

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"RNAS GUIAS MODIFICADOS"**.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[001] O presente pedido contém uma listagem de sequências que foi submetida eletronicamente no formato ASCII e é incorporada por referência em sua totalidade. A cópia ASCII, criada em 7 de dezembro de 2017, é denominada 01155-0004-00PCT_SeqList.txt e tem 118.877 bytes de tamanho.

[002] Este pedido reivindica o benefício de prioridade ao Pedido Provisório dos Estados Unidos No. 62/431.756, que foi depositado em 8 de dezembro de 2016, e que é incorporado por referência em sua totalidade.

[003] Esta divulgação refere-se ao campo da edição de genes usando sistemas CRISPR/Cas, uma parte do sistema imune procariótico que reconhece e corta elementos genéticos exógenos. O sistema CRISPR/Cas conta com uma única nuclease, denominada proteína 9 associada a CRISPR (Cas9), que induz rupturas específicas de sítio no DNA. A Cas9 é guiada para sequências de DNA específicas por pequenas moléculas de RNA denominadas RNA guia (gRNA). RNA guia compreende trRNA (também conhecido como tracrRNA) e crRNA (crRNA). O trRNA e o crRNA podem estar contidos dentro de um RNA guia único (sgRNA) ou em duas moléculas de RNA separadas de um RNA guia duplo (dgRNA). Cas9 em combinação com trRNA e crRNA ou um sgRNA é denominada complexo de ribonucleoproteína Cas9 (RNP).

[004] Os oligonucleotídeos, e em particular o RNA, são por vezes degradados nas células e no soro por clivagem com endonuclease ou exonuclease. Melhores métodos e composições para prevenir tal degradação, melhorar a estabilidade de gRNAs e aumentar a eficiência de edição genética são desejados, especialmente para aplicações te-

rapêuticas.

SUMÁRIO

[005] Em algumas modalidades, ferramentas de edição de genoma terapêutico são fornecidas que compreende RNAs guia modificados. Os RNAs guias modificados aqui descritos podem melhorar a estabilidade do RNA guia e do complexo RNA guia / Cas9 e melhorar a atividade de Cas9 (por exemplo, SpyCas9 e equivalentes) para clivar o DNA alvo. Em algumas modalidades, o RNA guia é um sgRNA. Em algumas modalidades, o RNA guia é um dgRNA. Em algumas modalidades, o RNA guia é um tracrRNA. Em algumas modalidades, o RNA guia é um crRNA.

[006] Os RNAs guia descritos no presente documento compreendem pelo menos um nucleotídeo modificado. As modificações podem incluir ligação 2'-O-metil (2'-O-Me), 2'-O-(2-metoxietil) (2'-O-moe), 2'-fluoro (2'-F), fosforotioato (PS) entre nucleotídeos, substituições G-C e ligações abásicas invertidas entre nucleotídeos e seus equivalentes. Modalidades da invenção incluem:

[007] Em algumas modalidades, um RNA guia único (sgRNA) é englobado que compreende uma modificação na extremidade 5' e uma ou mais modificações em um ou mais dos seguintes: a região de haste superior; a região de grampo 1; e a região de grampo 2, em que a modificação da extremidade 5' compreende pelo menos duas ligações de fosforotioato nos primeiros sete nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5'. Em alguns casos, a modificação é um nucleotídeo modificado com 2'-O-metil (2'-O-Me). Em algumas modalidades, a modificação é um nucleotídeo modificado 2'-fluoro (2'-F).

[008] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em US1 a US12 e/ou uma modificação em H1-1 e/ou uma modificação em H2-1. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em H1-1 a H1-12 e/ou H2-1 a H2-15. Em algumas moda-

lidades, o sgRNA compreende uma ou mais modificações em cada uma das regiões de haste superior, região de grampo 1 e região de grampo 2. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende um nucleotídeo modificado entre as regiões de grampo 1 e de grampo 2. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma modificação na região de haste inferior.

[009] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma modificação no terminal 5' e/ou no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma modificação de extremidade 3' no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em pelo menos dois dos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma modificação de extremidade 5' no terminal 5'. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em pelo menos dois dos primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5'. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma modificação de extremidade 3' no terminal 3' e uma modificação de extremidade 5' no terminal 5'. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em pelo menos dois dos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' e em pelo menos dois dos primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5'. Em alguns casos, essas modificações são ligações 2'-O-Me, 2'-F, 2'-O-moe ou fosforotioato (PS) que ligam os nucleotídeos. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende ligações de PS entre pelo menos dois dos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' e/ou pelo menos dois dos primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5'. Em alguns casos, o sgRNA compreende terminal 5' e terminal 3' com mais de uma modificação como descrito aqui, como, com ligações de PS e modificações de 2'-O-Me.

[0010] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma mo-

dificação na região de protuberância. Em algumas modalidades, 50% dos nucleotídeos na região de protuberância são modificados, em que a modificação é 2'-O-Me ou 2'-F.

[0011] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma modificação na região denexo. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em N15, N16, N17 e/ou N18 na região de nexos, em que a modificação é 2'-O-Me ou 2'-F. Em alguns casos, N16, N17 e N18 estão ligados a ligações de PS.

[0012] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende pelo menos os três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5', e os três últimos nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são modificados.

[0013] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações no terminal 3' e/ou terminal 5'. Em alguns casos, os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5', e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' estão ligados com ligações de fosforotioato (PS). Em algumas modalidades, a modificação de 5' e 3' compreende 2'-O-Me ou 2'-O-moe. Em algumas modalidades, a modificação de 5' e 3' compreende 2'-F. Em algumas modalidades, a modificação de 5' e/ou 3' compreende ligações de PS ligando nucleotídeos. Em algumas modalidades, a modificação de 5' e/ou 3' compreende um ou mais de 2'-O-Me, 2'-O-moe, 2'-F e PS que ligam os nucleotídeos.

[0014] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações nos primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e nos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'. Em alguns casos, estas modificações estão ligando a ligação de PS (isto é, ligações de PS que ligam os primeiros quatro e os últimos quatro nucleotídeos). Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende modificações de 2'-O-Me nos primeiros três nucleotídeos

na extremidade 5' do terminal 5' e nos últimos três nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

[0015] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações nos primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3', em que as modificações são pelo menos ligações de PS ligando os quatro nucleotídeos, e ainda em que os três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos três nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' compreendem 2'-O-Me, 2'-O-moe, ou modificações de 2'-F.

[0016] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12, em que a modificação é 2'-O-Me ou 2'-F.

[0017] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em cada um dos nucleotídeos na região de protuberância, em que a modificação é 2'-O-Me ou 2'-F.

[0018] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em cada um dos nucleotídeos na região de haste superior, em que a modificação é 2'-O-Me ou 2'-F.

[0019] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em cada um dos nucleotídeos na região de grampo 1, em que a modificação é 2'-O-Me ou 2'-F.

[0020] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em cada um dos nucleotídeos na região de grampo 2, em que a modificação é 2'-O-Me ou 2'-F.

[0021] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nas seguintes posições:

a. os primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';

- b. LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e/ou LS12 na região de haste inferior;
- c. B1 e/ou B2 na região de protuberância;
- d. cada nucleotídeo na região de haste superior;
- e. N16, N17 e/ou N18 na região de nexos;
- f. cada nucleotídeo na região de grampo 1;
- g. cada nucleotídeo na região de grampo 2; e
- h. os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

[0022] Em algumas modalidades, B3-B6 são modificados com 2'-O-Me. Em alguns casos, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações de 2'-F em LS9 e LS10. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende 2'-F modificações em N15, N16, N17 e N18. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende 2'-F modificações em H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 e H2-15. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende 2'-F modificações no segundo ao último, terceiro ao último e quarto ao último nucleotídeo na extremidade 3' do terminal 3'.

[0023] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende nucleotídeos modificados com 2'-F nas seguintes posições:

- a. LS9 e LS10 na região de haste inferior;
- b. N15, N16, N17 e N18 na região de nexos; e
- c. H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 e H2-15 na região de grampo 2.

[0024] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende nucleotídeos modificados com 2'-F no penúltimo, terceiro ao último e quarto ao

último nucleotídeo no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos três dos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

[0025] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me opcionais em LS1 e/ou LS6;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- e. Nucleotídeo modificado opcional 2'-O-Me entre grampo 1 e grampo 2;
- f. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
- e

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'; e opcionalmente

[0026] que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

[0027] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende:

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros

nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';

- b. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS1-LS6;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- e. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1

e Grampo 2;

- f. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;

e

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'; e opcionalmente

[0028] que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

[0029] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende:

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';

- b. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS2-LS5;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1 e LS6;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- f. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1

e Grampo 2;

- g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;

e

h. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' e opcionalmente

[0030] que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5'

do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

[0031] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende:

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS7, LS8, LS11 e LS12;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- e. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;
- f. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
- e

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3',

[0032] e opcionalmente que compreende adicionalmente três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

[0033] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende:

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS7, LS8, LS11 e LS12;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS9 e LS10;
- e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- f. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1

e Grampo 2;

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;

e

h. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3',

[0034] e opcionalmente que compreende adicionalmente três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

[0035] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende:

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';

b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS8, LS10 e LS12;

d. nucleotídeos modificados com 2'-O-F em LS7, LS9 e LS11;

e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;

f. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;

e

h. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3', e opcionalmente

[0036] que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

[0037] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que

compreende:

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- e. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;
- f. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
- e
- g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3', e opcionalmente

[0038] que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'

[0039] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende:

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS9 e LS10;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- f. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;
- g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;

e

h. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3', e opcionalmente

[0040] que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

[0041] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende:

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';

b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;

d. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;

e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-8;

f. nucleotídeos modificados com 2'-F em H2-9 - H2-15;

g. nucleotídeos modificados com 2'-F no segundo do último, terceiro do último e quarto do último nucleotídeo no terminal 3'; e

h. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me no último nucleotídeo no terminal 3', e opcionalmente

[0042] que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

[0043] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende:

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';

b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-2, H1-4,

H1-6, H1-8, H1-10 e H1-12;

d. nucleotídeos modificados com 2'-F em H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9 e H1-11;

e. um nucleotídeo modificado 2'-F entre Grampo 1 e Grampo 2;

f. nucleotídeos modificados com 2'-F em H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12; e H2-14;

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11; H2-13 e H2-15;

h. nucleotídeos modificados com 2'-F no segundo do último e quarto do último nucleotídeo no terminal 3'; e

i. Nucleotídeo modificado com 2'-O-Me no terceiro do último e último nucleotídeo na extremidade 3' do terminal 3',

[0044] e opcionalmente que compreende adicionalmente três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

[0045] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende:

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me LS8, LS10, LS12, H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10, H1-12, H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11, H2-13 e H2-15; e

b. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS7, LS9, LS11; H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9, H1-11, H1-13, H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12 e H2-14, e opcionalmente

[0046] que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'; e opcionalmente que adicionalmente compreende:

c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me no último e terceiro a último nucleotídeo na extremidade 3' do terminal 3'; e/ou

d. nucleotídeos modificados com 2'-F no penúltimo, quarto ao último e/ou último nucleotídeo na extremidade 3' do terminal 3'.

[0047] Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 228-353, incluindo as modificações da Tabela 4. Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende qualquer uma das SEQ ID Nos: 228-332, incluindo as modificações da Tabela 4. Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende qualquer das SEQ ID Nos: 235-240, 265-285 e 309-329, incluindo as modificações da Tabela 4. Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende a SEQ ID No. 240. Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende a SEQ ID No.240, incluindo as modificações da Tabela 4. Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende a SEQ ID No.242. Em algumas modalidades, um sgRNA é englobado que compreende a SEQ ID No: 358. Em modalidades adicionais, um sgRNA que compreende ácidos nucleicos tendo pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75, ou 70% de identidade com os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 235-240, 265-285 e 309-329, em que a modificação em cada nucleotídeo do sgRNA que corresponde a um nucleotídeo do identificador de sequência de referência na Tabela 4, é idêntica ou equivalente à modificação mostrada no identificador de sequência de referência na Tabela 4, opcionalmente que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende pelo menos três ligações de PS ligando os nucleotídeos na região de grampo 1. Em algu-

mas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende pelo menos três ligações de PS ligando os nucleotídeos na região de grampo 2. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende pelo menos três ligações de PS ligando os nucleotídeos na região de haste superior. Em algumas modalidades, o sgRNA forma um complexo ribonucleoproteico com Cas9 de *S. pyogenes*.

LEGENDAS DAS FIGURAS

[0048] A FIG 1 mostra a percentagem de edição como medida pela sequência de nova geração (NGS) do gene de transtirretina de camundongo (TTR) após transfecção de células Neuro2A com crRNAs modificados em conjunto com Cas9 mRNA e trRNA não modificado (TR000002).

[0049] A FIG 2 mostra a percentagem de edição como medida por NGS do gene de TTR de camundongo após transfecção de células Neuro2A com trRNAs modificados juntamente com crRNA não modificado (CR000686) e Cas9 mRNA.

[0050] A FIG 3 mostra a percentagem de edição como medida por NGS do gene de TTR de camundongo após transfecção de células Neuro2A com Cas9 mRNA e crRNAs e trRNAs tendo pares G-C não encontrados em sequências parentais.

[0051] A FIG 4 mostra a percentagem de edição medida por NGS do gene de TTR de camundongo após transfecção de células Neuro2A com crRNAs e trRNAs modificados em conjunto com Cas9 mRNA. Desvios padrão seguem o valor.

[0052] A FIG 5 mostra a percentagem de edição como medida por NGS do gene de TTR de camundongo após transfecção de células Neuro2A com sgRNAs modificados em conjunto com Cas9 mRNA.

[0053] A FIG 6 mostra a percentagem de edição como medida por NGS do gene de TTR de camundongo após transfecção de células Neuro2A com crRNAs modificados e trRNA não modificado

(TR000002) em conjunto com Cas9 mRNA. O asterisco indica um guia duplo que, por motivos técnicos, não mostrou atividade nesse experimento. Este guia duplo foi testado novamente no experimento representado na Figura 9, em que mostrou atividade de edição.

[0054] A FIG 7 mostra a percentagem de edição como medida por NGS do gene de TTR de camundongo após transfecção de células Neuro2A com crRNA não modificado (CR000686) e trRNAs modificados em conjunto com Cas9 mRNA.

[0055] A FIG 8 mostra a percentagem de edição como medida por NGS do gene de TTR de camundongo após transfecção de células Neuro2A com Cas9 mRNA e emparelhamentos de crRNA e trRNA com emparelhamentos G-C ou incompatibilidades G-U não encontrados nas sequências parentais.

[0056] A FIG 9 mostra a percentagem de edição como medida por NGS do gene de TTR de camundongo após transfecção de células Neuro2A com crRNAs modificados e trRNAs modificados em conjunto com Cas9 mRNA. Desvios padrão seguem o valor.

[0057] A FIG 10 mostra a percentagem de edição medida por NGS do gene de TTR de camundongo após transfecção de células Neuro2A com sgRNAs modificados em conjunto com Cas9 mRNA.

[0058] A Fig. 11 mostra a percentagem de edição como medida por NGS do gene do Fator VII de camundongo (FVII) após transfecção de células Neuro2A com gRNA modificados em conjunto com Cas9 mRNA.

[0059] As Figuras 12A e 12B mostram a percentagem de edição medida por NGS de TTR de camundongo (FIG 12A) ou FVII (FIG 12B) após transfecção de células Neuro2A com crRNAs modificados e trRNA não modificado juntamente com Cas9 mRNA.

[0060] As Figuras 13A e 13B mostram a percentagem de edição medida por NGS de TTR de camundongo (FIG 13A) ou FVII (FIG 13B)

após transfecção de células Neuro2A com trRNAs modificados e crRNA não modificado em conjunto com Cas9 mRNA.

[0061] As Figuras 14A, 14B, 14C e 14D mostram níveis de interferon alfa (IFN-alfa, 14A), interleucina 6 (IL-6, 14B), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1, 14C) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa, 14D) no soro após administração in vivo de LNPs que compreende Cas9 mRNA e sgRNAs.

[0062] As Figuras 15A, 15B e 15C mostram resultados in vivo após a administração de LNPs que compreende Cas9 mRNA e sgRNAs. A FIG 15A mostra a percentagem da edição total no fígado. A FIG 15B mostra níveis de TTR no soro. A FIG 15C mostra a média e o desvio padrão para os resultados da FIG 15A. A FIG 15D resume modificações ao sgRNA G000209 (SEQ ID NO: 228). A FIG 15E resume modificações ao sgRNA G000267 (SEQ ID NO: 234). Nas Figuras 15D e 15E, os nucleotídeos em negrito são modificados com 2'-O-Me.

