Modelo (SEQ ID do Sítio de Ligação)	Nucleotídeos	Volume de reação/μL	Rendimento de ivT/μg
BIRC5-1.1L (SEQ ID NO: 16)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	124,1
BIRC5-1.1R (SEQ ID NO: 17)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	115,6
BIRC5-1.2L (SEQ ID NO: 18)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	120,3
BIRC5-1.2R (SEQ ID NO: 19)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	121,3
BIRC5-1.3L (SEQ ID NO: 20)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	120,3
BIRC5-1.3R	A, 0,5 7dG, 0,4	20	113,7

(SEQ ID NO: 21)	5mU, 5mC		
BIRC5-2.1L	A, 0,5 7dG, 0,4		
(SEQ ID NO: 22)	5mU, 5mC	20	105,3
BIRC5-2.1R	A, 0,5 7dG, 0,4		
(SEQ ID NO: 23)	5mU, 5mC	20	120,3
BIRC5-2.2L	A, 0,5 7dG, 0,4		
(SEQ ID NO: 24)	5mU, 5mC	20	101,5
BIRC5-2.2R	A, 0,5 7dG, 0,4		
(SEQ ID NO: 25)	5mU, 5mC	20	111,9
BIRC5-3.1L	A, 0,5 7dG, 0,4		
(SEQ ID NO: 26)	5mU, 5mC	20	107,2
BIRC5-3.1R	A, 0,5 7dG, 0,4		
(SEQ ID NO: 27)	5mU, 5mC	20	113,7
BIRC5-2.1L	A, 0,5 7dG, 0,35		
(SEQ ID NO: 22)	5mU, 5mC	300	577,9
BIRC5-2.1R	A, 0,5 7dG, 0,35		
(SEQ ID NO: 23)	5mU, 5mC	300	653,6

Exemplo 28 Análise da Atividade do RiboSlice Direcionado a BIRC5

[0177] Os fibroblastos adultos primários humanos foram transfectados de acordo com o Exemplo 2 com 6 pares de RiboSlice direcionados a BIRC5, projetados de acordo com o Exemplo 26, e sintetizados de acordo com o Exemplo 27. Dois dias após a transfecção, o DNA genômico foi isolado e purificado. Para medir a eficiência da edição gênica, 150 ng do produto de PCR foi hibridizado com 150 ng de DNA de referência em 10 mM Tris-Cl + 50 mM KCl + 1,5 mM MgCl₂. O DNA hibridizado foi tratado com a endonuclease específica para não correspondência SURVEYOR (Transgenomic, Inc.), e

os produtos resultantes foram analisados por eletroforese em gel de agarose (**FIG. 10A**). Todos os seis pares de RiboSlice testados editaram eficientemente o gene de BIRC5, como demonstrado pela aparição de bandas dos tamanhos esperados (asteriscos na **FIG. 10A**).

Exemplo 29 Análise da Inibição da Mitose de RiboSlice Direcionado a BIRC5

[0178] Os fibroblastos adultos primários humanos foram editados geneticamente de acordo com o Exemplo 28, e foram em seguida propagados em cultura. Após 11 dias, o DNA genômico foi isolado e purificado, e a eficácia da edição gênica foi medida como no Exemplo 28 (**FIG. 10B**). Nenhum dos pares de RiboSlice testados inibiu a proliferação dos fibroblastos, como mostrado pela aparição de bandas dos tamanhos esperados (asteriscos na **FIG. 10B**) no DNA genômico isolado das células proliferantes, demonstrando a baixa toxicidade a fibroblastos normais desses pares de RiboSlice.

Exemplo 30 Análise da Atividade Anticâncer do RiboSlice Direcionado a BIRC5

[0179] Os fibroblastos adultos primários humanos e as células de carcinoma cervical HeLa, cultivadas de acordo com o Exemplo 25, foram transfectadas com pares de RiboSlice de acordo com o Exemplo 28. A proliferação dos fibroblastos diminui brevemente devido à toxicidade associada ao reagente de transfecção, mas se recuperou dentro de 2 dias de transfecção. Em contraste, a proliferação de células HeLa diminui consideravelmente, e muitas células alargadas com núcleos fragmentados foram observadas nos poços transfectados. Após 2 a 3 dias, muitas células exibiram morfologia indicativa de apoptose,

demonstrando a potente atividade anticâncer do RiboSlice direcionado a BIRC5.

Exemplo 31 Estudo de Segurança in vivo de RiboSlice

[0180] 40 camundongos NCr nu/nu fêmeas foram injetadas por via subcutânea com 5×10^6 células tumorais MDA-MB-231 em Matrigel 50% (BD Biosciences). O volume de injeção celular foi de 0,2 mL/camundongo. A idade dos camundongos no início do estudo era de 8 a 12 semanas. Uma correspondência de par foi realizada, e os animais foram divididos em 4 grupos de 10 animais cada quando os tumores atingiram um tamanho médio de 100-150 mm³, e o tratamento foi iniciado. O peso corporal foi medido todos os dias pelos primeiros 5 dias, e então quinzenalmente até o fim do estudo. O tratamento consistia em RiboSlice BIRC5-1.2 complexado com um veículo (Lipofectamine 2000, Life Technologies Corporation). Para preparar a solução de dosagem para cada grupo, 308 µL de tampão de complexação (Opti-MEM, Life Technologies Corporation) foram pipetados em cada um de dois tubos estéreis de 1,5 mL sem RNase. 22 µL de RiboSlice BIRC5-1.2 (500 ng/µL) foram adicionados a um dos dois tubos, e os conteúdos do tubo foram misturados por pipetagem. 22 µL do veículo foram adicionados ao segundo tubo. O conteúdo do segundo tubo foram misturados e, em seguida, transferidos para o primeiro tubo, e misturados com os conteúdos do primeiro tubo por pipetagem para formar os complexos. Os complexos foram incubados à temperatura ambiente por 10 min. Durante a incubação, as seringas foram carregadas. Os animais foram injetados tanto por via intravenosa quanto por via intratumoral com uma dose total de 1 µg de RNA/animal em 60 µL de volume total/animal. Um

total de 5 tratamentos foi dado, com injeções realizadas dia sim, dia não. As doses não foram ajustadas para o peso corporal. Os animais foram acompanhados por 17 dias. Nenhuma redução significativa no peso corporal médio foi observada (**FIG. 11**; RiboSlice BIRC5-1.2 é marcado como “ZK1”), demonstrando a segurança *in vivo* do RNA de edição gênica RiboSlice.

Exemplo 32 Análise da Atividade Anticâncer do RiboSlice Direcionado a BIRC5 em um Modelo de Glioma

[0181] A linhagem celular de glioma U-251, cultivada de acordo com o Exemplo 25, foi transfectada com pares de RiboSlice de acordo com o Exemplo 28. As células de glioma responderam ao tratamento de forma semelhante às células HeLa: a proliferação diminuiu consideravelmente, e muitas células alargadas com núcleos fragmentados foram observadas nos poços transfectados. Após 2 a 3 dias, muitas células exibiram morfologia indicativa de apoptose, demonstrando a potente atividade anticâncer do RiboSlice direcionado a BIRC5 em um modelo de glioma.

Exemplo 33 Triagem dos Reagentes para Distribuição dos Ácidos Nucleicos às Células

[0182] Os reagentes de distribuição incluindo a polietilenoimina (PEI), vários reagentes de transfecção à base de lipídio comerciais, um reagente de transfecção à base de peptídeo (N-TER, Sigma-Aldrich Co. LLC.), e diversos reagentes de distribuição à base de lipídio e à base de esteroide foram triados para a eficácia da transfecção e toxicidade *in vitro*. Os reagentes de distribuição foram complexados com RiboSlice BIRC5-1.2, e os complexos foram distribuídos às células HeLa, cultivadas

de acordo com o Exemplo 25. A toxicidade foi avaliada, analisando-se a densidade celular 24h após a transfecção. A eficácia de transfecção foi avaliada, analisando-se as alterações morfológicas, como descrito no Exemplo 30. Os reagentes testados exibiram uma ampla faixa de toxicidades e eficácias de transfecção. Os reagentes contendo uma maior proporção de ligações éster exibiram toxicidades mais baixas do que os reagentes contendo uma menor proporção de ligações éster ou sem nenhuma ligação éster.

Exemplo 34 RiboSlice Lipossômico de Alta Concentração

[0183] RiboSlice Lipossômico de Alta Concentração foi preparado, misturando-se 1 µg de RNA em 500 ng/µL com 3 µL de meio de complexação (Opti-MEM, Life Technologies Corporation), e 2,5 µL de reagente de transfecção (Lipofectamine 2000, Life Technologies Corporation) por µg de RNA com 2,5 µL de meio de complexação. O RNA diluído e o reagente de transfecção foram então misturados e incubados por 10 min em temperatura ambiente para formar o RiboSlice Lipossômico de Alta Concentração. Alternativamente, um reagente de transfecção contendo DOSPA ou DOSPER é usado.

Exemplo 35 Estudo de Eficácia de RiboSlice In Vivo - Modelo de Glioma Subcutâneo

[0184] 40 camundongos NCr nu/nu fêmeas foram injetados por via subcutânea com 1×10^7 células tumorais U-251. O volume de injeção celular foi de 0,2 mL/camundongo. A idade dos camundongos no início do estudo era de 8 a 12 semanas. Uma correspondência de par foi realizada, e os animais foram divididos em 4 grupos de 10 animais cada quando os tumores atingiram um tamanho médio de 35-50 mm³, e o tratamento foi iniciado. O peso corporal foi medido

todos os dias pelos primeiros 5 dias, e então quinzenalmente até o fim do estudo. Medições de calibre foram feitas quinzenalmente, e o tamanho do tumor foi calculado. O tratamento consistia em RiboSlice BIRC5-2.1 complexado com um veículo (Lipofectamine 2000, Life Technologies Corporation). Para preparar a solução de dosagem, 294 µL de tampão de complexação (Opti-MEM, Life Technologies Corporation) foram pipetados em um tubo contendo 196 µL de RiboSlice BIRC5-1.2 (500 ng/µL), e os conteúdos do tubo foram misturados por pipetagem. 245 µL de tampão de complexação foram pipetados em um tubo contendo 245 µL do veículo. O conteúdo do segundo tubo foram misturados e, em seguida, transferidos para o primeiro tubo, e misturados com os conteúdos do primeiro tubo por pipetagem para formar os complexos. Os complexos foram incubados à temperatura ambiente por 10 min. Durante a incubação, as seringas foram carregadas. Os animais foram injetados por via intratumoral com uma dose total de 2 µg ou 5 µg de RNA/animal em 20 µL ou 50 µL de volume total/animal. Um total de 5 tratamentos foi dado, com injeções realizadas dia sim, dia não. As doses não foram ajustadas para o peso corporal. Os animais foram acompanhados por 25 dias.