[0063] As Figuras 16A, 16B, 16C e 16D mostram níveis de interferon alfa (IFN-alfa, 16A), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa, 16B), interleucina 6 (IL-6, 16C) e proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1, 16D) no soro após administração in vivo de LNPs que compreende Cas9 mRNA e sgRNAs.

[0064] As Figuras 17A, 17B, 17C e 17D mostram resultados in vivo após a administração de LNPs que compreende Cas9 mRNA e sgRNAs. A FIG 17A mostra a percentagem da edição total no fígado. A FIG 17B mostra a média e o desvio padrão para os resultados da FIG 17A. A FIG 17C mostra níveis de TTR no soro. A FIG 17D mostra a média e o desvio padrão para os resultados da FIG 17B.

[0065] As Figuras 18A, 18B e 18C mostram resultados in vivo após a administração de LNPs que compreende Cas9 mRNA e sgRNAs. A FIG 18A mostra a percentagem da edição total no fígado. A FIG 18B resume os dados de edição do fígado. A FIG 18C mostra ní-

veis de TTR no soro. MPK = miligramas por quilograma; BLOD = abaixo do nível de detecção.

[0066] As Figuras 19A, 19B, 19C e 19D mostram níveis de interferon alfa (IFN-alfa, 19A), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1, 19B), interleucina 6 (IL-6, 19C) e fator de necrose tumoral alfa. (TNF-alfa, 19D) no soro após administração in vivo de LNPs que compreende Cas9 mRNA e sgRNAs.

[0067] As Figuras 20A e 20B mostram a edição no fígado do locus FVII (FIG 20A) e do locus TTR (FIG 20B) após a administração in vivo de LNPs que compreende Cas9 mRNA e sgRNAs.

[0068] As Figuras 21A, 21B e 21C mostram esquemas de um sgRNA anotado (SEQ ID NO: 341) (FIG 21A), dgRNA CR000686 não anotado (SEQ ID NO: 1) e TR000002 (SEQ ID NO: 188) (FIG 21B), e dgRNA CR000686 anotado (SEQ ID NO: 1) e TR000002 (SEQ ID NO: 188) (FIG 21C).

[0069] As Figuras 22A, 22B e 22C mostram resultados in vivo após a administração de LNPs que compreende Cas9 mRNA e sgRNAs. A FIG 22A mostra a percentagem da edição total do locus de TTR no fígado. A FIG 22B resume os dados de edição do fígado. A FIG 22C mostra os níveis de TTR no soro.

[0070] As Figuras 23A, 23B e 23C mostram resultados in vivo após a administração de LNPs que compreende Cas9 mRNA e sgRNAs. A FIG 23A mostra a percentagem da edição total do locus de TTR no fígado. A FIG 23B resume os dados de edição do fígado. A figura 23C mostra os níveis de TTR no soro.

[0071] As Figuras 24A, 24B e 24C mostram edição em hepatócitos primários de murgancho após administração de LNPs que compreende Cas9 mRNA e sgRNAs. A FIG 24A mostra a percentagem de edição da edição total do locus TTR. A FIG 24B mostra transformações normalizadas da percentagem de edição como uma função da dose de

mRNA usada para calcular EC50. A FIG 24C mostra valores EC50 para as LNPs testados.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0072] São aqui fornecidos RNAs guias modificados, incluindo RNAs guias duplos e únicos para uso em métodos de edição de genes. As guias modificadas são mais estáveis e apresentam eficácia in vitro e in vivo melhorada, quando comparadas às suas contrapartes não modificadas. Sequências de RNAs guias de engenharia e testados são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
	crRNA			
1	CR000686		não modificado	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGCUAUGC UGUUUUG
2	CR003393	CR686-1	superior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAmGmCmU mAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
3	CR003394	CR686-2	superior parcial	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGCUAmUm GmCmUmGmUmUmUmUmG
4	CR003395	CR686-3	superior parcial	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGCUAUGC mUmGmUmUmUmUmG
5	CR003396	CR686-4	superior parcial	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGCUAUGC UGUmUmUmUmG
6	CR003397	CR686-5	inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGmGmUmUmUmUmAGA GCUAUGCUGUUUUG
7	CR003398	CR686-6	caminhando para inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGmGUUUUAGAGCUAUG CUGUUUUG
8	CR003399	CR686-7	caminhando para inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGmUUUUAGAGCUAUG CUGUUUUG
9	CR003400	CR686-8	caminhando para inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUmUUUAGAGCUAUG CUGUUUUG
10	CR003401	CR686-9	caminhando para inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUmUUAGAGCUAUG CUGUUUUG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
11	CR003402	CR686-10	caminhando para inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
12	CR003403	CR686-11	caminhando para inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
13	CR003404	CR686-12	inferior parcial	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGmUmUmUmUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
14	CR003405	CR686-13	inferior parcial	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUmUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
15	CR003406	CR686-GC1	GC inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGGCGCAGAGCUAUGCUGUUUUUG
16	CR003407	CR686-GC3	GC superior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUUAGAGCUAUGCUGGCGCG
17	CR003408	CR686-GC5	GC superior Inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGGCGCAGAGCUAUGCUGGCGCG
18	CR003409	CR686 all OMe		mCmCmAmGmUmCmCmAmGmCmGmAmGmGmCmA mAmAmGmGmGmUmUmUmUmAmGmAmGmCmUmAm UmGmCmUmGmUmUmUmUmG
19	CR003393-mod only		superior	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
20	CR003394 - mod only		superior parcial	GUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
21	CR003395 - mod only		superior parcial	GUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUmUmUmG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
22	CR003396 - mod only		superior parcial	GUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUmUmG
23	CR003397 - mod only		inferior	mGmUmUmUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
24	CR003398 - mod only		caminhando para inferior	mGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
25	CR003399 - mod only		caminhando para inferior	GmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
26	CR003400 - mod only		caminhando para inferior	GUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
27	CR003401 - mod only		caminhando para inferior	GUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
28	CR003402- mod only		caminhando para inferior	GUUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
29	CR003403- mod only		caminhando para inferior	GUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
30	CR003404 - mod only		inferior parcial	GmUmUmUmUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
31	CR003405 - mod only		inferior parcial	GUmUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
32	CR003721	CR686-14	superior e inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGmGUUUUmUmAGAmGm CmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
33	CR003722	CR686-15	combo inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGmGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
34	CR003723	CR686-16	combo superior, inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGmGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
35	CR003724	CR686-17	combo inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGmGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
36	CR003725	CR686-18	combo superior, inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGmGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
37	CR003726	CR686-19	caminhando para nexo	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAmGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
38	CR003727	CR686-20	caminhando para nexo	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGmAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
39	CR003728	CR686-21	caminhando para nexo	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAFgAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
40	CR003729	CR686-22	caminhando para nexo	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
41	CR003730	CR686-23	2°F caminhando para inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
42	CR003731	CR686-24	2°F caminhando para inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
43	CR003732	CR686-25	2°F caminhando para inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUFUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
44	CR003733	CR686-26	2°F caminhando para inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUfUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
45	CR003734	CR686-27	2°F combo inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGfGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
46	CR003735	CR686-28	inferior alt	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGfGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
47	CR003736	CR686-29	inferior alt	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGmGfUmUfUmUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
48	CR003737	CR686-GC6	GC inferior	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUCUCAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
49	CR003738	CR686-GC7	Caminhando para inferior C	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGCUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
50	CR003739	CR686-GC8	Caminhando para inferior C	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUCUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
51	CR003740	CR686-GC9	Caminhando para inferior C	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUCUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
52	CR003741	CR686-GC10	Caminhando para inferior C	CCAGUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUCAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
53	CR003721-mod only	CR686-14-mod only	superior e inferior	mGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
54	CR003722-mod only	CR686-15-mod only	combo inferior	mGUUUUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
55	CR003723-mod only	CR686-16-mod only	combo superior, inferior	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
56	CR003724-mod only	CR686-17-mod only	combo inferior	mGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
57	CR003725-mod only	CR686-18-mod only	combo superior, inferior	mGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
58	CR003726-mod only	CR686-19-mod only	caminhando para nexo	GUUUUAmGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
59	CR003727-mod only	CR686-20-mod only	caminhando para nexo	GUUUUAGmAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
60	CR003728-mod only	CR686-21-mod only	caminhando para nexo	GUUUUAfGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
61	CR003729-mod only	CR686-22-mod only	caminhando para nexo	GUUUUAGfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
62	CR003730-mod only	CR686-23-mod only	2°F caminhando para inferior	GfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
63	CR003731-mod only	CR686-24-mod only	2°F caminhando para inferior	GUfUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
64	CR003732-mod only	CR686-25-mod only	2°F caminhando para inferior	GUUfUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
65	CR003733-mod only	CR686-26-mod only	2°F caminhando para inferior	GUUUfUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
66	CR003734-mod only	CR686-27-mod only	2°F combo inferior	fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
67	CR003735-mod only	CR686-28-mod only	inferior alt	fGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
68	CR003736-mod only	CR686-29-mod only	inferior alt	mGfUmUfUmUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
69	CR003737-mod only	CR686-GC6-mod only	GC inferior	GUCUCAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
70	CR003738-mod only	CR686-GC7-mod only	Caminhando para inferior C	GCUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
71	CR003739-mod only	CR686-GC8-mod only	Caminhando para inferior C	GUCUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
72	CR003740-mod only	CR686-GC9-mod only	Caminhando para inferior C	GUUCUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
73	CR003741-mod only	CR686-GC10-mod only	Caminhando para inferior C	GUUUCAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
74	CR000705		não modificado	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
75	CR004188	CR705-1	superior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
76	CR004189	CR705-2	superior parcial	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
77	CR004190	CR705-3	superior parcial	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAUGC mUmGmUmUmUmUmG
78	CR004191	CR705-4	superior parcial	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAUGC UGUmUmUmUmG
79	CR004192	CR705-5	inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGmUmUmUmUmUmAGA GCUAUGCUGUUUUUG
80	CR004193	CR705-6	caminhando para inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGmUUUUUAGAGCUAUG CUGUUUUUG
81	CR004194	CR705-7	caminhando para inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGmUUUUUAGAGCUAUG CUGUUUUUG
82	CR004195	CR705-8	caminhando para inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUmUUUAGAGCUAUG CUGUUUUUG
83	CR004196	CR705-9	caminhando para inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUmUUAGAGCUAUG CUGUUUUUG
84	CR004197	CR705-10	caminhando para inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUG CUGUUUUUG
85	CR004198	CR705-11	caminhando para inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUmAGAGCUAUG CUGUUUUUG
86	CR004199	CR705-14	superior e inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGmUUUmUmAGAmGmC mUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
87	CR004200	CR705-15	combo inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGmUUUmUmAGAGCUA UGCUGUUUUUG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
88	CR004201	CR705-16	combo superior, inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAmGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
89	CR004202	CR705-17	combo inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAmGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
90	CR004203	CR705-18	combo superior, inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAmGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
91	CR004204	CR705-19	caminhando para nexo	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAmGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
92	CR004205	CR705-20	caminhando para nexo	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGmAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
93	CR004206	CR705-21	caminhando para nexo	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAfGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
94	CR004207	CR705-22	caminhando para nexo	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
95	CR004208	CR705-23	2°F caminhando para inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
96	CR004209	CR705-24	2°F caminhando para inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUfUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
97	CR004210	CR705-25	2°F caminhando para inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUfUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
98	CR004211	CR705-26	2°F caminhando para inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUfUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
99	CR004212	CR705-27	2°F combo inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAfGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
100	CR004213	CR705-28	inferior alt	UUACAGCCACGUCUACAGCAfGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
101	CR004214	CR705-29	inferior alt	UUACAGCCACGUCUACAGCAmGfUmUfUmUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
102	CR004215	CR705-GC1	GC inferior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGGCGCAGAGCUAUGCUGUUUUG
103	CR004216	CR705-GC3	GC superior	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAUGCUGGCGCG
104	CR004188-mod only	CR705-1-mod only	superior	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
105	CR004189-mod only	CR705-2-mod only	superior parcial	GUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
106	CR004190-mod only	CR705-3-mod only	superior parcial	GUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUmUmUmUmG
107	CR004191-mod only	CR705-4-mod only	superior parcial	GUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUmUmUmG
108	CR004192-mod only	CR705-5-mod only	inferior	mGmUmUmUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
109	CR004193-mod only	CR705-6-mod only	caminhando para inferior	mGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
110	CR004194-mod only	CR705-7-mod only	caminhando para inferior	GmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
111	CR004195-mod only-mod only	CR705-8-mod only	caminhando para inferior	GUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
112	CR004196-mod only	CR705-9-mod only	caminhando para inferior	GUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
113	CR004197-mod only	CR705-10-mod only	caminhando para inferior	GUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
114	CR004198-mod only	CR705-11-mod only	caminhando para inferior	GUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
115	CR004199-mod only	CR705-14-mod only	superior e inferior	mGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
116	CR004200-mod only	CR705-15-mod only	combo inferior	mGUUUUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
117	CR004201-mod only	CR705-16-mod only	combo superior, inferior	mGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
118	CR004202-mod only	CR705-17-mod only	combo inferior	mGUUUUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
119	CR004203-mod only	CR705-18-mod only	combo superior, inferior	mGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
120	CR004204-mod only	CR705-19-mod only	caminhando para nexa	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
121	CR004205-mod only	CR705-20-mod only	caminhando para nexo	GUUUUAGmAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
122	CR004206-mod only	CR705-21-mod only	caminhando para nexo	GAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
123	CR004207-mod only	CR705-22-mod only	caminhando para nexo	GfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
124	CR004208-mod only	CR705-23-mod only	2°F caminhando para inferior	GfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
125	CR004209-mod only	CR705-24-mod only	2°F caminhando para inferior	GUfUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
126	CR004210-mod only	CR705-25-mod only	2°F caminhando para inferior	GUUfUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
127	CR004211-mod only	CR705-26-mod only	2°F caminhando para inferior	GUUUfUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
128	CR004212-mod only	CR705-27-mod only	2°F combo inferior	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
129	CR004213-mod only	CR705-28-mod only	inferior alt	fGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
130	CR004214-mod only	CR705-29-mod only	inferior alt	mGfUmUfUmUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
131	CR000657		não modificado	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
132	CR004218	CR657-1	superior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
133	CR004219	CR657-2	superior parcial	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
134	CR004220	CR657-3	superior parcial	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUmUmUmG
135	CR004221	CR657-4	superior parcial	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUmUmG
136	CR004222	CR657-5	inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCmGmUmUmUmUmAGA GCUAUGCUGUUUUG
137	CR004223	CR657-6	caminhando para inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
138	CR004224	CR657-7	caminhando para inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
139	CR004225	CR657-8	caminhando para inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
140	CR004226	CR657-9	caminhando para inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
141	CR004227	CR657-10	caminhando para inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUG
142	CR004228	CR657-11	caminhando para inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
143	CR004229	CR657-14	superior e inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
144	CR004230	CR657-15	combo inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
145	CR004231	CR657-16	combo superior, inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
146	CR004232	CR657-17	combo inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
147	CR004233	CR657-18	combo superior, inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
148	CR004234	CR657-19	caminhando para nexo	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
149	CR004235	CR657-20	caminhando para nexo	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGmAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
150	CR004236	CR657-21	caminhando para nexo	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAfGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
151	CR004237	CR657-22	caminhando para nexo	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
152	CR004238	CR657-23	2°F caminhando para inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
153	CR004239	CR657-24	2°F caminhando para inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUfUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
154	CR004240	CR657-25	2°F caminhando para inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUfUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
155	CR004241	CR657-26	2°F caminhando para inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUfUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
156	CR004242	CR657-27	2°F combo inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCfGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
157	CR004243	CR657-28	inferior alt	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCfGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
158	CR004244	CR657-29	inferior alt	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCmGfUmUfUmUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
159	CR004245	CR657-GC1	GC inferior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGGCGCAGAGCUAUGCUGUUUUG
160	CR004246	CR657-GC3	GC superior	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGGCGCG
161	CR004218-mod only	CR657-1-mod only	superior	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
162	CR004219-mod only	CR657-2-mod only	superior parcial	GUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
163	CR004220-mod only	CR657-3-mod only	superior parcial	GUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUmUmUmG
164	CR004221-mod only	CR657-4-mod only	superior parcial	GUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUmUmG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
165	CR004222-mod only	CR657-5-mod only	inferior	mGmUmUmUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
166	CR004223-mod only	CR657-6-mod only	caminhando para inferior	mGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
167	CR004224-mod only	CR657-7-mod only	caminhando para inferior	GmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
168	CR004225-mod only	CR657-8-mod only	caminhando para inferior	GUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
169	CR004226-mod only	CR657-9-mod only	caminhando para inferior	GUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
170	CR004227-mod only	CR657-10-mod only	caminhando para inferior	GUUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUG
171	CR004228-mod only	CR657-11-mod only	caminhando para inferior	GUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
172	CR004229-mod only	CR657-14-mod only	superior e inferior	mGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
173	CR004230-mod only	CR657-15-mod only	combo inferior	mGUUUUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
174	CR004231-mod only	CR657-16-mod only	combo superior, inferior	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
175	CR004232-mod only	CR657-17-mod only	combo inferior	mGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
176	CR004233-mod only	CR657-18-mod only	combo superior, inferior	mGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
177	CR004234-mod only	CR657-19-mod only	caminhando para nexo	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
178	CR004235-mod only	CR657-20-mod only	caminhando para nexo	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
179	CR004236-mod only	CR657-21-mod only	caminhando para nexo	GUUUUAfGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
180	CR004237-mod only	CR657-22-mod only	caminhando para nexo	GUUUUAGfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
181	CR004238-mod only	CR657-23-mod only	2°F caminhando para inferior	GfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
182	CR004239-mod only	CR657-24-mod only	2°F caminhando para inferior	GUfUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
183	CR004240-mod only	CR657-25-mod only	2°F caminhando para inferior	GUUfUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
184	CR004241-mod only	CR657-26-mod only	2°F caminhando para inferior	GUUUfUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
185	CR004242-mod only	CR657-27-mod only	2°F combo inferior	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
186	CR004243-mod only	CR657-28-mod only	inferior alt	fGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
187	CR004244-mod only	CR657-29-mod only	inferior alt	mGfUmUfUmUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
	trRNA			
188	TR000002		não modificado	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU UUU
189	TR000110	TR2-v2-1	cauda encurtada	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
190	TR000111	TR2-v2-2	Superior, grampos	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmUmUmUmU
191	TR000112	TR2-v2-3	superior apenas	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU
192	TR000113	TR2-v2-4	grampo 1	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU
193	TR000114	TR2-v2-5	grampo 2	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAAGUGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmUmUmUmU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
194	TR000115	TR2-v2-6	superior, grampo 2	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
195	TR000116	TR2-v2-7	ambos grampos	AACAGCAUAGCAAGUUAUUAAUAAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmU mU
196	TR000117	TR2-v2-8	caminhando para inferior	AACAGCAUAGCAAGUmUmAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU
197	TR000118	TR2-v2-9	caminhando para inferior	AACAGCAUAGCAAGUUAUmAmAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU
198	TR000119	TR2-v2-10	caminhando para inferior	AACAGCAUAGCAAGUUAUUAAmAmUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU
199	TR000120	TR2-v2-11	nexo parcial	AACAGCAUAGCAAGUUAUUAAUAAAGGCUAGUCCGmU mUmAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC UUUU
200	TR000121	TR2-v2-12	nexo parcial	AACAGCAUAGCAAGUUAUUAAUAAAGGCUAGUCCGUUA mUmCmAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
201	TR000122	TR2-GC1	GC inferior	AACAGCAUAGCAAGUUGCGCUAAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU U
202	TR000123	TR2-GC3	GC superior	GCCAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
203	TR000124	TR2-GC5	GC inferior superior	GCCAGCAUAGCAAGUUGCGCUAAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU U
204	TR000125	TR2 all OMe		mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUm AmAmAmAmUmAmAmGmGmCmUmAmGmUmCmCmG mUmUmAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmUmUmUmUmUmUmU
205	TR000126	TR2-v2-13	inferior	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUmUmAmAm AmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
206	TR000127	TR2-v2-14	inferior	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmA mUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmUmUmUmU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
207	TR000128	TR2-v2-15	inferior	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAm AmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmUmUmUmU
208	TR000129	TR2-v2-16	inferior alt	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUmUfAmAfAm AfUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmUmUmUmU
209	TR000130	TR2-v2-17	inferior alt	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfA mUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmUmUmUmU
210	TR000131	TR2-v2-18	caminhando para nexo	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCmAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmUmUmUmU
211	TR000132	TR2-v2-19	caminhando para nexo	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmUmUmUmU
212	TR000133	TR2-v2-20	caminhando para nexo	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUmUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmUmUmUmU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
213	TR000134	TR2-v2-21	caminhando para nexo	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUmAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmUmUmUmU
214	TR000135	TR2-v2-22	caminhando para nexo	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUmUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmUmUmUmU
215	TR000136	TR2-v2-23	caminhando para nexo	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGmUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmUmUmUmU
216	TR000137	TR2-v2-24	caminhando para nexo	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmUmUmUmU
217	TR000138	TR2-v2-25	caminhando para nexo	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUfAfUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmUmUmUmU
218	TR000139	TR2-v2-26	caminhando para nexo	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGfUfUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmUmUmUmU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
219	TR000140	TR2-v2-27	caminhando para nexo	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA mGmGmCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmUmUmUmU
220	TR000141	TR2-v2-28	caminhando para nexo	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUmCmCmGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmUmUmUmU
221	TR000142	TR2-v2-29	protuberância walk	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCmAmAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmUmUmUmU
222	TR000143	TR2-v2-30	protuberância walk	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAmGmUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmUmUmUmU
223	TR000144	TR2-GC6	GC inferior	AACAGCAUAGCAAGUUGAGAUAAAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU U
224	TR000145	TR2-GC7	Caminhando para GC inferior	AACAGCAUAGCAAGUUAAGUAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
225	TR000146	TR2-GC8	Caminhando para GC inferior	AACAGCAUAGCAAGUUAAGUAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
226	TR000147	TR2-GC9	Caminhando para GC inferior	AACAGCAUAGCAAGUUAGAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
227	TR000148	TR2-GC10	Caminhando para GC inferior	AACAGCAUAGCAAGUUAGAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
	sgRNA			
228	G000209			mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU* mU*U
229	G000262	G209-1	grampo 2	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAGUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
230	G000263	G209-2	grampos	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
231	G000264	G209-3	tetralaço	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGC UAmGmAmAmAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC mU*mU*mU*U

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
232	G000265	G209-4	superior	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAmG mCmUmAGAAAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCmU*mU*mU*U
233	G000266	G209-5	superior e laço	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCmU*mU*mU*U
234	G000267	G209-6	superior, laço, grampos	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*mU
235	G000262- mod only	G209-1-mod only	grampo 2	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
236	G000263- mod only	G209-2-mod only	grampos	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU
237	G000264- mod only	G209-3-mod only	tetralaço	GUUUUAGAGCUAmGmAmAmAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACC GAGUCGGUGCmU*mU*mU*U

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
238	G000265-mod only	G209-4-mod only	superior	GUUUUAGAmGmCmUmAGAAAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG CACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
239	G000266-mod only	G209-5-mod only	superior e laço	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
240	G000267-mod only	G209-6-mod only	superior, laço, grampos	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
241	G000211		mod de extremidade	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU* mU*U
242	G000282		mod6	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*mU
243	G000201		não mod	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
244	G000331	G211-7	cr inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAmGUUUUmAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
245	G000332	G211-8	cr inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAfGfUfUfUfAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
246	G000333	G211-9	cr inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAmGfUfUfUfUmA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
247	G000334	G211-10	tr inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmA mUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
248	G000335	G211-11	tr inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAm AmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
249	G000336	G211-12	tr inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfA mUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
250	G000337	G211-13	tudo inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUmAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAA AmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
251	G000338	G211-14	tudo inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUmAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAf AmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
252	G000339	G211-15	tudo inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAmGUUUUmAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAm AfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
253	G000340	G211-16	tudo inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAfGfUfUfUfUfAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAA AmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
254	G000341	G211-17	tudo inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAfGfUfUfUfUfAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAf AmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
255	G000342	G211-18	tudo inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAfGfUfUfUfUfAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAm AfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
256	G000343	G211-19	Cr protuberante	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAmGmA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
257	G000344	G211-20	Tr protuberante	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
258	G000345	G211-21	nexo	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
259	G000346	G211-22	nexo	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
260	G000347	G211-23	tudo inferior	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAfGfUfUfUfUfAmG mAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGm UmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAma mCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
261	G000348	G211-24	no PS	mUmUmACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmUmUmUmU
262	G000349	G211-25	2 OMe PS	mU*mU*ACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmUmU*mU*mU
263	G000350	G211-26	2'F grampo	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGfUfCfGfGfUfGf CfU*fU*fU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
264	G000351	G211-27	Alt grampo	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfG mUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU* fU*mU
265	G000331- mod only	G211-7-mod only	cr inferior	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
266	G000332- mod only	G211-8-mod only	cr inferior	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
267	G000333- mod only	G211-9-mod only	cr inferior	mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
268	G000334- mod only	G211-10-mod only	tr inferior	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAA GUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
269	G000335-mod only	G211-11-mod only	tr inferior	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
270	G000336-mod only	G211-12-mod only	tr inferior	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
271	G000337-mod only	G211-13-mod only	tudo inferior	mGUUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmA mCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
272	G000338-mod only	G211-14-mod only	tudo inferior	mGUUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
273	G000339-mod only	G211-15-mod only	tudo inferior	mGUUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmA mCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
274	G000340-mod only	G211-16-mod only	tudo inferior	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmA mCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
275	G000341-mod only	G211-17-mod only	tudo inferior	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
276	G000342-mod only	G211-18-mod only	tudo inferior	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
277	G000343-mod only	G211-19-mod only	Cr protuberante	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
278	G000344-mod only	G211-20-mod only	Tr protuberante	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
279	G000345-mod only	G211-21-mod only	nexo	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
280	G000346-mod only	G211-22-mod only	nexo	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
281	G000347-mod only	G211-23-mod only	tudo inferior	fGfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
282	G000348-mod only	G211-24-mod only	no PS	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
283	G000349-mod only	G211-25-mod only	2 OMe PS	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
284	G000350-mod only	G211-26-mod only	2'F grampo	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
285	G000351-mod only	G211-27-mod only	Alt grampo	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
286	G000208		mod de extremidade	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU* mU*U
287	G000373		mod6	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*mU
288	G000352	G208-7	cr inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUmAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
289	G000353	G208-8	cr inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCfGfUfUfUfAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
290	G000354	G208-9	cr inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCmGfUfUfUfUmA GAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
291	G000355	G208-10	tr inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmA mUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
292	G000356	G208-11	tr inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAm AmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
293	G000357	G208-12	tr inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfA mUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
294	G000358	G208-13	tudo inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUmAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAA AmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
295	G000359	G208-14	tudo inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUmAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAf AmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
296	G000360	G208-15	tudo inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUmAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAm AfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
297	G000361	G208-16	tudo inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCfGfUfUfUfAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAA AmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
298	G000362	G208-17	tudo inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCfGfUfUfUfAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAf AmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
299	G000363	G208-18	tudo inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCfGfUfUfUfAGA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAm AfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
300	G000364	G208-19	Cr protuberante	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAmGmA mGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
301	G000365	G208-20	Tr protuberante	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
302	G000366	G208-21	nexo	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
303	G000367	G208-22	nexo	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
304	G000368	G208-23	tudo inferior	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCfGfUfUfUfAm GmAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAmG mUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmA mAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
305	G000369	G208-24	no PS	mCmAmGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmUmUmUmU
306	G000370	G208-25	2 OMe PS	mC*mAG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmUmU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
307	G000371	G208-26	2°F grampo	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGfUfCfGfGfUfGf CfU*fU*fU*mU
308	G000372	G208-27	Alt grampo	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfG mUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU* fU*mU
309	G000352- mod only	G208-7-mod only	cr inferior	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
310	G000353- mod only	G208-8-mod only	cr inferior	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
311	G000354- mod only	G208-9-mod only	cr inferior	mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
312	G000355-mod only	G208-10-mod only	tr inferior	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
313	G000356-mod only	G208-11-mod only	tr inferior	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
314	G000357-mod only	G208-12-mod only	tr inferior	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
315	G000358-mod only	G208-13-mod only	tudo inferior	mGUUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmA mCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
316	G000359-mod only	G208-14-mod only	tudo inferior	mGUUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
317	G000360-mod only	G208-15-mod only	tudo inferior	mGUUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmA mCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
318	G000361-mod only	G208-16-mod only	tudo inferior	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
319	G000362-mod only	G208-17-mod only	tudo inferior	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
320	G000363-mod only	G208-18-mod only	tudo inferior	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
321	G000364-mod only	G208-19-mod only	Cr protuberante	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
322	G000365-mod only	G208-20-mod only	Tr protuberante	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
323	G000366-mod only	G208-21-mod only	nexo	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
324	G000367-mod only	G208-22-mod only	nexo	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
325	G000368-mod only	G208-23-mod only	tudo inferior	fGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCmAmAmGmUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCG UUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU
326	G000369-mod only	G208-24-mod only	no PS	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
327	G000370-mod only	G208-25-mod only	2 OMe PS	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
328	G000371-mod only	G208-26-mod only	2'F grampo	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG fUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
329	G000372-mod only	G208-27-mod only	Alt grampo	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGm AfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGm UfGmCfU*mU*fU*mU
330	G000269		mod de extremidade	mC*mC*mC*AUACUCCUACAGCACCAGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU* mU*U
331	G000283		mod6	mC*mC*mC*AUACUCCUACAGCACCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*mU
332	G000285		não mod	CCCAUACUCCUACAGCACCAGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
342	G000537	G211-33	5'end 3xOMePS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmUmUmUmU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
343	G000538	G211-34	3'end 3xOMePS	mUmUmACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*mU
344	G000539	G211-35	5xOMePS	mU*mU*mA*mC*mA*GCCACGUCUACAGCAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmG*mC*mU*mU*mU*mU
345	G000541	G211-37	3xOMePS+2PS	mU*mU*mA*C*A*GCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmG*mC*mU*mU*mU*mU
346	G000542	G211-38	3xOMePS+7PS	mU*mU*mA*C*A*G*C*C*A*C*GUCUACAGCAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU*m C*mG*mG*mU*mG*mC*mU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
347	G000543	G211-39	invd abasic	(invd)UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU(inv)
348	G000544	G211-40	invd abasic + 3xOMePS	(invd)mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU(inv)
349	G000564	G211-42	3xMOE-PS	moeU*moeU*moeA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmoeU*moeU*moeU*mU
350	G000545	G211-43	US laço PS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmA*mG*mA*mA*mA*mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
351	G000546	G211-44	H1 laço PS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU*mG*mA*mA*m A*mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
352	G000547	G211-45	H2 laço PS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG*mA*mG*mU*mCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
353	G000548	G211-46	todos laços PS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmA*mG*mA*mA*mA*mUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU*mG*mA*m A*mA*mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG*mA*mG*m U*mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
354			Mod6 (com modificações não mostradas na listagem de sequência)	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU N = qualquer nucleotídeo
355			Apenas região invariável	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU

SEQ ID NO	Nome	Alias	Descrição	Sequência
356			Mod6 padrão; Apenas região in- variável	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
357			Região variável e invariável	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAA AUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
358			Mod6 com modifi- cações mostradas na listagem de se- quência	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU N = qualquer nucleotídeo

[0073] "RNA guia" e "gRNA" são usados aqui de forma intercambiável para se referir coletivamente a um sgRNA, um trRNA (também conhecido como tracrRNA), ou um crRNA (também conhecido como um CRISPR RNA). O crRNA e o trRNA podem estar associados a uma molécula de RNA (RNA guia único [sgRNA]) ou em duas moléculas de RNA separadas (RNA guia duplo [dgRNA]). "RNA guia" ou "gRNA" refere-se a cada tipo.

[0074] As sequências de trRNA podem ser de ocorrência natural ou a sequência de trRNA pode incluir modificações ou variações em comparação com sequências de ocorrência natural.

[0075] "Eficiência de edição" ou "porcentagem de edição" ou "edição percentual" como usado aqui é o número total de leituras de sequência com inserções ou deleções de nucleotídeos na região-alvo de interesse sobre o número total de sequências lidas após clivagem por uma Cas RNP.

[0076] "Grampo", como usado aqui, descreve uma volta de ácidos nucleicos que é criada quando um filamento de ácido nucleico se dobra e forma pares de bases com outra seção do mesmo filamento. Um grampo pode formar uma estrutura que compreende um laço ou uma forma em U. Em algumas modalidades, um grampo pode ser constituído por um laço de RNA. Os grampos podem ser formados com duas sequências complementares em uma única molécula de ácido nucleico ligadas umas às outras, com um dobramento ou enrugamento da molécula. Em algumas modalidades, os grampos compreendem estruturas de laço de haste ou haste.

[0077] "Regiões", como aqui utilizadas, descrevem grupos conservados de ácidos nucleicos. As regiões também podem ser referidas como "módulos" ou "domínios". As regiões de um gRNA podem desempenhar funções particulares, por exemplo, no direcionamento da atividade de endonuclease do RNP, por exemplo como descrito em

Briner AE et al., Molecular Cell 56: 333–339 (2014). As regiões de um gRNA são descritas nas Tabelas 1-3.