Exemplo 36 Síntese do Modelo de Transcrição In Vitro de RiboSlice de Alta Atividade/Alta Fidelidade

[0185] Um modelo de transcrição *in vitro* que codifica um promotor da RNA polimerase de bacteriófago T7, região não traduzida 5', sequência Kozak forte, domínio N-terminal de TALE, 18 sequências de repetição projetadas de acordo com o Exemplo 26, domínio C-terminal de TALE, e

domínio de nuclease compreendendo a sequência de StsI (SEQ ID NO: 1), sequência de StsI-HA (SEQ ID NO: 2), sequência de StsI-HA2 (SEQ ID NO: 3), sequência de StsI-UHA (SEQ ID NO: 4), sequência de StsI-UHA2 (SEQ ID NO: 5), sequência de StsI-HF (SEQ ID NO: 6) ou sequência de StsI-HF2 (SEQ ID NO: 7) é sintetizado usando técnicas de biologia molecular e de clonagem padrão, ou alternativamente, é sintetizado por síntese química direta, por exemplo, usando uma técnica de montagem de fragmento de gene (por exemplo, gBlocks, Integrated DNA Technologies, Inc.).

Exemplo 37 Síntese de RNA de Edição Gênica de RiboSlice de Alta atividade/Alta Fidelidade

[0186] RiboSlice de Alta Atividade e RiboSlice de Alta Fidelidade são sintetizados de acordo com o Exemplo 27, usando os modelos de transcrição *in vitro* sintetizados de acordo com o Exemplo 36.

Exemplo 38 Geração de Vírus de Replicação Incompetente Codificador de RiboSlice para Tratamento de Proteopatia

[0187] Uma sequência nucleotídica compreendendo RiboSlice direcionada a uma sequência de DNA que codifica uma sequência de proteína formadora de placa é incorporado em um vetor de expressão de mamífero compreendendo um genoma viral de replicação incompetente, e transfectado para uma linhagem celular de empacotamento para produzir o vírus de replicação incompetente. O sobrenadante da cultura é coletado, e filtrado usando um filtro de 0,45 µm para remover os debris.

Exemplo 39 Geração de Vírus Oncolítico de Replicação Competente Codificador de RiboSlice para Tratamento de Câncer

[0188] Uma sequência nucleotídica compreendendo RiboSlice direcionada ao gene de BIRC5 é incorporado em um vetor de expressão de mamífero compreendendo um genoma viral de replicação competente, e transfectado para uma linhagem celular de empacotamento para produzir o vírus de replicação competente. O sobrenadante da cultura é coletado e filtrado de acordo com o Exemplo 38.

Exemplo 40 Estudo de Eficácia de RiboSlice In Vivo - Modelo de Glioma Ortopédico, Via Intratecal de Administração

[0189] 40 camundongos NCr nu/nu fêmeas são injetados por via intracraniana com 1×10^5 células tumorais U-251. O volume de injeção celular foi de 0,02 mL/camundongo. A idade dos camundongos no início do estudo era de 8 a 12 semanas. Após 10 dias, os animais são divididos em 4 grupos de 10 animais cada, e o tratamento é iniciado. O peso corporal é medido todos os dias pelos primeiros 5 dias, e então quinzenalmente até o fim do estudo. O tratamento consiste em RiboSlice BIRC5-2.1 complexado com um veículo (Lipofectamine 2000, Life Technologies Corporation). Para preparar a solução de dosagem, 294 µL de tampão de complexação (Opti-MEM, Life Technologies Corporation) são pipetados em um tubo contendo 196 µL de RiboSlice BIRC5-1.2 (500 ng/µL), e os conteúdos do tubo são misturados por pipetagem. 245 µL de tampão de complexação são pipetados em um tubo contendo 245 µL do veículo. O conteúdo do segundo tubo são misturados e, em seguida, transferidos para o primeiro tubo, e misturados com os conteúdos do primeiro tubo por pipetagem para formar os complexos. Os complexos são incubados à temperatura

ambiente por 10 min. Durante a incubação, as seringas são carregadas. Os animais são injetados por via intratecal com uma dose total de 1 a 2 µg de RNA/animal em 10 a 20 µL de volume total/animal. Um total de 5 tratamentos é dado, com injeções realizadas dia sim, dia não. As doses não são ajustadas para o peso corporal. Os animais são acompanhados por 60 dias.

Exemplo 41 Tratamento do Glioma com RiboSlice - Perfusion IV

[0190] Um paciente com um diagnóstico de glioma é administrado com 1 mg de RiboSlice Lipossômico de Alta Concentração BIRC5-2.1, preparado de acordo com o Exemplo 34 por infusão IV durante o curso de 1h, 3 vezes por semana por 4 semanas. Para um volume tumoral inicial de mais de 500 mm³, o tumor tem seu volume diminuído cirurgicamente e opcionalmente por radioterapia e/ou quimioterapia antes do tratamento do RiboSlice ser iniciado. O paciente é opcionalmente administrado com TNF-α e/ou 5-FU usando um regime de dosagem padrão como uma terapia de combinação.

Exemplo 42 Tratamento do Glioma com RiboSlice - Vírus Oncolítico de Replicação Competente

[0191] Um paciente é administrado com 1 mL de partículas de vírus replicante (1000 UFC/mL), preparadas de acordo com o Exemplo 39, por injeção intratecal ou intracraniana.

Exemplo 43 Tratamento do mal de Parkinson com RiboSlice Direcionado a SNCA

[0192] Um paciente com um diagnóstico de mal de Parkinson é administrado com 50 µg de RiboSlice direcionado ao gene de SNCA por injeção intratecal ou intracraniana.

Exemplo 44 Tratamento da doença de Alzheimer com RiboSlice Direcionado a APP

[0193] Um paciente com um diagnóstico doença de Alzheimer é administrado com 50 µg de RiboSlice direcionado ao gene de APP por injeção intratecal ou intracraniana.

Exemplo 45 Tratamento da Diabetes Tipo II com RiboSlice Direcionado a IAPP

[0194] Um paciente com um diagnóstico diabetes tipo II é administrado com 5 mg de RiboSlice direcionado ao gene de IAPP por injeção intravenosa, intraperitoneal ou intraportal.

Exemplo 46 Terapia para câncer Personalizada com iRiboSlice

[0195] Uma biópsia é retirada de um paciente com diagnóstico de câncer. O DNA genômico é isolado e purificado a partir da biópsia, e a sequência do DNA (tanto a sequência do genoma inteiro, sequência do exoma quanto a sequência de um ou mais genes associados ao câncer) é determinada. Um par de RiboSlice direcionado à sequência de câncer individual do paciente (iRiboSlice) é projetado de acordo com o Exemplo 26 e sintetizado de acordo com o Exemplo 27. O paciente é administrado com o iRiboSlice personalizado usando uma via de administração apropriada para a localização e para o tipo de câncer.

Exemplo 47 Misturas de RiboSlice para Câncer Geneticamente Diverso/Resistente ao Tratamento

[0196] Um paciente com um diagnóstico de câncer geneticamente diverso e/ou resistente ao tratamento é administrado com uma mistura de pares de RiboSlice direcionados a múltiplos genes associados ao câncer e/ou a

múltiplas sequências em um ou mais genes associados ao câncer.

Exemplo 48 Mito-RiboSlice para Doença Mitocondrial

[0197] Um paciente com um diagnóstico de uma doença mitocondrial é administrado com 2 mg de RiboSlice direcionado à sequência associada à doença e contendo uma sequência de localização mitocondrial por injeção intramuscular.

Exemplo 49 Tratamento de Doença Ocular com Gotas Oculares de RiboSlice

[0198] Um paciente com um diagnóstico de uma doença córnea ou conjuntival é administrado com RiboSlice formulado como uma solução isotônica a 0,5%.

Exemplo 50 Tratamento de Doença de Pele com Formulação Tópica de RiboSlice

[0199] Um paciente com um diagnóstico de uma doença de pele é administrado com RiboSlice formulado como um creme/pomada tópica a 1% contendo um ou mais estabilizantes que previnem a degradação do RNA.

Exemplo 51 Tratamento de Doença do Pulmão ou Respiratória com Formulação em Aerossol de RiboSlice

[0200] Um paciente com um diagnóstico de uma doença de pulmão ou respiratória é administrado com RiboSlice formulado como um spray de aerossol a 0,5%.

Exemplo 52 Tratamento de Doença Infecciosa com RiboSlice Direcionado a uma Sequência de DNA Presente no Agente Infeccioso

[0201] Um paciente com um diagnóstico de uma doença infecciosa é administrado com RiboSlice direcionado a uma sequência presente no agente infeccioso específico com o

qual o paciente está infectado usando uma via de administração apropriada para a localização e tipo da infecção, e uma dose apropriada para a via de administração e gravidade da infecção.

Exemplo 53 Zigotos Humanos Editados Geneticamente para Fertilização In Vitro

[0202] Uma célula germinativa humana, zigoto ou blastocisto em estágio inicial é transferido com RiboSlice direcionado a um gene que codifica uma mutação associada à doença ou mutação associada a um traço indesejado. O genoma é caracterizado, e a célula é preparada para fertilização *in vitro*.

Exemplo 54 Triagem do Domínio de Clivagem para Potencialização da Atividade e Fidelidade das Proteínas de Edição Gênica

[0203] Um painel de pares de RiboSlice, cada um compreendendo um domínio de clivagem diferente, é projetado de acordo com o Exemplo 26 e sintetizado de acordo com o Exemplo 27. A atividade dos pares de RiboSlice é determinada como no Exemplo 28.

Exemplo 55 Células Editadas Geneticamente para Triagem de Tóxicos Causadores do Mal de Parkinson

[0204] Os fibroblastos adultos primários humanos são editados geneticamente de acordo com o Exemplo 28 usando RiboSlice direcionado a SNCA (Tabela 11) e modelos de reparo para gerar células com as mutações SNCA A30P, E46K, e A53T. As células são reprogramadas e diferenciadas em neurônios dopaminérgicos. Os neurônios são usados em um ensaio de triagem de tóxicos de agregação de α -sinucleína de alto rendimento para identificar tóxicos que possam

contribuir para o mal de Parkinson.