[0078] "Ribonucleoproteína" (RNP) ou "complexo RNP", como usado aqui, descreve um gRNA, por exemplo, junto com uma nuclease, tal como uma proteína Cas. Em algumas modalidades, o RNP compreende Cas9 e gRNA.

[0079] "Laço de haste", como é usado no presente documento, descreve uma estrutura secundária de nucleotídeos que formam uma "haste" de base emparelhada que termina em um laço de ácidos nucleicos desemparelhados. Uma haste pode ser formada quando duas regiões da mesma cadeia de ácido nucleico são pelo menos parcialmente complementares em sequência quando lidas em sentidos opostos. "Laço", como usado aqui, descreve uma região de nucleotídeos que não baseiam o par (isto é, não são complementares) que podem obstruir uma haste. Um "tetralaço" descreve uma volta de 4 nucleotídeos. Como usado aqui, a haste superior de um sgRNA pode compreender um tetralaço.

[0080] Em certas modalidades envolvendo dgRNA, uma região de "haste" como usada aqui descreve uma estrutura secundária de nucleotídeos que forma uma região de base emparelhada entre certas regiões de um crRNA e trRNA (por exemplo, as regiões inferior e superior de cada RNA). A região de "haste" de um dgRNA também pode ser referida na técnica como uma região de "mastro de bandeira".

[0081] "Tratamento", como aqui utilizado, abrange qualquer administração ou aplicação de um terapêutico para doença em um objeto, e inclui inibição da doença, impedindo o seu desenvolvimento, aliviando um ou mais sintomas da doença, curando a doença ou prevenindo a recorrência de um ou mais sintomas da doença.

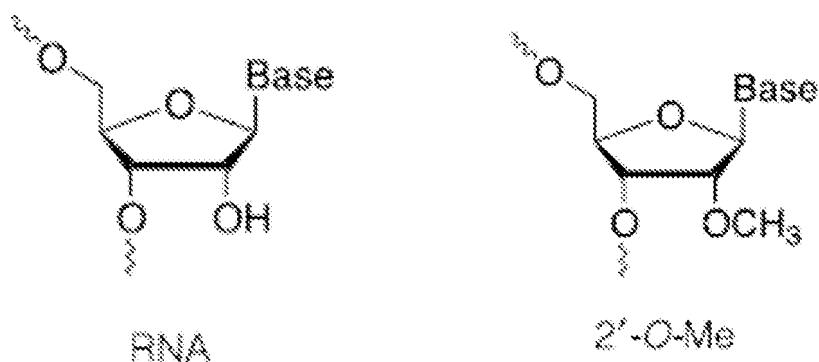
1. Tipos de Modificações

A. Modificações de 2'-O-metila

[0082] Acredita-se que os açúcares modificados controlem o funcionamento de anéis de açúcar de nucleotídeo, uma propriedade física que influencia a afinidade de ligação de oligonucleotídeo para cadeias complementares, formação de dúplex e interação com nucleases. As substituições nos anéis de açúcar podem, portanto, alterar a conformação e o enrugamento desses açúcares. Por exemplo, modificações de 2'-O-metil (2'-O-Me) podem aumentar a afinidade de ligação e estabilidade de nucleases de oligonucleotídeos, embora tal como mostrado nos Exemplos, o efeito de qualquer modificação em uma dada posição em um oligonucleotídeo necessite de ser determinado empiricamente.

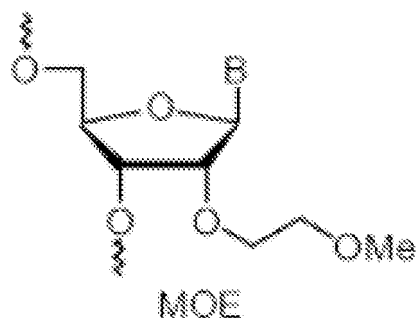
[0083] Os termos "mA", "mC", "mU" ou "mG" podem ser usados para denotar um nucleotídeo que tenha sido modificado com 2'-O-Me.

[0084] A modificação de um ribonucleotídeo como 2'-O-metil ribonucleotídeo pode ser descrita da seguinte maneira:



B. Modificações com 2'-O-(2-metoxietil)

[0085] Em algumas modalidades, a modificação pode ser 2'-O-(2-metoxietil) (2'-O-moe). A modificação de um ribonucleotídeo como um 2'-O-moe ribonucleotídeo pode ser descrita da seguinte forma:



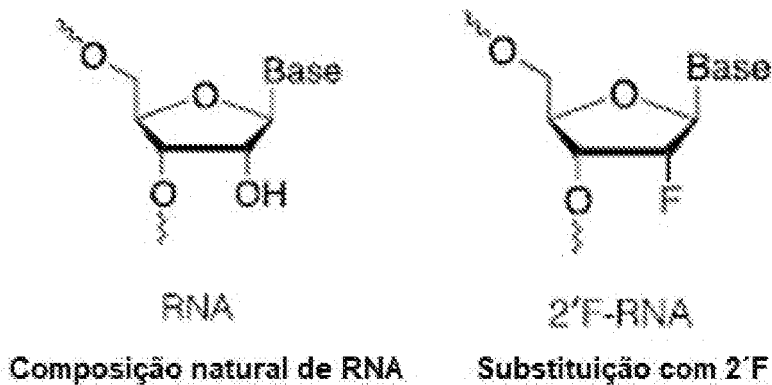
[0086] Os termos "moeA", "moeC", "moeU" ou "moeG" podem ser usados para denotar um nucleotídeo que foi modificado com 2'-O-moe.

C. Modificações com 2'-fluoro

[0087] Outra modificação química que tem mostrado influenciar os anéis de açúcar de nucleotídeo é a substituição de halogênio. Por exemplo, a substituição de 2'-fluoro (2'-F) em anéis de açúcar de nucleotídeo pode aumentar a afinidade de ligação do oligonucleotídeo e estabilidade de nuclease.

[0088] Neste pedido, os termos "fA", "fC", "fU" ou "fG" podem ser usados para denotar um nucleotídeo que tenha sido substituído por 2'-F.

[0089] A substituição de 2'-F pode ser representada da seguinte forma:



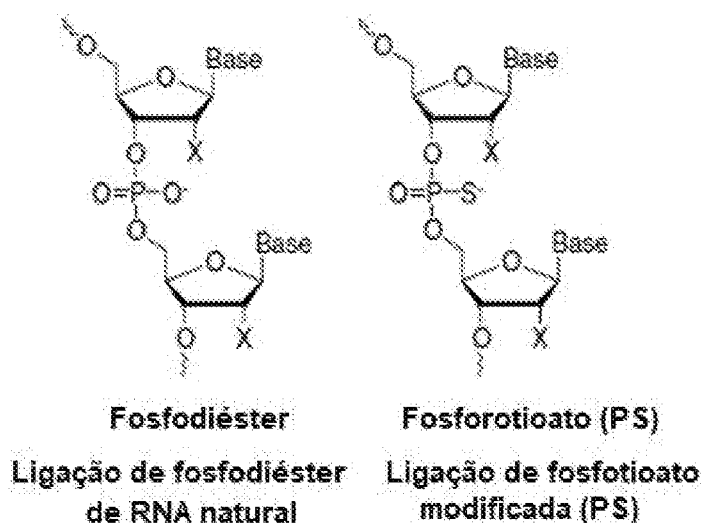
D. Modificações com fosforotioato

[0090] Vínculo ou ligação de fosforotioato (PS) refere-se a uma ligação em que um enxofre é substituído por um oxigênio de fosfato sem ligação a ponte em uma ligação de fosfodiéster, por exemplo, nas ligações entre bases de nucleotídeos. Quando os fosforotioatos são utilizados para gerar oligonucleotídeos, os oligonucleotídeos modificados podem também ser referidos como S-oligos.

[0091] Um "*" pode ser usado para descrever uma modificação de PS. Neste pedido, os termos A*, C*, U* ou G* podem ser utilizados para denotar um nucleotídeo que está ligado ao nucleotídeo seguinte (por exemplo, 3') com uma ligação de PS.

[0092] Neste pedido, os termos "mA*", "mC*", "mU*", ou "mG*" podem ser usados para denotar um nucleotídeo que foi substituído com 2'-O-Me e que é ligado ao nucleotídeo seguinte (por exemplo, 3') com uma ligação de PS. Da mesma forma, os termos "fA*", "fC*", "fU*" ou "fG*" podem ser usados para denotar um nucleotídeo que tenha sido substituído por 2'-F e que esteja ligado ao nucleotídeo seguinte (por exemplo, 3') com uma ligação de PS. Equivalentes de uma ligação ou ligação de PS são abrangidos pelas modalidades aqui descritas.

[0093] O diagrama abaixo mostra a substituição de S- em um oxigênio de fosfato sem ligação em ponte, gerando uma ligação de PS em vez de uma ligação de fosfodiéster:

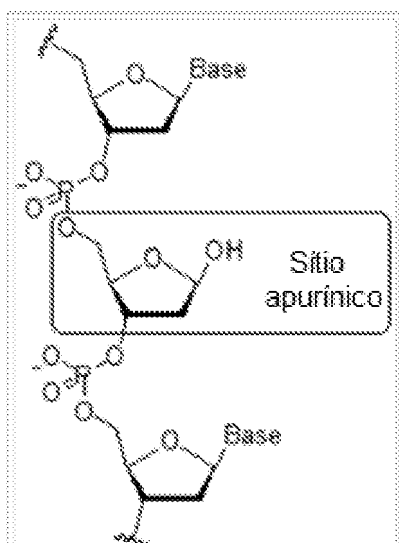


E. Substituições de G-C

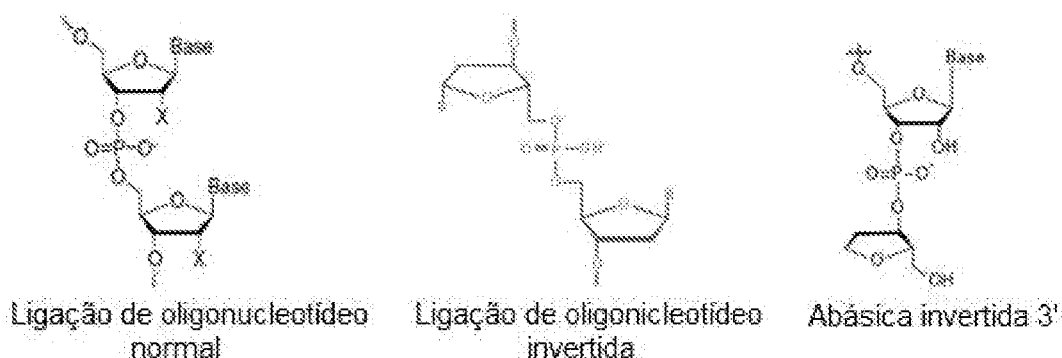
[0094] Em algumas modalidades, gRNAs são modificados com substituições de sequência que não compreendem modificações químicas. Em algumas modalidades, os gRNA modificados são manipulados com emparelhamentos G-C (por exemplo, nas regiões de haste inferior e/ou superior) que não são encontrados na sequência de gRNA parental. Em algumas modalidades, os gRNAs modificados são manipulados com incompatibilidades G-U ("GU wobbles" ou emparelhamentos de incompatibilidade) que não são encontrados na sequência de gRNA parental.

F. Modificações abásicas invertidas

[0095] Os nucleotídeos abásicos referem-se àqueles que não possuem bases nitrogenadas. A estrutura abaixo mostra um oligonucleotídeo com um sítio abásico (também conhecido como apurínico) que não possui uma base:



[0096] Bases invertidas referem-se àquelas com ligações que são invertidas da ligação normal de 5' para 3' (isto é, uma ligação de 5' para 5' ou uma ligação de 3' para 3'). Por exemplo:



[0097] Um nucleotídeo abásico pode ser anexado com uma ligação invertida. Por exemplo, um nucleotídeo abásico pode ser ligado ao nucleotídeo terminal 5' através de uma ligação 5' a 5', ou um nucleotídeo abásico pode ser ligado ao nucleotídeo 3' terminal através de uma ligação 3' a 3'. Um nucleotídeo abásico invertido no nucleotídeo 5' ou 3' terminal também pode ser designado por uma capa final invertida. Neste pedido, os termos "invd" indicam uma ligação nucleotídica invertida abásica.

[0098] As modificações acima e seus equivalentes estão incluídos no escopo das modalidades descritas aqui.

2. Composições de RNA Guia

[0099] Composições que compreende RNA guia são englobadas. Em algumas modalidades, o RNA guia compreende um trRNA. Em algumas modalidades, o RNA guia compreende um crRNA. Em algumas modalidades, o RNA guia compreende um crRNA e um trRNA. Em algumas modalidades, o RNA guia compreende um crRNA e trRNA em uma molécula de RNA como um sgRNA. Em algumas modalidades, o RNA guia compreende um crRNA e trRNA em duas moléculas de RNA como um dgRNA. Em um dgRNA, as duas moléculas de RNA podem se associar via emparelhamento de bases.

[00100] Em algumas modalidades, o RNA guia compreende uma região terminal 5'. Em algumas modalidades, o RNA guia não compreende uma região terminal 5'. Em algumas modalidades, a região terminal 5' compreende uma região "espaçadora" como descrito em *Briner AE et al., Molecular Cell 56: 333-339 (2014)* para sgRNA (mas aplicável neste caso a todos os RNAs guia). Em algumas modalidades, a região terminal 5' compreende uma modificação de extremidade 5'. Uma região de terminal 5' com ou sem uma região espaçadora pode estar associada a um crRNA, trRNA, sgRNA e/ou dgRNA. A região espaçadora é também às vezes referida aqui, e por outros, como uma "região-guia", "domínio guia" ou "domínio alvo". Uma "sequência-alvo" como aqui usada refere-se a uma sequência de ácido nucleico à qual a região / domínio guia dirige uma nuclease para clivagem. Em algumas modalidades, uma proteína spyCas9 pode ser dirigida por uma região / domínio guia para uma sequência-alvo de uma molécula de ácido nucleico alvo pelos nucleotídeos presentes na região espaçadora. Em algumas modalidades, o RNA guia não compreende uma região espaçadora.

[00101] Em algumas modalidades, os RNAs guia descritos aqui compreendem ou consistem em qualquer uma das sequências mos-

tradas na Tabela 4. Note, no entanto, que quando uma sequência mostra uma região-guia / espaçadora, deve ser reconhecido que a composição pode compreender esta região ou não. Além disso, RNAs guia são abrangidos os quais compreendem as modificações de qualquer uma das sequências apresentadas na Tabela 4 e identificadas na mesma por SEQ ID No., isto é os nucleotídeos podem ser iguais ou diferentes, mas o padrão de modificação mostrado pode ser o mesmo ou semelhante a um padrão de modificação de uma sequência guia da Tabela 4. Um padrão de modificação inclui a posição relativa e identidade de modificações do gRNA ou uma região do gRNA (por exemplo, região de terminal 5', região de haste inferior, região de protuberância, região de haste superior, região de nexo, região de grampo 1, região de grampo 2, região de terminal 3'). Em algumas modalidades, o padrão de modificação contém pelo menos 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% e 99% das modificações de qualquer uma das sequências mostradas na coluna de sequências da Tabela 4, ou cerca de uma ou mais regiões da sequência. Em algumas modalidades, o padrão de modificação é pelo menos 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% e 99% idêntico ao padrão de modificação de qualquer uma das sequências mostradas na coluna de sequências da Tabela 4. Em algumas modalidades, o padrão de modificação é pelo menos 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% e 99% idêntico em uma ou mais regiões da sequência mostradas na Tabela 4, por exemplo, uma região de terminal 5', região de haste inferior, região de protuberância, região de haste superior, região de nexo, região de grampo 1, região de grampo 2 e/ou região de terminal 3'. Por exemplo, em algumas modalidades, um RNA guia é englobado em que o padrão de modificação é pelo menos 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% e 99% idêntico ao padrão de modificação de uma sequên-

cia sobre a região do terminal 5'. Em algumas modalidades, um RNA guia é englobado em que o padrão de modificação é pelo menos 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% e 99% idêntico em relação à haste inferior. Em algumas modalidades, um RNA guia é englobado em que o padrão de modificação é pelo menos 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% e 99% idêntico à protuberante. Em algumas modalidades, um RNA guia é englobado em que o padrão de modificação é pelo menos 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% e 99% idêntico à haste superior. Em algumas modalidades, um RNA guia é englobado em que o padrão de modificação é pelo menos 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% e 99% idêntico ao nexo. Em algumas modalidades, um RNA guia é englobado em que o padrão de modificação é pelo menos 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% e 99% idêntico ao grampo 1. Em algumas modalidades, um RNA guia é englobado em que o padrão de modificação é pelo menos 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 96%, 97%, 98% e 99% idêntico sobre grampo 2. Em algumas modalidades, um RNA guia é englobado em que o padrão de modificação é pelo menos 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% e 99% idênticos sobre o terminal 3'. Em algumas modalidades, o padrão de modificação difere do padrão de modificação de uma sequência da Tabela 4, ou uma região (por exemplo, terminal 5', haste inferior, protuberância, haste superior, nexo, grampo 1, grampo 2, terminal 3') de tal uma sequência, em 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 nucleotídeos. Em algumas modalidades, o gRNA compreende modificações que diferem das modificações de uma sequência da Tabela 4, em 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 nucleotídeos. Em algumas modalidades, o gRNA compreende modificações que diferem das modificações de uma região (por exemplo, terminal 5', haste inferior, protube-

rância, haste superior, nexos, grampo 1, grampo 2, terminal 3') de uma sequência da Tabela 4, a 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 nucleotídeos.