Tabela 11. Pares de RiboSlice para Geração de SNCA A30P, E46K e A53T.

Éxon	Aminoácido do alvo	Sítio de Ligação de RiboSlice Esquerdo	Sítio de Ligação de RiboSlice Direito	Espaçamento
1	A30	TGAGAAAACCAAACAG GGTG	TAGAGAACACCCTCTT TTGT	20
2	E46	TGTTTTTGTAGGCTCC AAAA	TACCTGTTGCCACACC ATGC	16
2	A53	TCCAAAACCAAGGAGG GAGT	TAAGCACAATGGAGCT TACC	19

Exemplo 56 Células Editadas Geneticamente para Triagem de Tóxicos Causadores de Câncer

[0205] Os fibroblastos adultos primários humanos são editados geneticamente de acordo com o Exemplo 28 usando RiboSlice direcionado a TP53 (Tabela 12) e modelos de reparo para gerar células com as mutações TP53 P47S, R72P e V217M. As células são reprogramadas e diferenciadas em hepatócitos. Os hepatócitos são usados em um ensaio de triagem de tóxicos de transformação *in vitro* de alto rendimento para identificar tóxicos que possam contribuir para o câncer.

Tabela 12. Pares de RiboSlice para Geração de TP53 P47S, R72P e V217M.

Éxon	Aminoácido do alvo	Sítio de Ligação de RiboSlice Esquerdo	Sítio de Ligação de RiboSlice Direito	Espaçamento
4	P47	TCCAAGCAATGGATG ATTT	TGAACCATTGTTCAAT ATCG	15

4	R72	TGAAGCTCCCAGAATG CCAG	TAGGAGCTGCTGGTGC AGGG	19
6	V217	TGGATGACAGAAACAC TTTT	TCAGGCGGCTCATAGG GCAC	15

Exemplo 57 Design e Síntese de RNA Codificador de Proteínas de Edição Gênica Projetadas (RiboSlice)

[0206] O RNA que codifica as proteínas de edição gênica projetado de acordo com o Exemplo 26 foi sintetizado de acordo com o Exemplo 27 (Tabela 13). Cada proteína de edição gênica compreendia um domínio de ligação de DNA compreendendo um domínio de repetição efetor semelhante ao ativador de transcrição (TAL) compreendendo sequências de repetição com 35-36 aminoácidos de comprimento, como indicado na Tabela 13. Números de ID de sequência são dados para as sequências de repetição com 36 aminoácidos de comprimento. A marcação "18" no nome do modelo indica que a 18ª sequência de repetição tinha 36 aminoácidos de comprimento. A marcação "EO" no nome do modelo indica que cada sequência de repetição intercalada tinha 36 aminoácidos de comprimento. Os aminoácidos após a marcação "18" ou "EO" indicam os aminoácidos no terminal C da(s) sequência(s) de repetição com 36 aminoácidos de comprimento. A marcação "StsI" indica que o domínio de nuclease continha o domínio de clivagem de StsI. Os modelos sem a marcação "StsI" continham o domínio de clivagem de FokI.

Tabela 13. RiboSlice Codificador de Proteínas de Edição Gênica Projetadas.

Modelo (SEQ ID da Sequência de	Nucleotídeos	Volume de reação/ μ L	Rendimento de ivT/ μ g
--------------------------------------	--------------	------------------------------	-------------------------------

Repetição)			
BIRC5-2.1L-18- AHGGG (SEQ ID NO: 54)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	11,9
BIRC5-2.1R-18- AHGGG (SEQ ID NO: 54)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	11,9
BIRC5-2.1L-18- AGHGG (SEQ ID NO: 55)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	10,7
BIRC5-2.1R-18- AGHGG (SEQ ID NO: 55)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	10,9
BIRC5-2.1L-18- AHGSG (SEQ ID NO: 56)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	11,9
BIRC5-2.1R-18- AHGSG (SEQ ID NO: 56)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	12,7
BIRC5-2.1L-18- AHGGG (SEQ ID NO: 54)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	34,5
BIRC5-2.1R-18- AHGGG (SEQ ID NO: 54)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	34,8
BIRC5-2.1L-18- AGHGG (SEQ ID NO: 55)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	32,7
BIRC5-2.1R-18-	A, 0,5 7dG, 0,4	20	37,4

AGHGG (SEQ ID NO: 55)	5mU, 5mC		
BIRC5-2.1L-18- AHGSG (SEQ ID NO: 56)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	31,5
BIRC5-2.1R-18- AHGSG (SEQ ID NO: 56)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	34,1
BIRC5-2.1L	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	34,9
BIRC5-2.1R	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	25,9
BIRC5-2.1L	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	41,5
BIRC5-2.1R	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	38,8
BIRC5-2.1L-StsI	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	22,2
BIRC5-2.1R-StsI	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	18,4
BIRC5-2.1L-E0- AGHGG (SEQ ID NO: 55)	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	21,6
BIRC5-2.1L	A, 0,5 7dG, 0,4 5mU, 5mC	20	17,3
BIRC5-2.1L-StsI	A, G, U, C	10	71,3
BIRC5-2.1R-StsI	A, G, U, C	10	75,1
BIRC5-2.1L-E0-	A, G, U, C	10	66,4

AGHGG (SEQ ID NO: 55)			
BIRC5-2.1R-E0- AGHGG (SEQ ID NO: 55)	A, G, U, C	10	52,4

Exemplo 58 Análise da Atividade do RiboSlice Direcionado a BIRC5

[0207] A atividade das moléculas de RiboSlice sintetizadas de acordo com o Exemplo 57 foi analisada de acordo com o Exemplo 28 (**FIG. 12A**, **FIG. 12B**, e **FIG. 14**). A edição gênica de alta eficiência foi observada em células que expressam as proteínas de edição gênica contendo uma ou mais sequências de repetição com 36 aminoácidos de comprimento. A eficiência da edição gênica foi mais alta nas células expressando as proteínas de edição gênica contendo uma ou mais sequências de repetição contendo a sequência de aminoácidos: GHGG.

Exemplo 59 Estudo de Segurança e Eficácia de RiboSlice AAV In Vivo – Modelo de Glioma Subcutâneo, Via Intratumoral de Distribuição

[0208] Os animais foram estabelecidos com tumores compreendendo células de glioma humano U-251 de acordo com o Exemplo 35. O sorotipo 2 de AAV codificante de GFP, BIRC5-2.1L RiboSlice, e BIRC5-2.1R RiboSlice foi preparado de acordo com técnicas padrão (AAV-2 Helper Free Expression System, Cell Biolabs, Inc.). Os estoques virais foram armazenados em 4°C (curto prazo) ou em -80°C (longo prazo). Os animais receberam injeções intratumorais de 160 µL de GFP AAV no dia 1 ou 80 µL de BIRC5-2.1L RiboSlice AAV + 80 µL de BIRC5-2.1R RiboSlice AAV no dia 1 e dia 15. Os

animais foram acompanhados por 25 dias. Nenhuma redução significativa no peso corporal médio foi observada (**FIG. 13A**), demonstrando a segurança *in vivo* do RiboSlice AAV. O crescimento do tumor foi inibido no grupo do RiboSlice AAV (**FIG. 13B**), demonstrando a eficácia *in vivo* do RiboSlice AAV.

Exemplo 60 Tratamento de Câncer com RiboSlice AAV

[0209] Um paciente é administrado com 1 mL de partículas de vírus RiboSlice AAV preparadas de acordo com o Exemplo 59, por injeção intratecal ou intracraniana. A dosagem é repetida conforme necessário. Para um paciente com um volume tumoral inicial de mais de 500 mm³, o tumor tem seu volume diminuído cirurgicamente e opcionalmente por radioterapia e/ou quimioterapia antes do tratamento com RiboSlice AAV ser iniciado. O paciente é opcionalmente administrado com TNF- α e/ou 5-FU usando um regime de dosagem padrão como uma terapia de combinação.

Exemplo 61 Terapia para Câncer Personalizada com iRiboSlice AAV

[0210] Uma biópsia é retirada de um paciente com diagnóstico de câncer. O DNA genômico é isolado e purificado a partir da biópsia, e a sequência do DNA (tanto a sequência do genoma inteiro, sequência do exoma quanto a sequência de um ou mais genes associados ao câncer) é determinada. Um par de RiboSlice direcionado à sequência de câncer individual do paciente (iRiboSlice) é projetado de acordo com o Exemplo 26 e sintetizado de acordo com o Exemplo 59. O paciente é administrado com o iRiboSlice AAV personalizado usando uma via de administração apropriada para a localização e para o tipo de câncer.

Exemplo 62 Formulação Lipossômica e Encapsulamento de Ácido Nucleico

[0211] Os lipossomos são preparados usando a seguinte formulação: 3,2 mg/mL de N-(carbonil-etoxipolietileno glicol 2000)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (MPEG2000-DSPE), 9,6 mg/mL de fosfatidilcolina totalmente hidrogenada, 3,2 mg/mL de colesterol, 2 mg/mL de sulfato de amônio, e histidina como um tampão. O pH é controlado usando hidróxido de sódio e a isotonicidade é mantida usando sacarose. Para formar os lipossomos, os lipídios são misturados em um solvente orgânico, secos, hidratados com agitação, e dimensionados por extrusão através de um filtro de polycarbonato com um tamanho de poro médio de 800 nm. Os ácidos nucleicos são encapsulados pela combinação de 10µg da formulação de lipossomo por 1µg de ácido nucleico e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos.

Exemplo 63 Formulação de Lipossomo Alvejado por Folato

[0212] Os lipossomos são preparados de acordo com o Exemplo 62, exceto que 0,27 mg/mL de 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[folato(polietileno glicol)-5000] (FA-MPEG5000-DSPE) é adicionado à mistura de lipídios.

Exemplo 64 Terapia de Câncer Compreendendo RiboSlice Lipossômico Direcionado a BIRC5

[0213] Os lipossomos que encapsulam os pares de RiboSlice sintetizados de acordo com o Exemplo 23 são preparados de acordo com o Exemplo 62 ou Exemplo 63. Os lipossomos são administrados por injeção ou infusão intravenosa, e a resposta do tumor e os níveis plasmáticos de interferon são monitorados diariamente.

Exemplo 65 Terapia para Câncer Compreendendo RiboSlice Lipossômico Direcionado a um Gene Associado ao Câncer

[0214] Os lipossomos que encapsulam o RiboSlice direcionado a um gene associado ao câncer, sintetizando de acordo com o Exemplo 1, são preparados de acordo com o Exemplo 62 ou Exemplo 63. Os lipossomos são administrados por injeção ou infusão intravenosa, e a resposta do tumor e os níveis plasmáticos de interferon são monitorados diariamente.

Exemplo 66 Terapia compreendendo RNA Codificador de Proteína Lipossômica

[0215] Os lipossomos que encapsulam o RNA sintético que codifica uma proteína terapêutica, sintetizados de acordo com o Exemplo 1, são preparados de acordo com o Exemplo 62 ou Exemplo 63. Os lipossomos são administrados por injeção ou infusão intravenosa.

Exemplo 67 Terapia de Combinação para Câncer Compreendendo RiboSlice Direcionado a BIRC5 e TNF- α

[0216] Os pacientes são administrados com perfusão do membro isolado (ILP) com o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e lipossomos que encapsulam RiboSlice direcionado a BIRC5 (ver o Exemplo 64). Após o aquecimento do membro, os lipossomos são injetados na linha arterial do circuito ILP extracorpóreo durante aproximadamente 5 minutos, e a perfusão procede por mais 85 minutos. Após 1-2 dias, a ILP é repetida com TNF- α injetado na linha arterial do circuito ILP extracorpóreo durante 3 a 5 minutos e a perfusão continua por 60 minutos adicionais. A resposta do tumor e os níveis plasmáticos de interferon são monitorados diariamente.

Exemplo 68 Terapia de Combinação para Câncer Compreendendo RiboSlice Direcionado a BIRC5 e Fluorouracil (5-FU)

[0217] No dia 1, os pacientes receberam uma infusão intravenosa de 60 minutos de lipossomos que encapsulam RiboSlice direcionado a BIRC5 (ver o Exemplo 64), seguido por uma infusão intravenosa de 46 horas de 5-FU nos dias 2 e 3. A resposta do tumor e os níveis plasmáticos de interferon são monitorados diariamente.

EQUIVALENTES

[0218] Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar, usando não mais do que a experimentação de rotina, que inúmeros equivalentes às modalidades específicas são descritos especificamente neste documento. Pretende-se que tais equivalentes sejam abrangidos no escopo das seguintes reivindicações.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[0219] Todas as patentes e publicações referidas neste documento estão incorporados em sua totalidade por meio deste por referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para inserir uma molécula de sequência de RNA sintético em uma localização segura de um genoma de uma célula **caracterizado** por compreender a transfecção de uma célula compreendendo uma localização segura com: (i) um primeiro ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico para inserção e (ii) um segundo ácido nucleico que codifica uma proteína de edição gênica se direcionando à localização segura, a proteína de edição gênica compreendendo: (a) um domínio de ligação ao DNA e (b) um domínio de nuclease, em que:

(a) o domínio de ligação ao DNA compreende uma pluralidade de sequências repetidas e pelo menos uma das sequências repetidas compreende a sequência de aminoácidos: LTPvQVVAIAwxyzGHGG (SEQ ID NO: 75) e tem entre 36 e 39 aminoácidos de comprimento, em que:

"V" é Q, D ou E,

"W" é S ou N,

"X" é N ou H,

"Y" é D, A, H, N, K, ou G, e

"Z" é GGKQALETVQRLLPVLCQD (SEQ ID NO: 670) ou GGKQALETVQRLLPVLCQA (SEQ ID NO: 671); e

(b) o domínio de nuclease compreende um domínio catalítico de uma nucleasse, para resultar na inserção da molécula de sequência de RNA sintético na localização segura, quando a célula é uma célula humana, a localização segura é o locus AAVS1, ou quando a célula é uma célula de roedor, a localização segura é o locus Rosa26.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de nuclease é capaz

de formar um dímero com outro domínio de nuclease.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que a proteína de edição gênica é capaz de gerar um corte ou quebra de fita dupla em uma molécula de DNA alvo.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de RNA sintético compreende um ou mais nucleotídeos não canônicos.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o nucleotídeo não canônico é selecionado do grupo que consiste em pseudouridina, 5-metilpseudouridina, 5-metiluridina, 5-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, N4-metilcitidina, N4-acetilcitidina e 7-deazaguanosina.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que o domínio de nuclease compreende o domínio catalítico de uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 53.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que a nuclease é selecionada do grupo que consiste em FokI e StsI.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma das sequências repetidas contém uma região capaz de se ligar a um local de ligação em uma molécula de DNA alvo, o local de ligação contendo uma sequência definida entre 1 e 5 bases de comprimento.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que quando a célula é uma célula humana e a localização segura é o locus AAVS1, a proteína de edição gênica direciona uma ou mais de TTATCTGTCCCCTCCACCCC (SEQ ID NO: 629) e TTTTCTGTCACCAATCCTGT (SEQ ID NO: 630).