[00102] Em algumas modalidades, o gRNA compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-metila (2'-O-Me). Em algumas modalidades, o gRNA compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-(2-metoxietil) (2'-O-moe). Em algumas modalidades, o gRNA compreende um nucleotídeo modificado com 2'-fluoro (2'-F). Em algumas modalidades, o gRNA compreende uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos.

[00103] Em algumas modalidades, o gRNA compreende uma modificação de extremidade 5', uma modificação de extremidade 3', ou modificações de extremidade 5' e 3'. Em algumas modalidades, a modificação da extremidade 5' compreende uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos. Em algumas modalidades, a modificação da extremidade 5' compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-metil (2'-O-Me), 2'-O-(2-metoxietil) (2'-O-moe), e/ou 2'-fluoro (2'-F). Em algumas modalidades, a modificação da extremidade 5' compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato (PS) e um ou mais de um nucleotídeo modificado com 2'-O-metil (2'-O-Me), 2'-O-(2-metoxietil) (2'-O-moe) e/ou com 2'-fluoro (2'-F). A modificação de extremidade pode compreender uma modificação de fosforotioato (PS), 2'-O-metil (2'-O-Me), 2'-O-(2-metoxietil) (2'-O-moe), e/ou 2'-fluoro (2'-F). Modificações de extremidade equivalentes são também abrangidas pelas modalidades aqui descritas. Em algumas modalidades, o gRNA compreende uma modificação de extremidade em combinação com uma modificação de uma ou mais regiões do gRNA.

A. Composições de sgRNAs

[00104] Em algumas modalidades, as composições e métodos da invenção compreendem gRNA que compreende um crRNA e trRNA que dirigem uma nuclease, tal como Cas9 para uma sequência de

DNA alvo. Em algumas modalidades nts, os gRNAs aqui descritos podem estar associados a uma molécula de RNA (RNA guia único ou sgRNA).

[00105] Em algumas modalidades, a invenção compreende um sgRNA que compreende ou consiste em qualquer uma das sequências descritas nas SEQ ID Nos: 228-332.

[00106] Em algumas modalidades, um sgRNA que compreende qualquer uma das sequências modificadas de SEQ ID Nos: 235-240, 265-285, e 309-329 é fornecido. Em algumas modalidades, um sgRNA que compreende qualquer uma das sequências modificadas de SEQ ID Nos: 235-240, 265-285 e 309-329, em que o sgRNA adicionalmente compreende uma sequência espaçadora de 5' ("sequência-guia") que é complementar a uma sequência-alvo e direciona uma Cas9 para o seu alvo, para que a clivagem seja englobada. Em alguns casos, a invenção compreende sgRNA que compreende ácidos nucleicos tendo pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75, ou 70% de identidade com os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 235-240, 265-285 e 309-329, em que o padrão de modificação é idêntico ao padrão de modificação mostrado no identificador de sequência de referência.

1. Domínios de sgRNAs

[00107] *Briner AE et al., Molecular Cell 56: 333-339 (2014)* descreve domínios funcionais de sgRNAs, aqui referidos como "domínios", incluindo o domínio "espaçador" responsável por direcionar, a "haste inferior", a "protuberância", "haste superior" (que pode incluir um tetralaço), o "nexo", e os domínios "grampo 1" e "grampo 2". Vide, Briner et al. na página 334, Figura 1A.

[00108] **Tabela 1** e FIG. 21A proporciona uma descrição dos domínios de um sgRNA tal como aqui utilizado. Na Tabela 1, o "n" entre regiões representa um número variável de nucleotídeos, por exemplo,

de 0 a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais. Em algumas modalidades, n é igual a 0. Em algumas modalidades, n é igual a 1.

Tabela 1: Regiões de sgRNA (vista linear, 5' a 3')

	LS1-6		B1-2		US1-12		B3-6	
terminal 5' (n)	haste inferior	n	protuberância	n	haste superior	n	protuberância	n

(continua abaixo)

LS7-12		N1-18		H1-1 através H1-12		H2-1 através H2-15	
haste inferior	n	nexo	n	grampo 1	n	grampo 2	terminal 3'

a) região de terminal 5'

[00109] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende nucleotídeos no terminal 5' como mostrado na Tabela 1. Em algumas modalidades, o terminal 5' do sgRNA compreende uma região espaçadora ou guia que funciona para direcionar uma proteína Cas a uma sequência de nucleotídeo alvo. Em algumas modalidades, o terminal 5' não compreende uma região espaçadora ou guia. Em algumas modalidades, o terminal 5' compreende um nucleotídeo espaçador e adicional que não funcionam para direcionar uma proteína Cas para uma região nucleotídica alvo.

[00110] Em algumas modalidades, a região-guia compreende os primeiros 1-10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos na extremidade 5' do sgRNA. Em algumas modalidades, a região-guia compreende 20 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região-guia pode compreender 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 ou mais nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região-guia pode compreender 17 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região-guia pode compreender 18 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região-guia pode compreender 19 nucleotídeos.

[00111] Em algumas modalidades, a seleção da região-guia é determinada com base em sequências alvo dentro do gene de interesse para edição. Por exemplo, em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma região-guia que é complementar às sequências alvo de um gene de interesse.

[00112] Em algumas modalidades, a sequência-alvo no gene de interesse pode ser complementar à região-guia do sgRNA. Em algumas modalidades, o grau de complementaridade ou identidade entre uma região-guia de um sgRNA e sua sequência-alvo correspondente no gene de interesse pode ser cerca de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%,

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% em algumas modalidades, a região-guia de um sgRNA e a região-alvo de um gene de interesse podem ser 100% complementares ou idênticas. Em outras modalidades, a região-guia de um gRNA e a região-alvo de um gene de interesse podem conter pelo menos um erro de emparelhamento. Por exemplo, a região-guia de um sgRNA e a sequência-alvo de um gene de interesse podem conter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 incompatibilidades, em que o comprimento total da sequência-alvo é pelo menos cerca de 17, 18, 19, 20 ou mais pares de bases. Em algumas modalidades, a região-guia de um sgRNA e a região-alvo de um gene de interesse podem conter 1-6 incompatibilidades em que a sequência guia compreende pelo menos cerca de 17, 18, 19, 20 ou mais nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região-guia de um sgRNA e a região-alvo de um gene de interesse podem conter 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 incompatibilidades em que a sequência guia compreende cerca de 20 nucleotídeos. O terminal 5' pode compreender nucleotídeos que não são considerados regiões guia (isto é, não funcionam para direcionar uma proteína cas9 a um ácido nucleico alvo).

b) haste inferior

[00113] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma região de haste inferior (LS) que, quando visto linearmente, é separado por uma protuberância e regiões de haste superior. Vide a Tabela 1.

[00114] Em algumas modalidades, as regiões de haste inferior compreendem 1-12 nucleotídeos, por exemplo em uma modalidade, as regiões de haste inferior compreendem LS1-LS12. Em algumas modalidades, a região de haste inferior compreende menos nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 1 e a FIG. 21A. Em algumas modalidades, a região de haste inferior compreende mais nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 1 e a FIG. 21A. Quando a região de haste inferior compreende menos ou mais nucleotídeos do que os

mostrados no esquema da Tabela 1 e a FIG. 21A, o padrão de modificação, como será evidente para o versado na técnica, deve ser mantido.

[00115] Em algumas modalidades, a região de haste inferior tem nucleotídeos que são complementares na sequência de ácido nucléico quando lidos em direções opostas. Em algumas modalidades, a complementaridade na sequência de ácido nucleico da haste inferior conduz a uma estrutura secundária de uma haste no sgRNA (por exemplo, as regiões podem emparelhar uma com a outra). Em algumas modalidades, as regiões de haste inferior podem não ser perfeitamente complementares umas às outras quando lidas em direções opostas.

c) Protuberância

[00116] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma região de protuberância que compreende seis nucleotídeos, B1-B6. Quando visualizada linearmente, a região de protuberância é separada em duas regiões. Vide a Tabela 1. Em algumas modalidades, a região de protuberância compreende seis nucleotídeos, em que os dois primeiros nucleotídeos são seguidos por uma região de haste superior, seguidos pelos últimos quatro nucleotídeos da protuberância. Em algumas modalidades, a região de protuberância compreende menos nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 1 e a FIG. 21A. Em algumas modalidades, a região de protuberância compreende mais nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 1 e a FIG. 21A. Quando a região de protuberância compreende menos ou mais nucleotídeos do que os mostrados no esquema da Tabela 1 e a FIG. 21A, o padrão de modificação, como será evidente para o versado na técnica, deve ser mantido.

[00117] Em algumas modalidades, a presença de uma protuberância resulta em uma dobra direcional entre os módulos de haste superior e inferior em um sgRNA.

d) haste superior

[00118] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma região superior do haste que compreende 12 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região de haste superior compreende uma sequência de laço. Em alguns casos, o laço é um tetralaço (laço formado por quatro nucleotídeos).

[00119] Em algumas modalidades, a região de haste superior compreende menos nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 1 e FIG. 21A. Em algumas modalidades, a região de haste superior compreende mais nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 1 e a FIG. 21A. Quando a região de haste superior compreende menos ou mais nucleotídeos do que os mostrados no esquema da Tabela 1 e a FIG. 21A, o padrão de modificação, como será evidente para o versado na técnica, deve ser mantido.

[00120] Em algumas modalidades, a região de haste superior tem nucleotídeos que são complementares na sequência de ácido nucléico quando lidos em direções opostas. Em algumas modalidades, a complementaridade na sequência de ácido nucleico da haste superior conduz a uma estrutura secundária de uma haste no sgRNA (por exemplo, as regiões podem emparelhar uma com a outra). Em algumas modalidades, as regiões de haste superior podem não ser perfeitamente complementares umas às outras quando lidas em direções opostas.

e) Nexo

[00121] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma região de nexo que está localizado entre a região de haste inferior e a região de grampo 1. Em algumas modalidades, o nexo compreende 18 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região de nexo compreende os nucleotídeos N1 a N18 como mostrado na Tabela 1 e a FIG. 21A.

[00122] Em algumas modalidades, a região de nexo compreende

menos nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 1 e FIG. 21A. Em algumas modalidades, a região de nexa compreende mais nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 1 e a FIG. 21A. Quando a região de nexa compreende menos ou mais nucleotídeos do que os mostrados no esquema da Tabela 1 e a FIG. 21A, o padrão de modificação, como será evidente para o versado na técnica, deve ser mantido.

[00123] Em algumas modalidades, a região de nexa tem nucleotídeos que são complementares na sequência de ácido nucleico quando lidos em direções opostas. Em algumas modalidades, a complementaridade na sequência de ácido nucleico conduz a uma estrutura secundária de uma haste e/ou laço de haste no sgRNA (por exemplo, certos nucleotídeos na região de nexa podem emparelhar a base uns com os outros). Em algumas modalidades, as regiões do nexa podem não ser perfeitamente complementares umas às outras quando lidas em direções opostas.

f) Grampo

[00124] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma ou mais regiões de grampo. Em algumas modalidades, a região de grampo está a jusante de (por exemplo, 3' para) a região de nexa. Em algumas modalidades, a região de nucleotídeos imediatamente a jusante da região de nexa é denominada "grampo 1" ou "H1". Em algumas modalidades, a região dos nucleotídeos 3' a para grampo 1 é denominada "de grampo 2" ou "H2". Em algumas modalidades, a região de grampo compreende o grampo 1 e o grampo 2. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende apenas grampo 1 ou grampo 2.

[00125] Em algumas modalidades, a região de grampo 1 compreende 12 ácidos nucleicos imediatamente a jusante da região de nexa. Em algumas modalidades, a região de grampo 1 compreende os nucleotídeos H1-1 a H1-12, como mostrado na Tabela 1 e a FIG. 21A.

[00126] Em algumas modalidades, a região de grampo 2 compre-

ende 15 ácidos nucleicos a jusante da região de grampo 1. Em algumas modalidades, a região de grampo 2 compreende os nucleotídeos H2-1 a H2-15 como mostrado na Tabela 1 e a FIG. 21A.

[00127] Em algumas modalidades, um ou mais nucleotídeos estão presentes entre as regiões de grampo 1 e de grampo 2. Os um ou mais nucleotídeos entre a região de grampo 1 e grampo 2 podem ser modificados ou não modificados. Em algumas modalidades, o grampo 1 e grampo 2 estão separados por um nucleotídeo. Em algumas modalidades, as regiões de grampo compreendem menos nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 1 e a FIG. 21A. Em algumas modalidades, as regiões de grampo compreendem mais nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 1 e a FIG. 21A. Quando uma região de grampo compreende menos ou mais nucleotídeos do que os mostrados no esquema da Tabela 1 e a FIG. 21A, o padrão de modificação, como será evidente para o versado na técnica, deve ser mantido.

[00128] Em algumas modalidades, uma região de grampo tem nucleotídeos que são complementares na sequência de ácido nucleico quando lidos em direções opostas. Em algumas modalidades, as regiões em grampo podem não ser perfeitamente complementares umas às outras quando lidas em direções opostas (por exemplo, o topo ou laço do grampo compreende nucleotídeos não emparelhados).

[00129] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende a substituição de grampo 1 com nucleotídeos "n", em que "n" é um número inteiro entre 1 e 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3 e 2. Em algumas modalidades, a região de grampo 1 de um sgRNA é substituída por 2 nucleotídeos.

g) Região do terminal 3'

[00130] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende nucleotídeos após a (s) região (ões) de grampo (s). Em algumas modalidades, a região de terminal 3' compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 ou 20

ou mais nucleotídeos, por exemplo, que não estão associados à estrutura secundária de um de grampo. Em algumas modalidades, a região de terminal 3' compreende 1, 2, 3 ou 4 nucleotídeos que não estão associados à estrutura secundária de um grampo. Em algumas modalidades, a região de terminal 3' compreende 4 nucleotídeos que não estão associados à estrutura secundária de um grampo. Em algumas modalidades, a região de terminal 3' compreende 1, 2 ou 3 nucleotídeos que não estão associados à estrutura secundária de um grampo.

2. Modificações de sgRNAs

[00131] Em algumas modalidades, a invenção compreende um sgRNA que compreende uma ou mais modificações dentro de uma ou mais das seguintes regiões: os nucleotídeos no terminal 5'; a região de haste inferior; a região de protuberância; a região da haste superior; a região denexo; a região de grampo 1; a região de grampo 2; e os nucleotídeos no terminal 3'.

[00132] Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-metil (2'-O-Me). Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-(2-metoxietil) (2'-O-moe). Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-fluoro (2'-F). Em algumas modalidades, a modificação compreende uma ligação de fosfortioato (PS) entre nucleotídeos.

[00133] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em 1, 2, 3 ou 4 dos primeiros 4 nucleotídeos na sua extremidade 5'. Em algumas modalidades, os primeiros três ou quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos três ou quatro nucleotídeos no terminal 3' são modificados. Em algumas modalidades, os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' estão ligados com ligações de fosfortioato (PS). Em algumas modalidades, a modificação compreende 2'-O-Me. Em algumas modali-

dades, a modificação compreende 2'-F. Em algumas modalidades, a modificação compreende 2'-O-moe.

[00134] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em 1, 2, 3 ou 4 dos primeiros 4 nucleotídeos na extremidade 5'. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende modificações em 1, 2, 3 ou 4 dos primeiros 4 nucleotídeos na extremidade 3'. Em algumas modalidades, os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' estão ligados com uma ligação de PS, e os primeiros três nucleotídeos no terminal 5' e os últimos três nucleotídeos no terminal 3' compreendem modificações de 2'-O-Me ou 2'-O-moe.

[00135] Em algumas modalidades, os quatro primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' são ligados com uma ligação de PS, e os três primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os três últimos nucleotídeos no O terminal 3' compreende modificações de 2'-F.