FIG. 1A

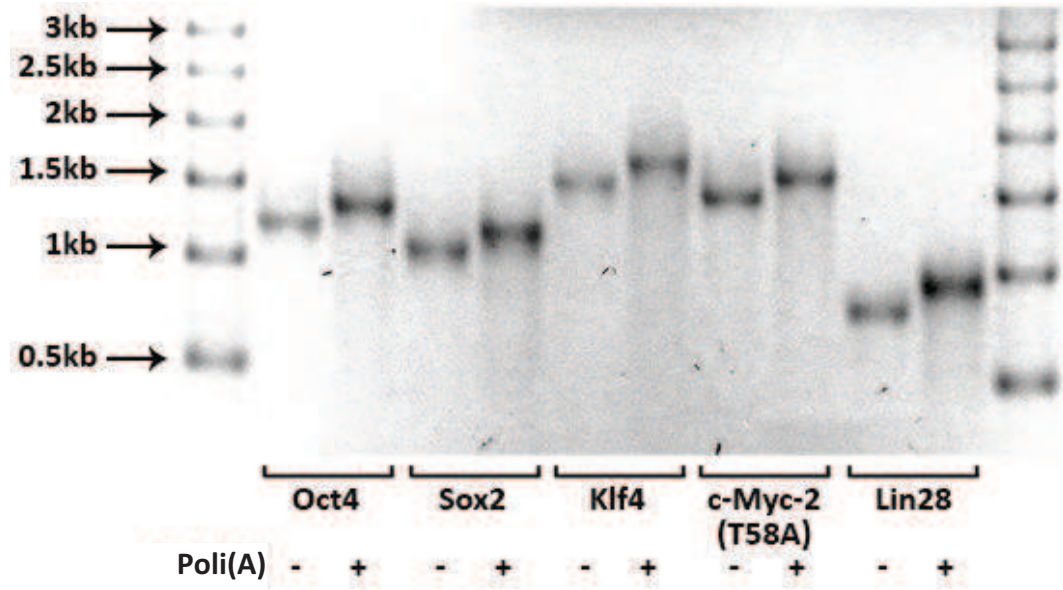


FIG. 1B

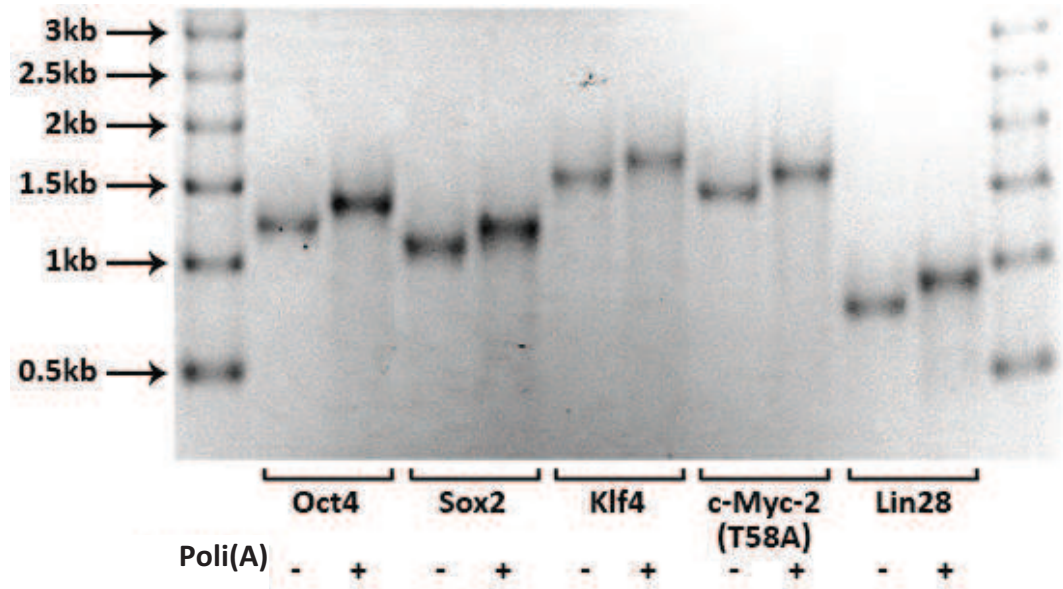


FIG. 2

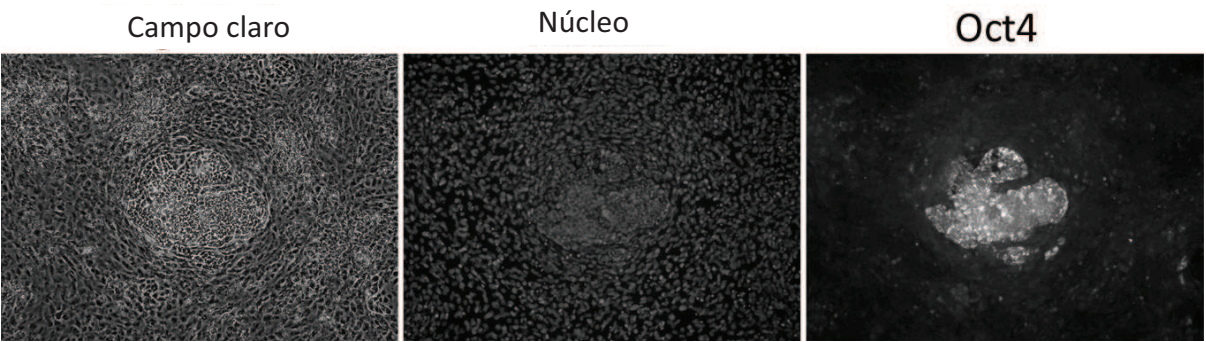


FIG. 3A

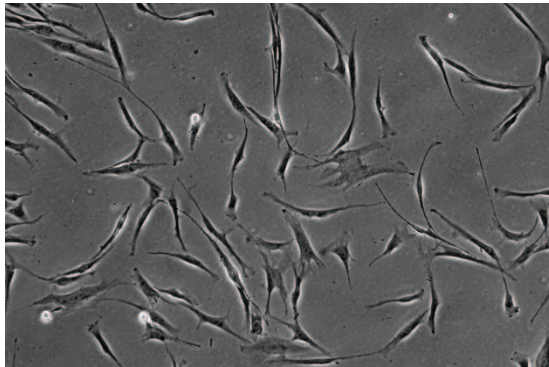


FIG. 3B

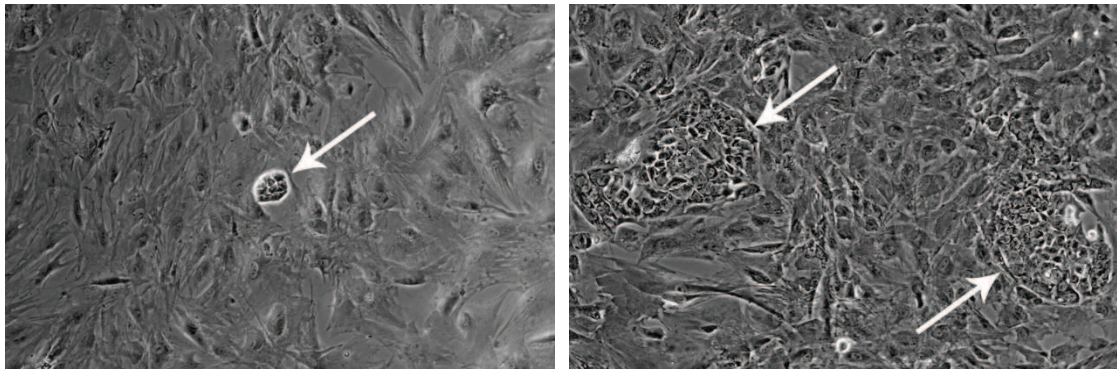


FIG. 3C

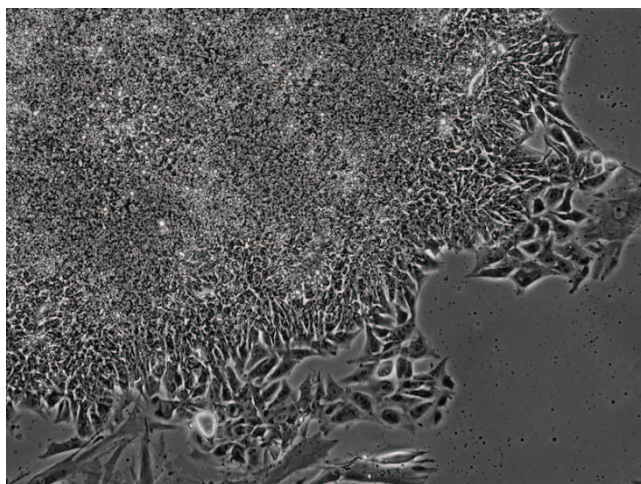


FIG. 4A



FIG. 4B

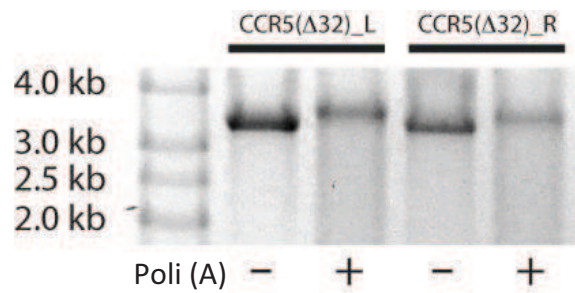


FIG. 4C

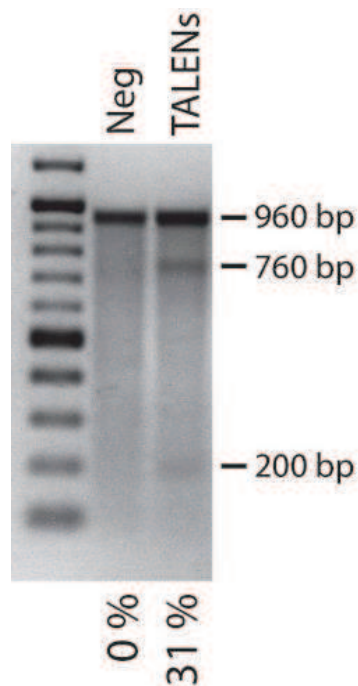