[00136] Em algumas modalidades, um sgRNA é fornecido em que LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12 são modificados com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, cada um dos nucleotídeos na região de protuberância do sgRNA é modificado com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, cada um dos nucleotídeos na região de haste superior do sgRNA é modificado com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, N16, N17 e N18 na região de nexa do sgRNA são modificados com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, cada um dos nucleotídeos na região de grampo 1 do sgRNA é modificado com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, cada um dos nucleotídeos na região de grampo 2 do sgRNA é modificado com 2'-O-Me.

[00137] Em algumas modalidades, o sgRNA compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos seguintes nucleotídeos: os três primeiros nucleotídeos no terminal 5'; LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e

LS12; B1 e B2 na região de protuberância; cada um dos nucleotídeos na região de haste superior do sgRNA; N16, N17 e N18 na região de nexa; cada um dos nucleotídeos na região de grampo 1; cada um dos nucleotídeos na região de grampo 2; e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00138] Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5', e ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, LS9 e LS10 são modificados com 2'-F. Em algumas modalidades, N15, N16, N17 e N18 são modificados com 2'-F. Em algumas modalidades, H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, HS-14 e H2-15 são modificados com 2'-F. Em algumas modalidades, o segundo ao último, o terceiro ao último e o quarto ao último nucleotídeo no terminal 3' são modificados com 2'-F

[00139] Em algumas modalidades, um RNA guia único (sgRNA) é fornecido que compreende ácidos nucleicos modificados com 2'-F nos seguintes nucleotídeos: LS9 e LS10 na região de haste inferior; N15, N16, N17 e N18 na região de nexa; e H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, HS-14 e H2-15 na região de grampo 2. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-F no penúltimo, terceiro ao último e quarto ao último nucleotídeo no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende ácidos nucleicos modificados com 2'-

O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5', e ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos três dos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00140] Em algumas modalidades, um RNA guia único (sgRNA) é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5'; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1 e LS6; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12; um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15; e nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00141] Em algumas modalidades, um RNA guia único (sgRNA) é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5'; nucleotídeos modificados com 2'-F em LS1-LS6; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12; um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me em "n" entre grampo 1 e grampo 2; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15; e nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00142] Em algumas modalidades, um RNA guia único (sgRNA) é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5'; nucleotídeos modificados

com 2'-F em LS2-LS5; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1 e LS6; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12; um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me em "n" entre grampo 1 e grampo 2; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15; e nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00143] Em algumas modalidades, um RNA guia único (sgRNA) é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5'; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS7, LS8, LS11 e LS12; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12; um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me em "n" entre grampo 1 e grampo 2; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15; e nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00144] Em algumas modalidades, um RNA guia único (sgRNA) é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5'; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS8, LS10 e LS12; nucleotídeos modificados com 2'-O-F em LS7, LS9 e LS11; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12; um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15; e nucleotí-

deos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00145] Em algumas modalidades, um RNA guia único (sgRNA) é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5'; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12; um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15; e nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00146] Em algumas modalidades, um RNA guia único (sgRNA) é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5'; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12; nucleotídeos modificados com 2'-F em LS9 e LS10; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12; um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15; e nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00147] Em algumas modalidades, um RNA guia único (sgRNA) é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5'; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12; um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-8; nucleotídeos modificados com 2'-F em H2-9 - H2-15; nucleotídeos modificados com 2'-F no segundo do último, terceiro do último e quarto do último nucleotídeo no terminal 3'; e um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me no último nucleotídeo no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00148] Em algumas modalidades, um RNA guia único (sgRNA) é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5'; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10 e H1-12; nucleotídeos modificados com 2'-F em H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9 e H1-11; um nucleotídeo modificado 2'-F entre Grampo 1 e Grampo 2; nucleotídeos modificados com 2'-F em H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12; e H2-14; nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11; H2-13 e H2-15; nucleotídeos modificados com 2'-F no segundo do último e quarto do último nucleotídeo no terminal 3'; e 2'-O-Me modificado nucleotídeo no terceiro do último e último nucleotídeo no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00149] Divulgado aqui, em algumas modalidades, é um RNA guia único (sgRNA) que compreende modificações de 2'-O-Me nos nucleotídeos LS8, LS10, LS12, H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10, H1-12, H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11, H2-13 e H2-15; e modificações de 2'-F em LS7, LS9, LS11; H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9, H1-11, H1-13, H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12 e H2-14. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me no último e terceiro ao último nucleotídeo no terminal 3'; e nucleotídeos modificados com 2'-F no segundo para o último e terceiro para o último nucleotídeo no terminal 3'.

[00150] Divulgado aqui, em algumas modalidades, é um sgRNA que compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 228-232. Divulgado aqui, em algumas modalidades, é um sgRNA que compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 235-240, 265-285 e 309-329. Divulgado aqui, em algumas modalidades, é um sgRNA compreende ácidos nucleicos tendo pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75, ou 70% de identidade com os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 235-240, 265-285 e 309-329, em que o padrão de modificação é idêntico ao padrão de modificação mostrado no identificador de sequência de referência. Em algumas modalidades, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00151] Em algumas modalidades, um sgRNA que compreende uma modificação de extremidade 5' e uma ou mais modificações em um ou mais dos: a região de haste superior; a região de grampo 1; e a

região de grampo 2 é fornecida, em que a modificação da extremidade 5' compreende pelo menos duas ligações de fosforotioato nos primeiros sete nucleotídeos do terminal 5'.

[00152] Em algumas modalidades, um sgRNA que compreende uma modificação de extremidade 5' e uma ou mais modificações em um ou mais de: a região de haste superior; a região de grampo 1; e a região de grampo 2 é fornecida, em que a modificação da extremidade 5' compreende uma ou mais ligações de fosforotioato na extremidade 5' do RNA. Em algumas modalidades, uma ou mais ligações de fosforotioato ligam os nucleotídeos terminais 5'.

[00153] Em algumas modalidades, um sgRNA que compreende uma modificação de extremidade 5' e uma ou mais modificações em um ou mais de: a região de haste superior; a região de grampo 1; e a região de grampo 2 é fornecida, em que a modificação da extremidade 5' compreende uma ou mais ligações de fosforotioato dentro dos primeiros sete nucleotídeos do terminal 5'.

[00154] Em algumas modalidades, um sgRNA que compreende qualquer uma das sequências de sgRNA modificado de SEQ ID Nos: 228-332 é fornecido.

[00155] Em algumas modalidades, um sgRNA que compreende ou consiste em qualquer uma das sequências de sgRNA modificado de SEQ ID Nos: 235-240, 265-285, e 309-329 é fornecido.

[00156] Em algumas modalidades, a invenção compreende um sgRNA que compreende qualquer uma das sequências modificadas de SEQ ID Nos: 235-240, 265-285, e 309-329, em que o sgRNA adicionalmente compreende uma sequência espaçadora 5' que é pelo menos parcialmente complementar a uma sequência-alvo, e direciona uma Cas9 a seu alvo para clivagem.

[00157] Em algumas modalidades, a invenção compreende um sgRNA que compreende nucleotídeos tendo pelo menos 99, 98, 97,

96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75, ou 70% de identidade com os nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 235-240, 265-285 e 309-329, em que o padrão de modificação é idêntico ao padrão de modificação mostrado no identificador de sequência de referência. Ou seja, os nucleotídeos A, U, C e G podem diferir em 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 ou 70% em comparação com o que é mostrado nas sequências, mas a modificação permanece inalterada.

[00158] Em algumas modalidades, a invenção compreende um sgRNA que compreende uma ou mais modificações dentro de uma ou mais das seguintes regiões: os nucleotídeos no terminal 5'; a região de haste inferior; a região de protuberância; a região da haste superior; a região denexo; a região de grampo 1; a região de grampo 2; e os nucleotídeos no terminal 3'.

[00159] Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-metil (2'-O-Me). Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-fluoro (2'-F). Em algumas modalidades, a modificação compreende uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos. Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo abásico invertido.

[00160] Em algumas modalidades, um sgRNA é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em: os primeiros três nucleotídeos no terminal 5'; LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12 na haste inferior; B1 e B2 na região de protuberância; cada um dos nucleotídeos na região de haste superior; N16, N17 e N18 na região de nexo; cada um dos nucleotídeos na região de grampo 1; um nucleotídeo entre o grampo 1 e o grampo 2; cada um dos nucleotídeos na região de grampo 2; e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em uma modalidade, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de PS entre os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três liga-

ções de PS entre os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00161] Em algumas modalidades, um sgRNA é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em: os três primeiros nucleotídeos no terminal 5'; LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12 na haste inferior; B1-B6 na região de protuberância; cada um dos nucleotídeos na região de haste superior; N16, N17 e N18 na região de nexa; cada um dos nucleotídeos na região de grampo 1; um nucleotídeo entre o grampo 1 e o grampo 2; cada um dos nucleotídeos na região de grampo 2; e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em uma modalidade, o sgRNA adicionalmente compreende três ligações de PS entre os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS entre os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00162] Em algumas modalidades, um sgRNA é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-F em: LS9 e LS10 na haste inferior; 15-N18 na região de nexa; H2-9-HS-15 na região de grampo 2; e o segundo ao último, o terceiro ao último e o quarto ao último nucleotídeos na região de terminal 3'.

[00163] Em algumas modalidades, um sgRNA é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-F em: cada nucleotídeo na haste inferior; 15-N18 na região de nexa; H2-9-HS-15 na região de grampo 2; e o segundo ao último, o terceiro ao último e o quarto ao último nucleotídeo na região de terminal 3'.

[00164] Em algumas modalidades, é fornecido um RNA guia único (sgRNA) que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS8, LS10, LS12, H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10, H1-12, H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11, H2-13, H2-15 e o último e terceiro a último nucleotídeos a terminal 3'; e modificações com 2'-F em LS7, LS9, LS11; H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9, H1-11, H1-13, H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12, H2-14, e o segundo ao último e quarto ao último nucleotídeo no terminal 3'.

[00165] Cada uma das seguintes modalidades são abrangidas:

[00166] Modalidade 01. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende uma ou mais modificações em uma ou mais das seguintes regiões:

- a. o terminal 5';
- b. a região de haste inferior;
- c. a região de protuberância;
- d. a região da haste superior;
- e. a região de nexo;
- f. a região de grampo 1;
- g. a região de grampo 2; e
- h. o terminal 3'.

[00167] Modalidade 02. O sgRNA da modalidade 1, em que a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-metil (2'-O-Me).

[00168] Modalidade 03. O sgRNA da modalidade 1, em que a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-fluoro (2'-F).

[00169] Modalidade 04. O sgRNA da modalidade 1, em que a modificação compreende uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos.

[00170] Modalidade 05. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-3, em que os primeiros três ou quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos três ou quatro nucleotídeos no terminal 3' são modificados.

[00171] Modalidade 06. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-5, em que os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' estão ligados com ligações de fosforotioato (PS).

[00172] Modalidade 07. O sgRNA da modalidade 5, em que a modificação compreende 2'-O-Me.

[00173] Modalidade 08. O sgRNA da modalidade 5, em que a modificação compreende 2'-F.

[00174] Modalidade 09. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-7, em que os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' são ligados com uma ligação de PS, e em que os primeiros três nucleotídeos no terminal 5' e os últimos três nucleotídeos no terminal 3' compreendem modificações de 2'-O-Me.

[00175] Modalidade 10. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-8, em que os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' estão ligados com uma ligação de PS e em que os três primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os últimos três nucleotídeos no terminal 3' compreendem modificações de 2'-F.

[00176] Modalidade 11. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-10, em que LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12 são modificados com 2'-O-Me.

[00177] Modalidade 12. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-11, em que cada um dos nucleotídeos na região de protuberância é modificado com 2'-O-Me.

[00178] Modalidade 13. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-12, em que cada um dos nucleotídeos na região de haste superior é modificado com 2'-O-Me.

[00179] Modalidade 14. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-13, em que N16, N17 e N18 na região de nexo são modificados com 2'-O-Me.

[00180] Modalidade 15. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-14, em que cada um dos nucleotídeos na região de grampo 1 é modificado com 2'-O-Me.

[00181] Modalidade 16. O sgRNA de qualquer uma das modalidades

des 1-15, em que cada um dos nucleotídeos na região de grampo 2 é modificado com 2'-O-Me.

[00182] Modalidade 17. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me nos seguintes nucleotídeos:

- a. os primeiros três nucleotídeos no terminal 5';
- b. LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12 na região de haste inferior;
- c. B1 e B2 na região de protuberância;
- d. cada nucleotídeo na região de haste superior;
- e. N16, N17 e N18 na região de nexo;
- f. cada nucleotídeo na região de grampo 1;
- g. cada nucleotídeo na região de grampo 2; e
- h. os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00183] Modalidade 18. O sgRNA da modalidade 17, em que B3-B6 são modificados com 2'-O-Me.

[00184] Modalidade 19. O sgRNA da modalidade 17, que compreende adicionalmente três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00185] Modalidade 20. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-10, em que LS9 e LS10 são modificados com 2'-F.

[00186] Modalidade 21. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-10 e 20, em que N15, N16, N17 e N18 são modificados com 2'-F.

[00187] Modalidade 22. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-10 e 20-21, em que H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 e H2-15 são modificados com 2'-F.

[00188] Modalidade 23. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 1-10 e 21-22, em que o segundo ao último, o terceiro ao último e o

quarto ao último nucleotídeos no terminal 3' são modificados com 2'-F.

[00189] Modalidade 24. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende nucleotídeos modificados com 2'-F nas seguintes posições:

- a. LS9 e LS10 na região de haste inferior;
- b. N15, N16, N17 e N18 na região denexo; e
- c. H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 e H2-15 na região de grampo 2.

[00190] Modalidade 25. O sgRNA da modalidade 24, que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-F no segundo a último, terceiro a último e quarto a últimos nucleotídeos no terminal 3'.

[00191] Modalidade 26. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 24 ou 25, que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00192] Modalidade 27. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 24-26, que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5', e nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos três dos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00193] Modalidade 28. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1 e LS6;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- e. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;

f. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
e

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00194] Modalidade 29. O sgRNA da modalidade 28 que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00195] Modalidade 30. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';

b. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS1-LS6;

c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;

e. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;

f. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
e

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00196] Modalidade 31. O sgRNA da modalidade 30 que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00197] Modalidade 32. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';

b. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS2-LS5;

- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1 e LS6;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- f. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;

- g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
- e

- h. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00198] Modalidade 33. O sgRNA da modalidade 32 que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00199] Modalidade 34. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';

- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS7, LS8, LS11 e LS12;

- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;

- e. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;

- f. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;

- e

- g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00200] Modalidade 35. O sgRNA da modalidade 34 que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando

os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00201] Modalidade 36. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS7, LS8, LS11 e LS12;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS9 e LS10;
- e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- f. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;
- g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
- e

h. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00202] Modalidade 37. O sgRNA da modalidade 36 que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00203] Modalidade 38. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- c. 2'- nucleotídeos modificados por O-Me em LS8, LS10 e LS12;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-F em LS7, LS9 e LS11;
- e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;

f. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
e

h. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00204] Modalidade 39. O sgRNA da modalidade 32 que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00205] Modalidade 40. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';

b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12

c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;

e. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;

f. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
e

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00206] Modalidade 41. O sgRNA da modalidade 40 que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos ao terminal 3'

[00207] Modalidade 42. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS9 e LS10;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- f. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;
- g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
- e
- h. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00208] Modalidade 43. O sgRNA da modalidade 43 adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00209] Modalidade 44. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- d. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;
- e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-8;
- f. nucleotídeos modificados com 2'-F em H2-9 - H2-15;
- g. nucleotídeos modificados com 2'-F no segundo do último, terceiro do último e quarto do último nucleotídeo no terminal 3'; e
- h. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me no último nucle-

otídeo no terminal 3'.

[00210] Modalidade 45. O sgRNA da modalidade 44 que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00211] Modalidade 46. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos no terminal 5';

b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10 e H1-12;

d. nucleotídeos modificados com 2'-F em H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9 e H1-11;

e. um nucleotídeo modificado 2'-F entre Grampo 1 e Grampo 2;

f. nucleotídeos modificados com 2'-F em H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12; e H2-14;

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11; H2-13 e H2-15;

h. nucleotídeos modificados com 2'-F no segundo do último e quarto do último nucleotídeo no terminal 3'; e

i. Nucleotídeo modificado com 2'-O-Me no terceiro e último nucleotídeo no terminal 3'.

[00212] Modalidade 47. O sgRNA da modalidade 46 que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos ao terminal 3'.

[00213] Modalidade 48. Um RNA guia único (sgRNA) que compreende

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me LS8, LS10, LS12, H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10, H1-12, H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11, H2-13 e H2-15; e

b. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS7, LS9, LS11; H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9, H1-11, H1-13, H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12 e H2-14.