FIG. 4D

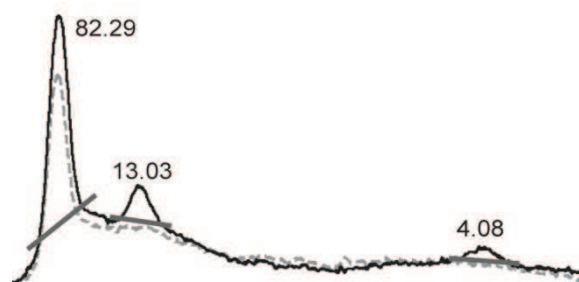


FIG. 4E

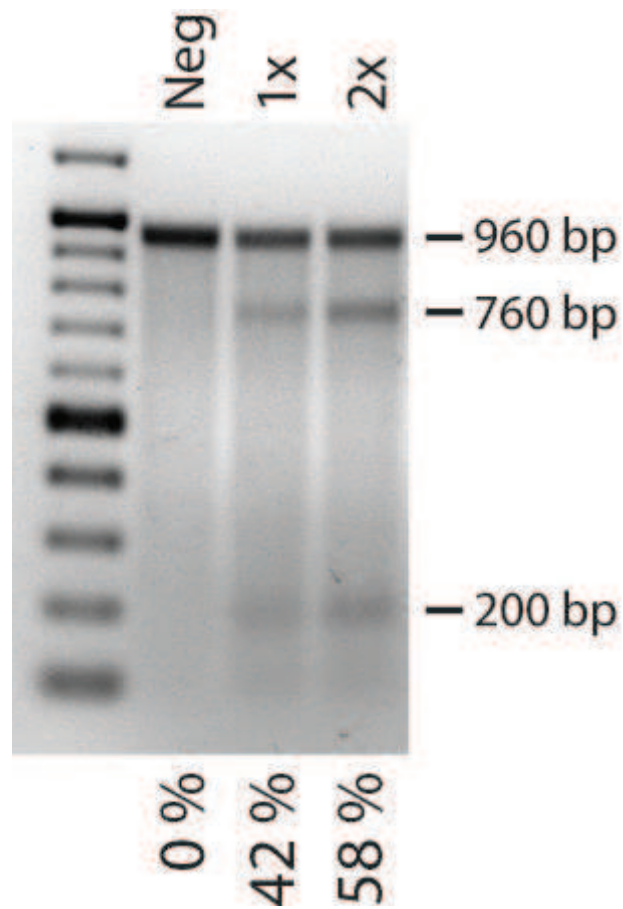


FIG. 4F

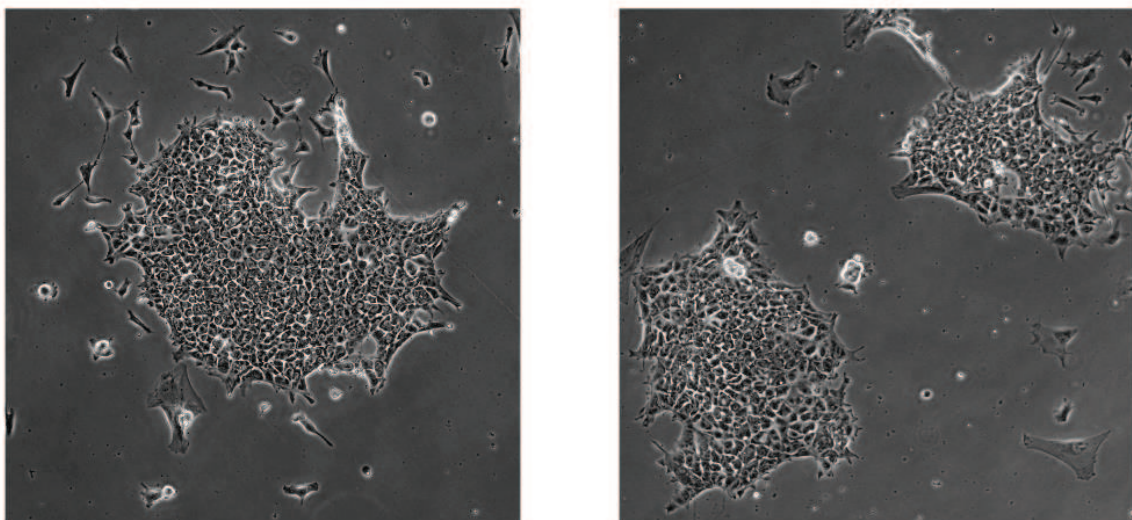


FIG. 4G

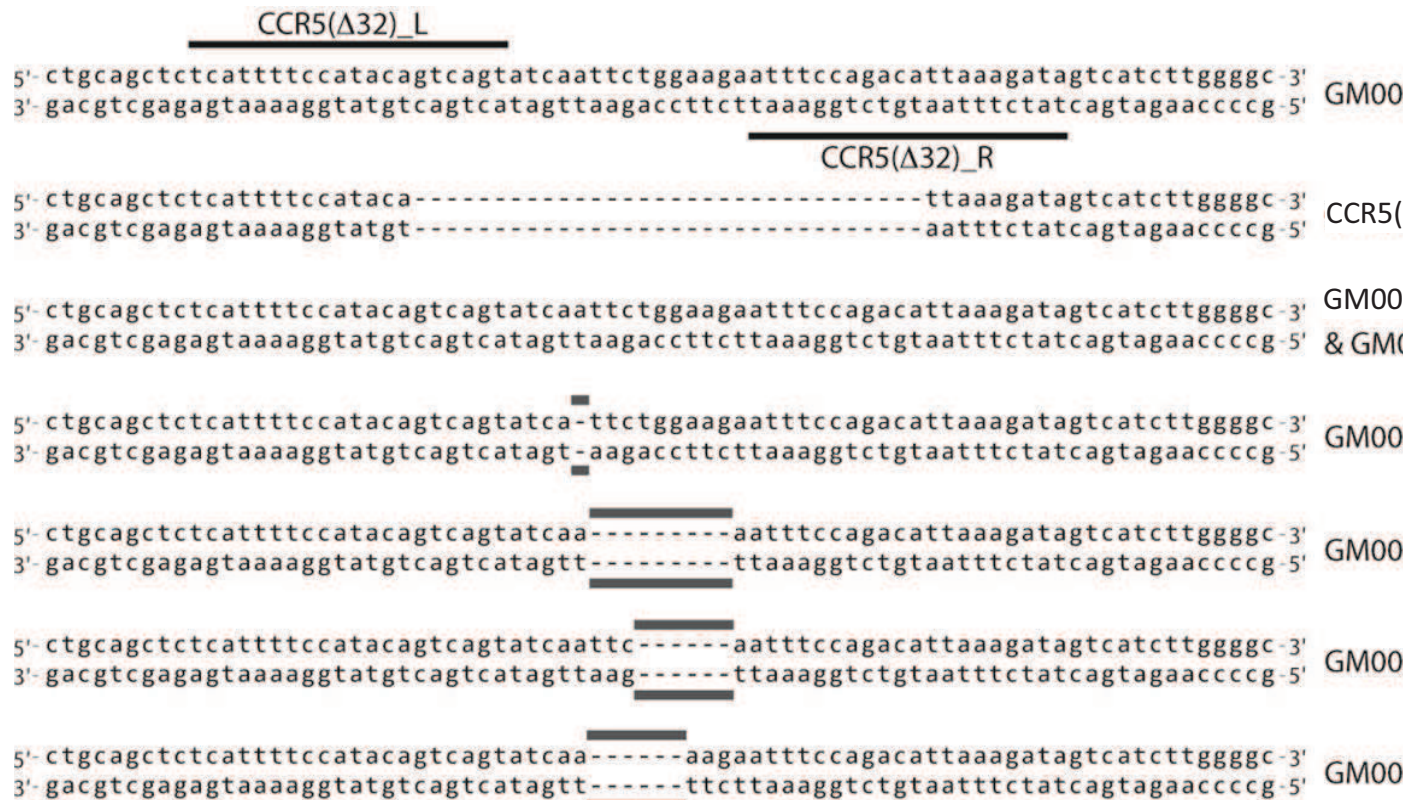


FIG. 5

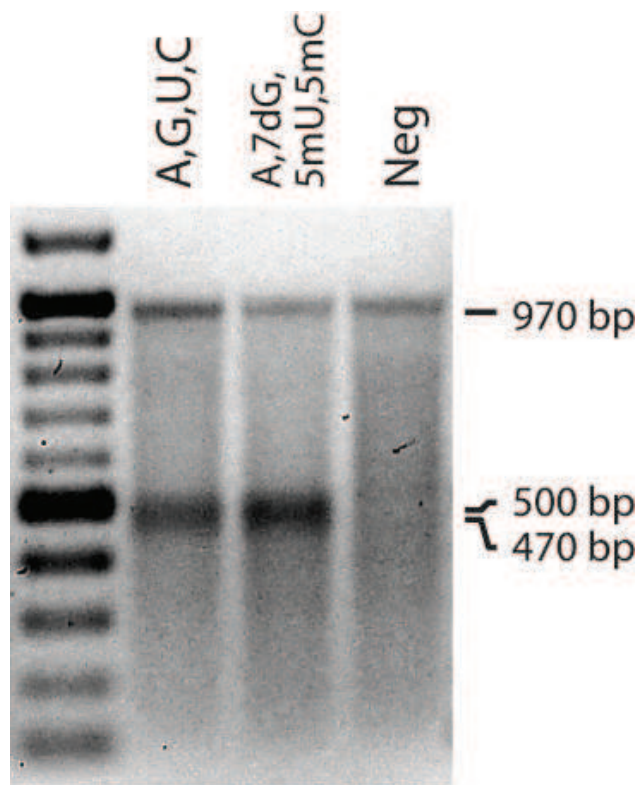


FIG. 6

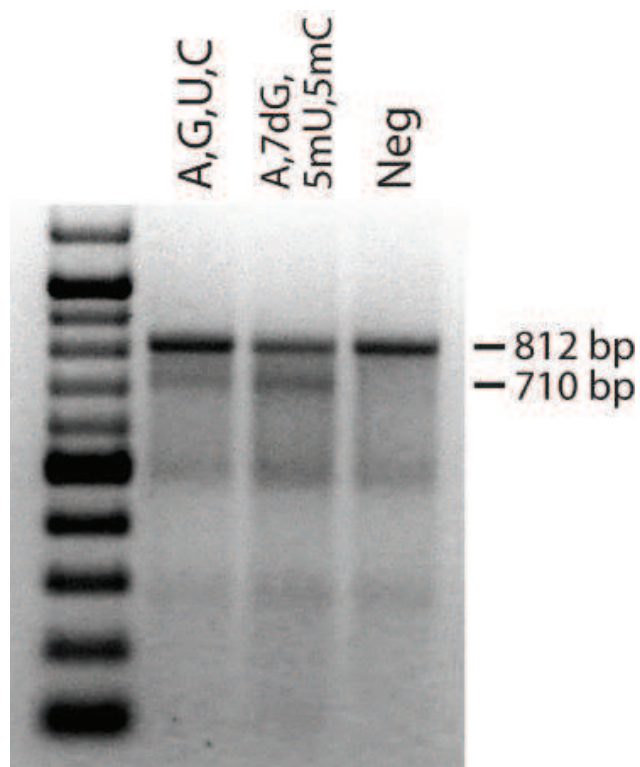


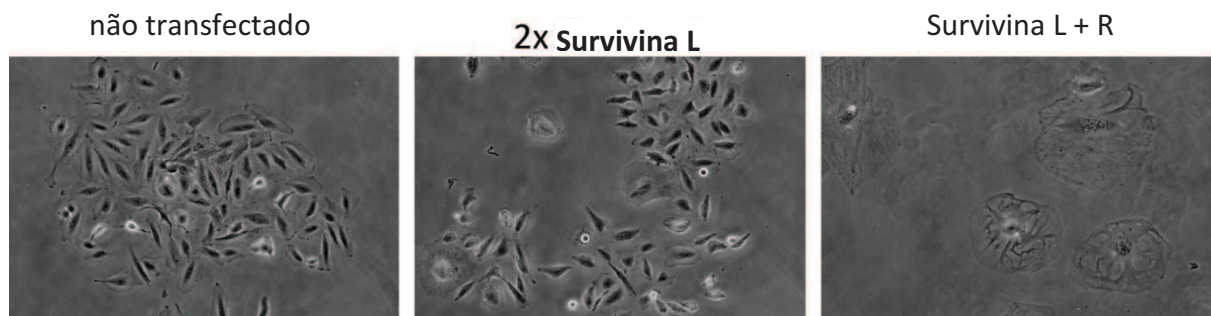
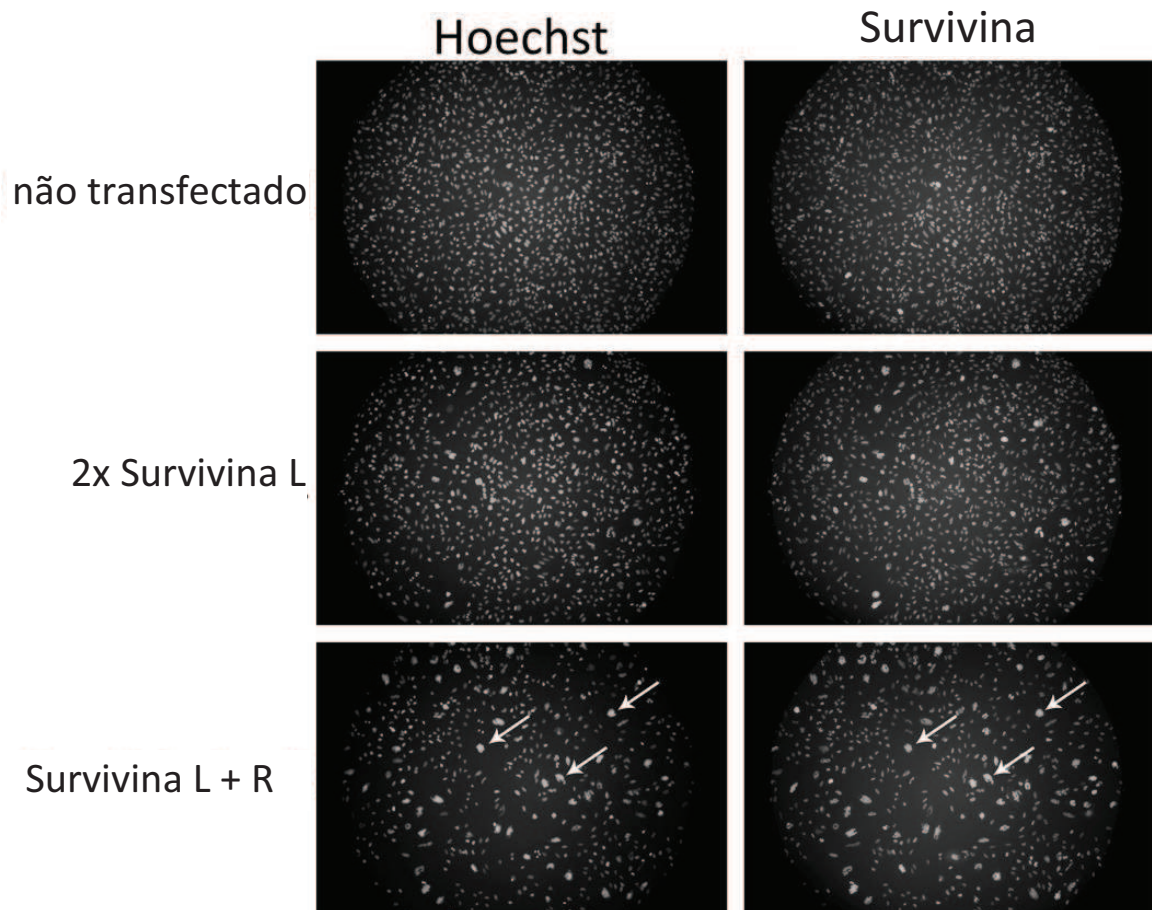
FIG. 7A**FIG. 7B**

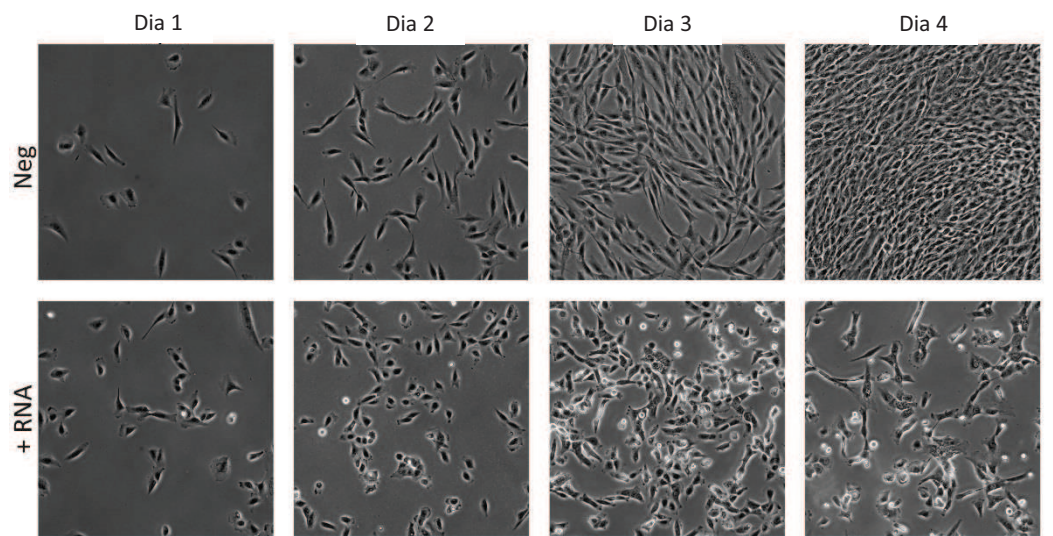
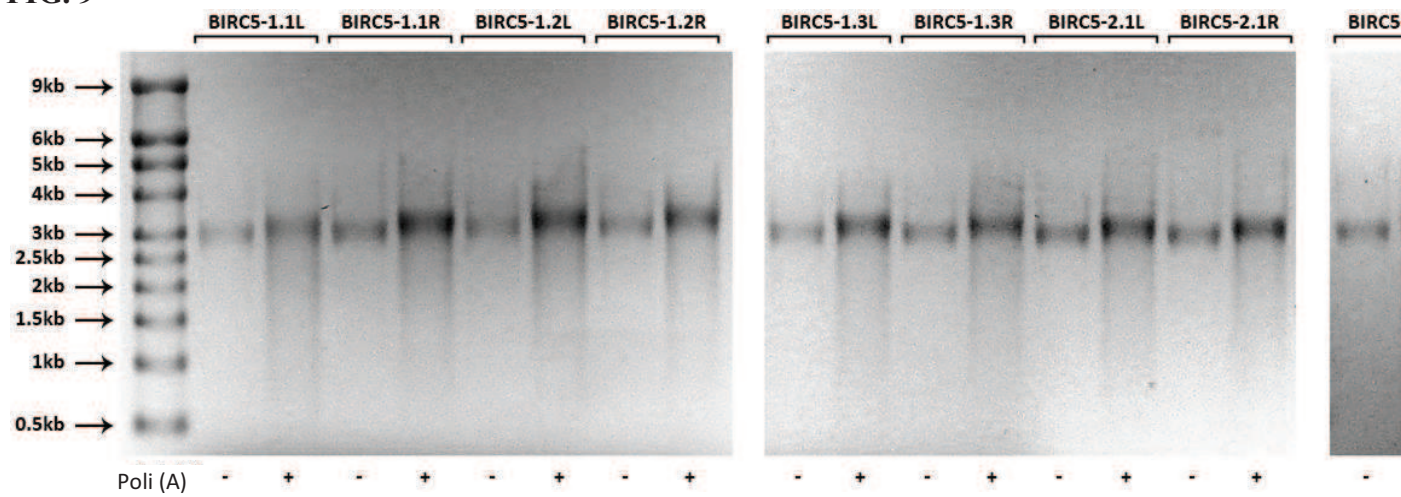
FIG. 8**FIG. 9**