[00214] Modalidade 49. O sgRNA da modalidade 48, que compreende adicionalmente três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00215] Modalidade 50. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 48-49, que adicionalmente compreende

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me no último e terceiro ao último nucleotídeo no terminal 3'; e

b. nucleotídeos modificados com 2'-F no segundo para o último e terceiro para o último nucleotídeo no terminal 3'.

[00216] Modalidade 51. Um sgRNA que compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 228-332.

[00217] Modalidade 52. Um sgRNA que compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 235-240, 265-285 e 309-329.

[00218] Modalidade 53. Um sgRNA que compreende ácidos nucleicos tendo pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 ou 70% de identidade com os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 235-240, 265-285 e 309-329, em que o padrão de modificação é idêntico ao o padrão de modificação mostrado no identificador de sequência de referência.

[00219] Modalidade 54. O sgRNA de qualquer uma das modalidades 51-53, que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três

ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

B. Composições de dgRNAs

[00220] Em algumas modalidades, as composições e métodos da invenção compreendem gRNA que compreende um crRNA e trRNA que direcionam uma nuclease, como Cas9 para uma sequência de DNA alvo. Em algumas modalidades, os gRNAs estão associados, mas em duas moléculas de RNA separadas (RNA guia dual ou dgRNA).

[00221] **Tabela 2** e FIG. 21C proporciona uma descrição de domínios de um RNAP tal como aqui utilizado. A região de terminal 5' pode compreender uma região espaçadora no ou perto do terminal 5' do crRNA e funciona para direcionar uma Cas9 a uma região-alvo no DNA, por exemplo, como aqui descrito. Na Tabela 2, o "n" entre regiões representa um número variável de nucleotídeos, por exemplo, de 0 a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais. Em algumas modalidades, n é igual a 0. Qualquer um dos dgRNAs aqui descritos pode incluir um "n" entre qualquer domínio.

[00222] **Tabela 3** e FIG. 21C fornecem uma descrição de domínios de um trRNA, tal como aqui utilizado. Na Tabela 3, o "n" entre regiões representa um número variável de nucleotídeos, por exemplo, de 0 a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais. Em algumas modalidades, n é igual a 0. Qualquer um dos dgRNAs aqui descritos pode incluir um "n" entre qualquer domínio.

1. Domínios de dgRNAs

[00223] Como descrito em *Briner 2014*, os dgRNAs podem ser desenvolvidos com base em domínios funcionais específicos, aqui referidos como "domínios", incluindo o espaçador responsável pelo direcionamento, domínios de haste inferior, a protuberância, a haste superior, o nexa e grampo. Em dgRNAs, o crRNA compreende alguns componentes do gRNA e o trRNA compreende alguns componentes do

gRNA.

[00224] Regiões de crRNAs são fornecidas na Tabela 2 e FIG 21C. Regiões de trRNAs são fornecidas na Tabela 3 e na FIG. 21C. A FIG 21C mostra um esquema de um dgRNA exemplar.

Tabela 2: Regiões de crRNA (vista linear, 5' para 3')

	LS1-6		B1-2		US1-14	
terminal 5' (n)	haste inferior	n	protuberância	n	haste superior	terminal 3'

Tabela 3: Regiões de trRNA (vista linear, 5' para 3')

	US1-11		B1-4		N1-18		H1-1 através H1-12		H2-1 através H2-15	
terminal 5' (n)	haste superior	n	protuberância	n	nexo	n	grampo 1	n	grampo 2	terminal 3'

a) Região de terminal 5'

[00225] Em algumas modalidades, o dgRNA compreende nucleotídeos no terminal 5' do crRNA e trRNA como mostrado nas Tabelas 2-3 e FIG 21C.

[00226] Em algumas modalidades, o terminal 5' do crRNA compreende uma região espaçadora ou guia que funciona para direcionar uma proteína Cas para uma sequência de nucleotídeos alvo. Em algumas modalidades, o terminal 5' não compreende uma região espaçadora ou guia. Em algumas modalidades, o terminal 5' compreende um espaçador e nucleotídeos adicionais que não funcionam para direcionar uma proteína Cas para uma região nucleotídica alvo.

[00227] Em algumas modalidades, a região-guia compreende os primeiros 1-10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 nucleotídeos na extremidade 5' do crRNA. Em algumas modalidades, a região-guia compreende 20 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região-guia pode compreender 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 ou mais nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região-guia pode compreender 17 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região-guia pode compreender 18 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região-guia pode compreender 19 nucleotídeos.

[00228] Em algumas modalidades, a seleção da região-guia é determinada com base em sequências alvo dentro do gene de interesse para edição. Por exemplo, em algumas modalidades, o crRNA compreende uma região-guia que é complementar às sequências alvo de um gene de interesse.

[00229] Em algumas modalidades, a sequência-alvo no gene de interesse pode ser complementar à região-guia do crRNA. Em algumas modalidades, o grau de complementaridade ou identidade entre uma região-guia de um RNAr e a sua sequência-alvo correspondente

no gene de interesse pode ser cerca de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% em algumas modalidades, a região-guia de um crRNA e a região-alvo de um gene de interesse podem ser 100% complementares ou idênticas. Em outras modalidades, a região-guia de um RNAr e a região-alvo de um gene de interesse podem conter pelo menos um erro de emparelhamento. Por exemplo, a região-guia de um crRNA e a sequência-alvo de um gene de interesse podem conter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 incompatibilidades, em que o comprimento total da sequência-alvo é pelo menos cerca de 17, 18, 19, 20 ou mais pares de bases. Em algumas modalidades, a região-guia de um crRNA e a região-alvo de um gene de interesse podem conter 1-6 incompatibilidades em que a sequência guia compreende pelo menos cerca de 17, 18, 19, 20 ou mais nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região-guia de um crRNA e a região-alvo de um gene O interesse pode conter 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 incompatibilidades em que a sequência guia compreende cerca de 20 nucleotídeos.

[00230] Em algumas modalidades, o trRNA compreende um terminal 5'. Em algumas modalidades, o trRNA compreende um terminal 5' que forma, em parte, a haste superior de um dgRNA. O terminal 5' do trRNA não é complementar a uma região do gene-alvo.

b) Haste inferior

[00231] Em algumas modalidades, o dgRNA compreende uma região de haste inferior (LS). A região de haste inferior compreende uma região de haste inferior de crRNA e uma região de haste inferior de trRNA que se associa como representado na FIG. 21C. Em algumas modalidades, a região de haste inferior do crRNA é pelo menos parcialmente complementar à região da haste inferior do trRNA. Em algumas modalidades, a região de haste inferior do crRNA é totalmente complementar à região de haste inferior do trRNA.

[00232] Em algumas modalidades, a região de haste inferior do crRNA e trRNA cada um compreende 6 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região de haste inferior do crRNA e trRNA compreende cada um compreendendo menos nucleotídeos do que os mostrados nas Tabelas 2 e 3 e a FIG. 21C. Em algumas modalidades, a região de haste inferior compreende mais nucleotídeos do que os mostrados nas Tabelas 2 e 3 e a FIG. 21C. Quando a região de haste inferior compreende menos ou mais nucleotídeos do que os mostrados no esquema das Tabelas 2 e 3 e a FIG. 21C, os padrões de modificação, como será evidente para o versado na técnica, são mantidos. Em algumas modalidades, o número de nucleotídeos na haste inferior do crRNA difere do número de nucleotídeos na haste inferior do trRNA.

c) Protuberância

[00233] Em algumas modalidades, o dgRNA compreende uma região de protuberância (B). Em algumas modalidades, o crRNA compreende uma região de protuberância e o trRNA compreende uma região de protuberância. Em algumas modalidades, cada região de protuberância compreende 1-4 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região de protuberância do crRNA compreende dois nucleotídeos, e a região de protuberância do trRNA compreende quatro nucleotídeos.

[00234] Em algumas modalidades, a região de protuberância crRNA está localizada entre a região de haste inferior e a região de haste superior do crRNA. Em algumas modalidades, a região de protuberância do crRNA compreende dois nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região de protuberância do crRNA compreende os nucleotídeos B1 e B2, como mostrado na Tabela 2 e FIG. 21C.

[00235] Em algumas modalidades, a região de protuberância trRNA está localizada entre a região de haste superior e a região de haste inferior do trRNA. Em algumas modalidades, a região de protuberância do trRNA compreende quatro nucleotídeos. Em algumas modalidades,

a região de protuberância do trRNA compreende os nucleotídeos B1 a B4, como mostrado na Tabela 3 e FIG. 21C.

[00236] Em algumas modalidades, a presença de uma protuberância resulta em uma dobra direcional entre os módulos de hastes superior e inferior em um dgRNA. A protuberância de crRNA e a protuberância de trRNA podem ser parcialmente complementares. A protuberância de crRNA e a protuberância de trRNA podem não ter complementaridade.

[00237] Em algumas modalidades, as regiões de protuberância do crRNA e trRNA compreendem mais nucleotídeos do que os mostrados nas Tabelas 2 e 3 e FIG. 21C. Quando a região de protuberância compreende menos ou mais nucleotídeos do que os mostrados no esquema das Tabelas 2 e 3 e a FIG. 21C, os padrões de modificação, como será evidente para o versado na técnica, são mantidos. Em algumas modalidades, o número de nucleotídeos na protuberância do crRNA difere do número de nucleotídeos na protuberância do trRNA.

d) Haste superior

[00238] Em algumas modalidades, o dgRNA compreende uma região de haste superior (US). A região de haste superior compreende uma região de haste superior de crRNA e uma região de haste superior de trRNA que se associa como representado na FIG. 21C. Em algumas modalidades, a região de haste superior do crRNA é pelo menos parcialmente complementar à região de haste superior do trRNA. Em algumas modalidades, a região de haste superior do crRNA é totalmente complementar à região de haste superior do trRNA.

[00239] Em algumas modalidades, a região de haste superior do crRNA compreende quatorze nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região de haste superior do trRNA compreende onze nucleotídeos. Em algumas modalidades, as regiões de haste superior do RNAr e RNAt compreendem cada uma menos nucleotídeos do que os mostra-

dos nas Tabelas 2 e 3 e a FIG. 21C. Em algumas modalidades, as regiões de haste superior do crRNA e trRNA compreendem mais nucleotídeos do que os mostrados nas Tabelas 2 e 3 e a FIG. 21C. Quando a região de haste superior compreende menos ou mais nucleotídeos do que os mostrados no esquema das Tabelas 2 e 3 e a FIG. 21C, os padrões de modificação, como será evidente para o versado na técnica, são mantidos.

[00240] Em algumas modalidades, a haste superior do crRNA compreende nucleotídeos US1 a US14, como mostrado na Tabela 2 e FIG. 21C.

[00241] Em algumas modalidades, a haste superior do trRNA compreende nucleotídeos US1 a US11 como mostrado na Tabela 3 e FIG. 21C.

e) Nexo

[00242] Em algumas modalidades, o dgRNA compreende um trRNA que compreende uma região de nexa. Em algumas modalidades, o nexa está entre a região de haste inferior e a região em grampo 1 do trRNA. Em algumas modalidades, o nexa está localizado imediatamente a jusante da haste inferior do trRNA. Em algumas modalidades, o nexa compreende dezoito nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região de nexa do trRNA compreende os nucleotídeos N1-N18, como mostrado na Tabela 3 e FIG. 21C. Em algumas modalidades, o nexa compreende menos nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 3 e FIG. 21C. Em algumas modalidades, a região de nexa do trRNA compreende mais nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 3 e a FIG. 21C. Quando a região de nexa compreende menos ou mais nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 3 e a FIG. 21C, os padrões de modificação, como será evidente para o versado na técnica, são mantidos.

[00243] Em algumas modalidades, a região de nexa tem nucleotí-

deos que são complementares na sequência de ácido nucleico quando lida em direções opostas. Em algumas modalidades, a complementaridade na sequência de ácido nucleico conduz a uma estrutura secundária de uma cadeia haste e/ou laço de haste no sgRNA (por exemplo, certos nucleotídeos na região de nexo podem emparelhar a base uns com os outros). Em algumas modalidades, as regiões do nexo podem não ser perfeitamente complementares umas às outras quando lidas em direções opostas.

f) Grampo

[00244] Em algumas modalidades, a região de grampo do trRNA é a jusante da região de nexo. Em algumas modalidades, a região de nucleotídeos imediatamente a jusante da região de nexo é denominada "grampo 1". Em algumas modalidades, a região de nucleotídeos imediatamente a jusante da região do grampo 1 é denominada "grampo 2". Em algumas modalidades a região de grampo compreende grampo 1 e grampo 2. Em alguns casos, grampo 1 e grampo 2 são separados por um ou mais nucleotídeos "n". Em algumas modalidades, $n = 1$. Em algumas modalidades, o trRNA compreende apenas grampo 1 ou grampo 2.

[00245] A substituição da região de grampo 1 de um trRNA com 2 nucleotídeos foi mostrada para permitir a atividade de edição de uma Cas RNP (vide US20150376586, Fig. 16). Em algumas modalidades, o trRNA compreende a substituição de grampo 1 por nucleotídeos "n", em que "n" é um número inteiro entre 1 e 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3 e 2. Em algumas modalidades, a região de grampo 1 de um trRNA é substituída por 2 nucleotídeos.

[00246] Em algumas modalidades, grampo 1 do trRNA compreende doze nucleotídeos imediatamente a jusante da região de nexo. Em algumas modalidades, a região de grampo 1 do trRNA compreende os nucleotídeos H1-1 a H1-12, como mostrado na Tabela 3 e na FIG.

21C.

[00247] Em algumas modalidades, nucleotídeos sem grampo estão presentes entre as regiões de grampo 1 e de grampo 2 do trRNA. Em algumas modalidades, um a dois nucleotídeos sem grampo residem entre o grampo 1 e o grampo 2.

[00248] Em algumas modalidades, grampo 2 do trRNA compreende quinze nucleotídeos após (3' para) grampo 1. Em algumas modalidades, a região de grampo 2 do trRNA compreende nucleotídeos H2-1 a H2-15, como mostrado na Tabela 3 e FIG. 21C. Em algumas modalidades, a região de grampo 2 do trRNA compreende os nucleotídeos H2-1 a H2-15 como mostrado na Tabela 3, e o "n" entre o grampo 1 e o grampo 2 é 1 ou 2.

[00249] Em algumas modalidades, uma região de grampo do trRNA compreende mais nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 3 e FIG. 21C. Quando uma região em grampo compreende menos ou mais nucleotídeos do que os mostrados na Tabela 3 e a FIG. 21C, os padrões de modificação, como será evidente para o versado na técnica, são mantidos.

[00250] Em algumas modalidades, uma região de grampo tem nucleotídeos que são complementares na sequência de ácido nucleico quando lidos em direções opostas. Em algumas modalidades, as regiões em grampo podem não ser perfeitamente complementares umas às outras quando lidas em direções opostas (por exemplo, o topo ou laço do grampo compreende nucleotídeos não emparelhados).

[00251] Em algumas modalidades, o trRNA compreende a substituição de grampo 1 com nucleotídeos "n", em que "n" é um inteiro entre 1 e 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3 e 2. Em algumas modalidades, a região de grampo 1 de um trRNA é substituída por 2 nucleotídeos.

g) Terminal 3'

[00252] Em algumas modalidades, o dgRNA compreende um trRNA

que compreende uma região de terminal 3' que compreende nucleotídeos adicionais após (3' para) a região de grampo (s). Em algumas modalidades, a região de terminal 3' compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 ou 20 ou mais nucleotídeos que não estão associados à estrutura secundária de um grampo. Em algumas modalidades, a região de terminal 3' compreende 1, 2, 3 ou 4 nucleotídeos que não estão associados à estrutura secundária de um grampo. Em algumas modalidades, a região de terminal 3' compreende 4 nucleotídeos que não estão associados à estrutura secundária de um grampo. Em algumas modalidades, a região de terminal 3' compreende 1, 2 ou 3 nucleotídeos que não estão associados à estrutura secundária de um grampo.

2. Modificações de dgRNAs

[00253] Em algumas modalidades, um dgRNA compreende um crRNA modificado e um trRNA não modificado. Em algumas modalidades, um dgRNA compreende um crRNA não modificado e um trRNA modificado. Em algumas modalidades, tanto o crRNA como o trRNA de um dgRNA compreendem modificações.

[00254] Em algumas modalidades, os gRNAs descritos no presente são em duas moléculas de RNA separadas (guia duplo ou dgRNA). Vide, Tabelas 2, 3 e FIG. 21C.