FIG. 10A

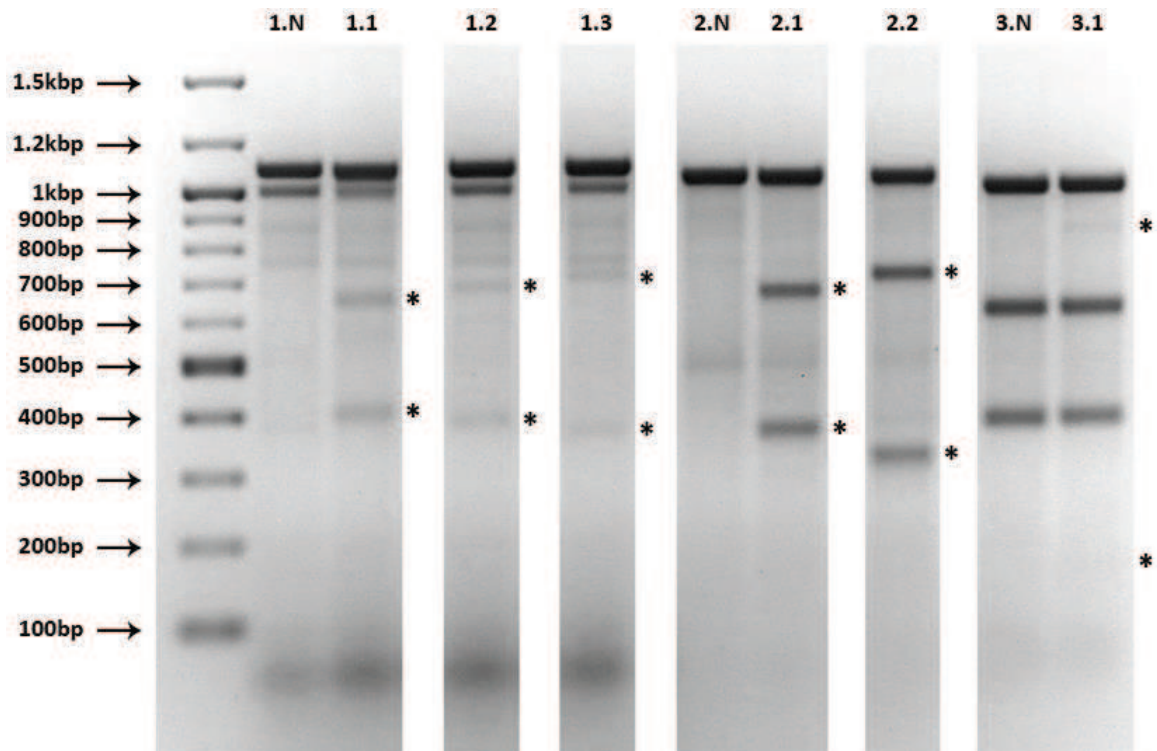


FIG. 10B

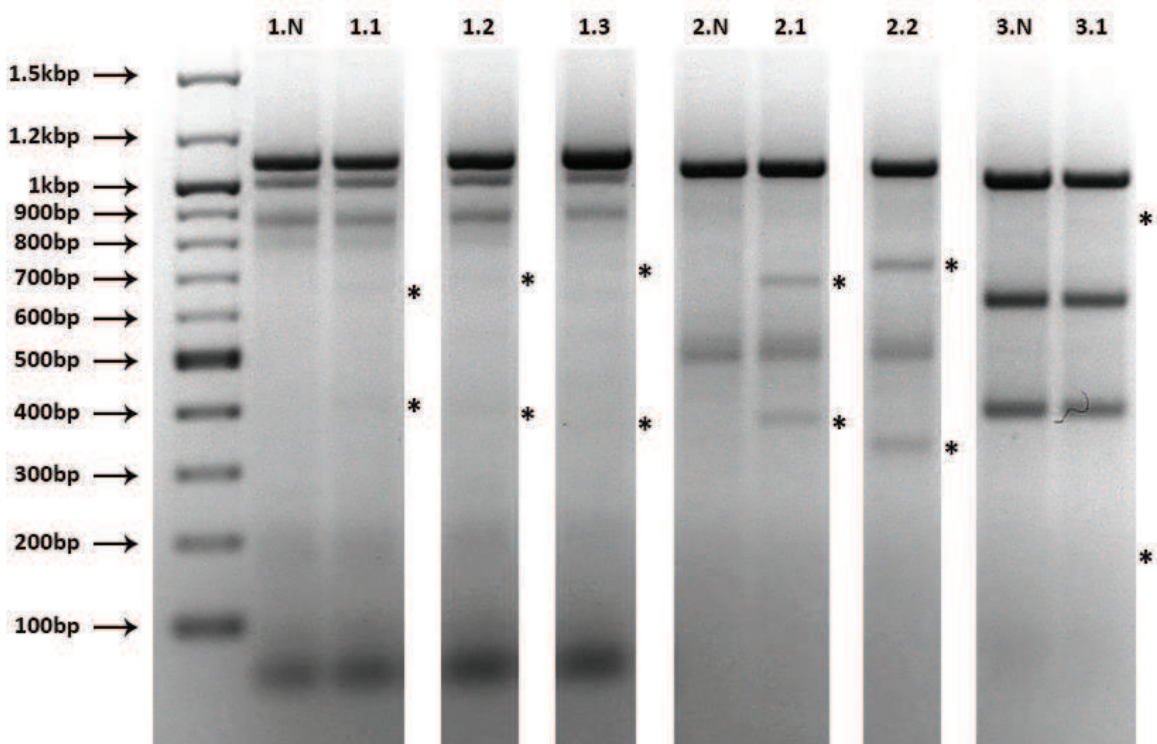


FIG. 11

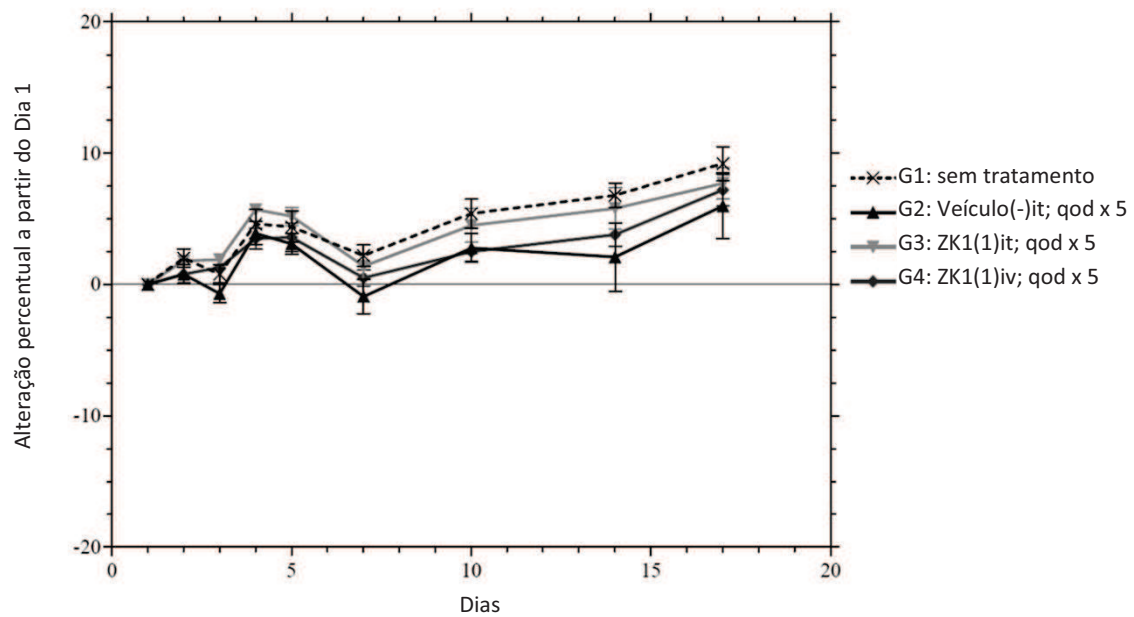


FIG. 12A

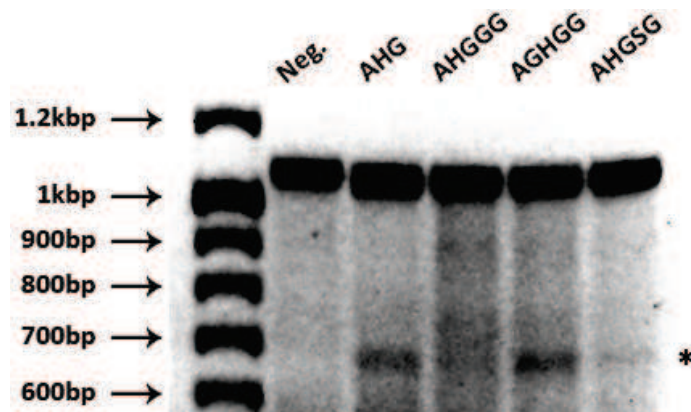


FIG. 12B

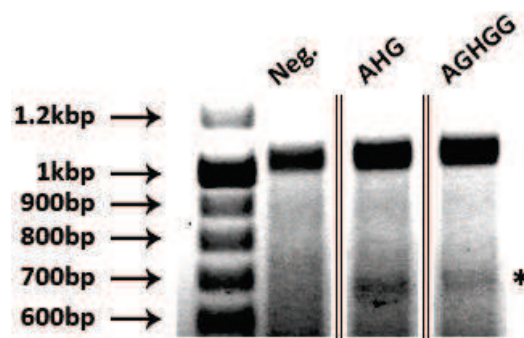


FIG. 13A

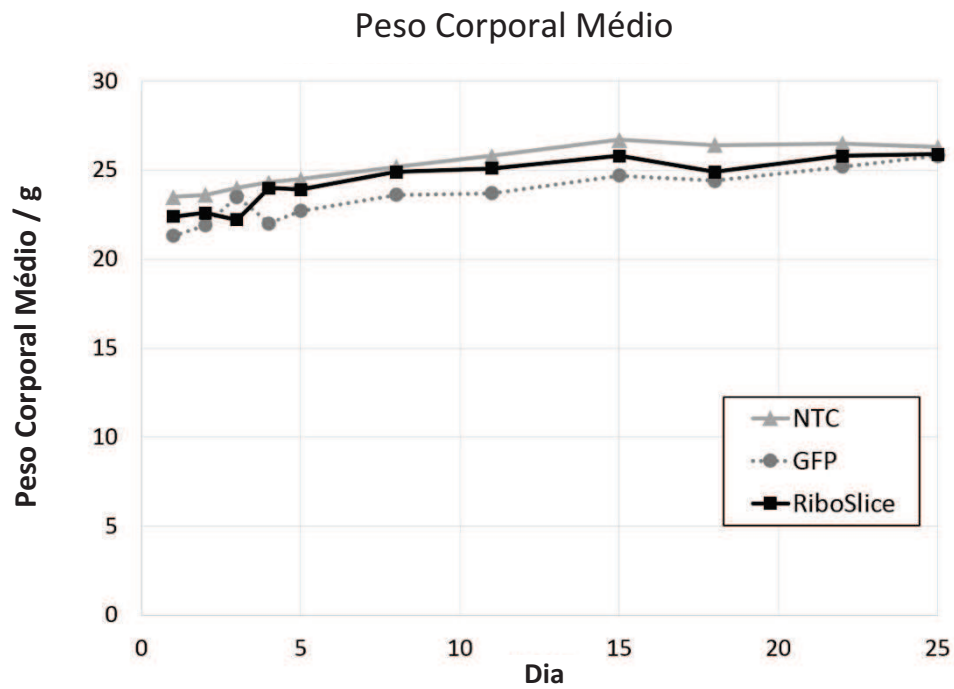


FIG. 13B

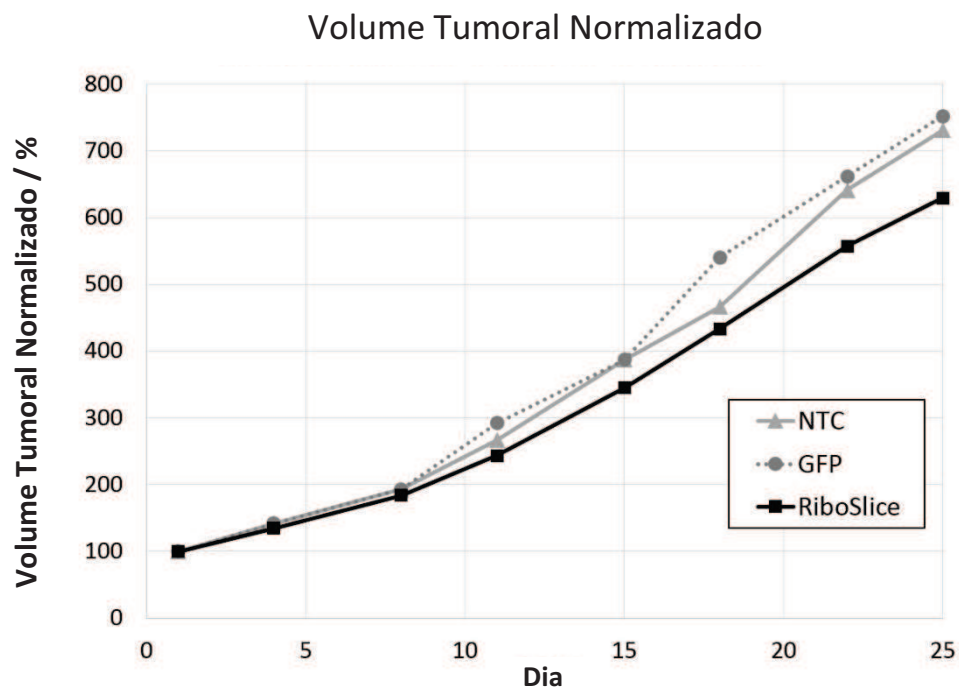


FIG. 14

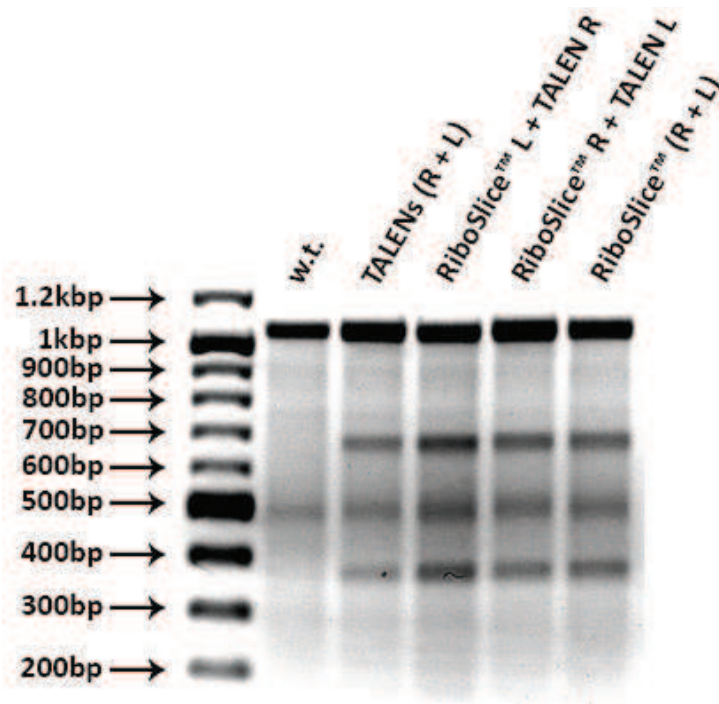


FIG. 15

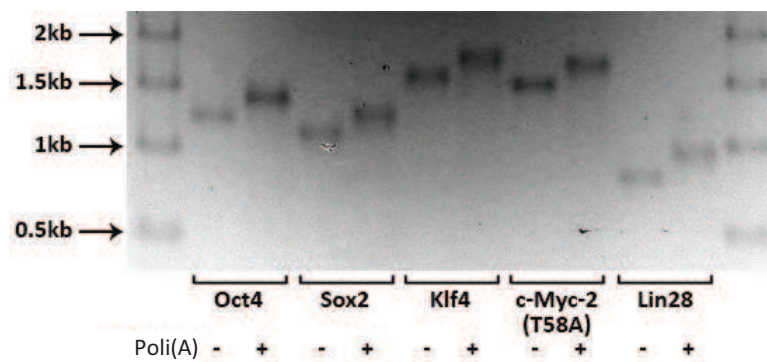


FIG. 16