[00255] Em algumas modalidades, a invenção compreende um dgRNA que compreende ou consiste em a) qualquer uma das sequências de crRNA de SEQ ID Nos: 1-187; e b) qualquer uma das sequências de trRNA descritas nas SEQ ID Nos: 188-227.

[00256] Em algumas modalidades, um dgRNA que compreende qualquer uma das sequências de crRNA modificado de 1-187 é fornecido.

[00257] Em algumas modalidades, um dgRNA que compreende qualquer uma das sequências de trRNA modificado de 188-227 é fornecido.

[00258] Em algumas modalidades, um dgRNA que compreende qualquer uma das sequências de crRNA modificado de SEQ ID Nos: 19-31, 53-73, e 104-130 é fornecido. Em algumas modalidades, a invenção compreende um dgRNA que compreende qualquer uma das sequências modificadas de SEQ ID Nos: 19-31, 53-73 e 104-130, em que o crRNA adicionalmente compreende uma sequência espaçadora 5' que é pelo menos parcialmente complementar a uma sequência-alvo, e direciona uma Cas9 a seu alvo para clivagem.

[00259] Em algumas modalidades, a invenção compreende um crRNA que compreende qualquer uma das sequências descritas em SEQ ID Nos: 1-187. Em algumas modalidades, a invenção compreende um crRNA que compreende ou consiste em qualquer uma das sequências descritas nas SEQ ID Nos: 19-31, 53-73 e 104-130. Em algumas modalidades, a invenção compreende um crRNA que compreende qualquer uma das sequências descritas nas SEQ ID Nos: 19-31, 53-73 e 104-130 e uma região espaçadora.

[00260] Em algumas modalidades, a invenção compreende um trRNA que compreende ou consiste em qualquer uma das sequências descritas em SEQ ID Nos: 188-277.

[00261] Em algumas modalidades, a invenção compreende um crRNA que compreende nucleotídeos tendo pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75, ou 70% de identidade com os nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 1-187, em que o padrão de modificação é idêntico ao padrão de modificação mostrado no identificador de sequência de referência. Ou seja, os nucleotídeos A, U, C e G podem diferir em 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 ou 70% em comparação com o que é mostrado nas sequências, mas a modificação permanece inalterada.

[00262] Em algumas modalidades, a invenção compreende um trRNA que compreende nucleotídeos tendo pelo menos 99, 98, 97, 96,

95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75, ou 70% de identidade com os nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 188-277, em que o padrão de modificação é idêntico ao padrão de modificação mostrado no identificador de sequência de referência. Ou seja, os nucleotídeos A, U, C e G podem diferir em 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 ou 70% em comparação com o que é mostrado nas sequências, mas a modificação em cada nucleotídeo permanece inalterada.

3. *crRNAs, trRNAs e dgRNAs com modificações*

[00263] Em algumas modalidades, o crRNA compreende um ou mais nucleotídeos modificados dentro de um ou mais do terminal 5', haste inferior, protuberância, haste superior e terminal 3'.

[00264] Em algumas modalidades, a modificação compreende 2'-O-Me.

[00265] Em algumas modalidades, a modificação compreende 2'-F.

[00266] Em algumas modalidades, a modificação compreende uma ligação de fosforotioato (PS) ligando um ou mais nucleotídeos. Em algumas modalidades, a modificação é de três ligações de PS ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00267] Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo abásico invertido.

[00268] Em algumas modalidades, um crRNA é fornecido que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em cada nucleotídeo na haste superior. Em algumas modalidades, US-1 a US-14 do crRNA são modificados com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, LS1 e LS6 do crRNA são modificados com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, LS5 do crRNA é modificado com 2'-O-Me.

[00269] Em algumas modalidades, um crRNA que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em cada um dos nucleotídeos na haste superior, e LS1 e LS6 na haste inferior é fornecido. Em algumas

modalidades, o crRNA adicionalmente compreende um ou mais nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-O-moe na região de terminal 5' e/ou 3', por exemplo, em uma modificação de extremidade 5' e/ou 3'.

[00270] Em algumas modalidades, um crRNA que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em cada um dos nucleotídeos na haste superior, LS1, LS5 e LS6 na haste inferior é fornecido. Em algumas modalidades, o crRNA adicionalmente compreende um ou mais nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-O-moe na região de terminal 5' e/ou 3', por exemplo, em uma modificação de extremidade 5' e/ou 3'.

[00271] Em algumas modalidades, a invenção compreende um crRNA que compreende nucleotídeos modificados com 2'-F em LS1, LS2 e LS6 na haste inferior. Em algumas modalidades, o crRNA adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-F em cada um dos B1 e B2 na região de protuberância. Em algumas modalidades, a invenção compreende um crRNA que compreende nucleotídeos modificados com 2'-F em LS1, LS2 e LS6 na haste inferior, e em cada um dos B1 e B2 na região de protuberância. Em algumas modalidades, o crRNA adicionalmente compreende um ou mais nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-O-moe na região de terminal 5' e/ou 3', por exemplo, em uma modificação de extremidade 5' e/ou 3'.

[00272] Em algumas modalidades, o crRNA compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos nucleotídeos LS1 e LS6 na região de haste inferior; cada um dos ácidos nucleicos na região de protuberância; e cada um dos ácidos nucleicos na região de haste superior. Em algumas modalidades, o nucleotídeo LS5 do crRNA também é modificado com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, LS2, LS3 e LS4 do crRNA não são modificados. Em algumas modalidades, o crRNA adicionalmente compreende um ou mais nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-O-moe na região de terminal 5' e/ou 3', por exem-

plo, em uma modificação de extremidade 5' e/ou 3'.

[00273] Em algumas modalidades, o crRNA compreende nucleotídeos modificados com 2'-Fluoro (2'-F) em LS1, LS2 e LS6 na região de haste inferior, e cada um dos nucleotídeos na região de protuberância. Em algumas modalidades, o crRNA compreende nucleotídeos modificados com 2'-Fluoro (2'-F) em LS1, LS2 e LS6 na região de haste inferior, e em B1 e B2 na região de protuberância. Em algumas modalidades, o crRNA compreende nucleotídeos modificados com 2'-Fluoro (2'-F) em LS1-LS6 na região de haste inferior, e cada um dos nucleotídeos na região de protuberância. Em algumas modalidades, o crRNA adicionalmente compreende um ou mais nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-O-moe na região de terminal 5' e/ou 3', por exemplo, em uma modificação de extremidade 5' e/ou 3'.

[00274] Em algumas modalidades, a invenção compreende um trRNA que compreende um ou mais nucleotídeos modificados dentro de uma ou mais das seguintes regiões: o terminal 5', a região de haste superior; a região de protuberância; a região de haste inferior; a região de nexo; a região de grampo 1; a região interveniente entre as regiões de grampo 1 e de grampo 2; a região de grampo 2; e a região de terminal 3'.

[00275] Em algumas modalidades, a modificação compreende 2'-O-Me.

[00276] Em algumas modalidades, a modificação compreende 2'-F.

[00277] Em algumas modalidades, a modificação compreende uma ligação de fosforotioato (PS) ligando um ou mais nucleotídeos. Em algumas modalidades, a modificação é de três ligações de PS ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00278] Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo abásico invertido.

[00279] Em algumas modalidades, o trRNA compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em cada ácido nucleico na haste superior; B1 e B2 na região de protuberância; LS1 e LS2 na região de haste inferior; N3, N4, N5, N15, N16, N17 e N18 na região de nexos; cada nucleotídeo na região de grampo 1; um nucleotídeo entre a região de grampo 1 e de grampo 2; e cada nucleotídeo na região de grampo 2. Em algumas modalidades, o trRNA adicionalmente compreende um ou mais nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-O-moe na região de terminal 5' e/ou 3', por exemplo, em uma modificação de extremidade 5' e/ou 3'.

[00280] Em algumas modalidades, o trRNA compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em cada ácido nucleico na haste superior; cada nucleotídeo na região de protuberância; LS1, LS2, LS5 e LS6 na região de haste inferior; N3-N5, N10-N18 na região de nexos; cada nucleotídeo na região de grampo 1; um nucleotídeo entre a região de grampo 1 e de grampo 2; e cada nucleotídeo na região de grampo 2. Em algumas modalidades, o crRNA adicionalmente compreende um ou mais nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-O-moe na região de terminal 5' e/ou 3', por exemplo, em uma modificação de extremidade 5' e/ou 3'.

[00281] Em algumas modalidades, o trRNA compreende nucleotídeos modificados com 2'-F em N15 a N18 na região de nexos. Em algumas modalidades, o trRNA adicionalmente compreende um ou mais nucleotídeos modificados com 2'-F na região de terminal 5' e/ou 3', por exemplo, em uma modificação de extremidade 5' e/ou 3'.

[00282] Em algumas modalidades, o trRNA compreende nucleotídeos modificados com 2'-F em LS4 e LS5 na região de haste inferior, e N13-N18 na região de nexos. Em algumas modalidades, o trRNA adicionalmente compreende um ou mais nucleotídeos modificados com 2'-F na região de terminal 5' e/ou 3', por exemplo, em uma modificação

de extremidade 5' e/ou 3'.

[00283] Em algumas modalidades, o trRNA compreende nucleotídeos modificados com 2'-F em LS1, LS3 e LS5 na haste inferior, e nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS2, LS4 e LS6 na haste inferior.

[00284] Divulgado aqui, em algumas modalidades, é um crispr RNA (crRNA) que compreende uma ou mais modificações dentro de uma ou mais das seguintes regiões: os primeiros cinco nucleotídeos no terminal 5'; a região de haste inferior; a região de protuberância; a região da haste superior; e os últimos cinco nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-metil (2'-O-Me). Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-fluoro (2'-F). Em algumas modalidades, a modificação compreende uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos. Em algumas modalidades, os primeiros três nucleotídeos no terminal 5' e os três últimos nucleotídeos no terminal 3' são modificados. Em algumas modalidades, os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' são ligados a ligações de fosforotioato (PS). Em algumas modalidades, a modificação compreende 2'-O-Me. Em algumas modalidades, a modificação compreende 2'-F. Em algumas modalidades, os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' estão ligados com uma ligação de PS, e em que os três primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os três últimos nucleotídeos no terminal 3' compreende modificações de 2'-O-Me. Em algumas modalidades, os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' estão ligados com uma ligação de PS, e em que os três primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os três últimos nucleotídeos no terminal 3' compreende modificações de 2'-F. Em algumas modalidades, LS1 e LS6 são modi-

ficados com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, cada um dos nucleotídeos na região de haste superior é modificado com 2'-O-Me.

[00285] Em algumas modalidades, a invenção compreende um crispr RNA (crRNA) que compreende ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me nos seguintes nucleotídeos: LS1 e LS6 na região de haste inferior; e cada nucleotídeo na região de haste superior. Em algumas modalidades, o crRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o crRNA adicionalmente compreende ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5', e os ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos últimos três nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, LS1, LS2 e LS6 são modificados com 2'-F. Em algumas modalidades, cada nucleotídeo na região de protuberância é modificado com 2'-F.

[00286] Divulgado aqui, em algumas modalidades, é um crispr RNA (crRNA) que compreende ácidos nucleicos modificados com 2'-F nos seguintes nucleotídeos: LS1, LS2 e LS6 na região de haste inferior; e cada nucleotídeo na região de protuberância. Em algumas modalidades, o crRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o crRNA adicionalmente compreende ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5', e os ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos últimos três nucleotídeos no terminal 3'.

[00287] Em algumas modalidades, um crRNA que compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 1-187 é fornecido. Em algumas modalidades, é proporcionado um crRNA que compreen-

de os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 19-31, 53-73, 104-130 e 161-187. Em algumas modalidades, um crRNA que compreende ácidos nucleicos tendo pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 ou 70% de identidade com os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 19-31, 53-73, 104-130 e 161-187, em que o padrão de modificação é idêntico ao padrão de modificação mostrado no identificador de sequência de referência, fornecido. Em algumas modalidades, o crRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00288] Está também incluído um tracr RNA (trRNA) que compreende uma ou mais modificações dentro de uma ou mais das seguintes regiões: os primeiros cinco nucleotídeos no terminal 5'; a região da haste superior; a região de protuberância; a região de haste inferior; a região de nexa; a região de grampo 1; a região de grampo 2; e os últimos cinco nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-metil (2'-O-Me). Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-fluoro (2'-F). Em algumas modalidades, a modificação compreende uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos. Em algumas modalidades, os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' estão ligados com ligações de fosforotioato (PS). Em algumas modalidades, os primeiros três nucleotídeos no terminal 5' e os três últimos nucleotídeos no terminal 3' são modificados. Em algumas modalidades, a modificação compreende 2'-O-Me. Em algumas modalidades, a modificação compreende 2'-F. Em algumas modalidades, os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' estão ligados com uma ligação de PS, e em que os três

primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os três últimos nucleotídeos no terminal 3' compreende modificações de 2'-O-Me. Em algumas modalidades, os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' estão ligados com uma ligação de PS, e em que os três primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os três últimos nucleotídeos no terminal 3' compreende modificações de 2'-F. Em algumas modalidades, cada nucleotídeo na região de haste superior é modificado com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, B1 e B2 dentro da região de protuberância são modificados com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, N3, N4, N5, N15, N16, N17 e N18 na região de nexa são modificados com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, cada nucleotídeo na região de grampo 1 é modificado com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, cada nucleotídeo na região de grampo 2 é modificado com 2'-O-Me.

[00289] Em algumas modalidades, a invenção compreende um tracrRNA (trRNA) que compreende ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me nos seguintes nucleotídeos: cada nucleotídeo na haste superior; B1 e B2 dentro da região de protuberância; N3, N4, N5, N15, N16, N17 e N18 na região de nexa; cada nucleotídeo na região de grampo 1; e cada nucleotídeo na região de grampo 2. Em algumas modalidades, o trRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o trRNA adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5', e ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F no último três nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, N15, N16, N17 e N18 são modificados com 2'-F. Em algumas modalidades, LS1, LS3 e LS5 são modificados com 2'-F, e LS2, LS4 e LS6 são modificados com 2'-O-Me. Em algumas modalidades, o trRNA adicional-

mente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o trRNA adicionalmente compreende ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5', e ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos últimos três nucleotídeos no terminal 3'.

[00290] Em algumas modalidades, um trRNA que compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 188-227 é fornecido. Em algumas modalidades, um trRNA que compreende ácidos nucleicos tendo pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 ou 70% de identidade com os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 188-227, em que o padrão de modificação é idêntico ao padrão de modificação mostrado no identificador de sequência de referência, é fornecido. Em algumas modalidades, o trRNA adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00291] Em alguns casos, é fornecido um guia duplo que compreende um crRNA e um trRNA, em que o crRNA compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 1-187, e em que o trRNA compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 188-227.

[00292] Um guia duplo que compreende um crRNA divulgado aqui e um trRNA divulgado no presente é englobado, como se fosse um guia duplo que compreende um crRNA divulgado aqui e um trRNA não modificado. Em algumas modalidades, é fornecido um guia duplo que compreende um crRNA não modificado e um trRNA modificado aqui divulgado.

[00293] Em algumas modalidades, e as seguintes são englobadas:

[00294] Modalidade 55. Um crispr RNA (crRNA) que compreende uma ou mais modificações dentro de uma ou mais das seguintes regiões:

- a. os primeiros cinco nucleotídeos no terminal 5';
- b. a região de haste inferior;
- c. a região de protuberância;
- d. a região da haste superior; e
- e. os últimos cinco nucleotídeos no terminal 3'.

[00295] Modalidade 56. O crRNA da modalidade 55, em que a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-metil (2'-O-Me).

[00296] Modalidade 57. O crRNA da modalidade 55, em que a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-fluoro (2'-F).

[00297] Modalidade 58. O RNAt da modalidade 55, em que a modificação compreende uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos.

[00298] Modalidade 59. O RNAr de qualquer das modalidades 55-58, em que os primeiros três nucleotídeos no terminal 5' e os três últimos nucleotídeos no terminal 3' são modificados.

[00299] Modalidade 60. O gRNA de qualquer uma das modalidades 55-58, em que os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' são ligados a ligações de fosforotioato (PS).

[00300] Modalidade 61. O gRNA da modalidade 59, em que a modificação compreende 2'-O-Me.

[00301] Modalidade 62. O gRNA da modalidade 59, em que a modificação compreende 2'-F.

[00302] Modalidade 63. O gRNA de qualquer uma das modalidades 55-62, em que os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' são ligados com uma li-

gação de PS e em que os primeiros três nucleotídeos no terminal 5' e os últimos três nucleotídeos no terminal 3' compreendem modificações de 2'-O-Me.

[00303] Modalidade 64. O gRNA de qualquer uma das modalidades 55-62, em que os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' são ligados com uma ligação de PS e em que os primeiros três nucleotídeos no terminal 5' e os últimos três nucleotídeos no terminal 3' compreendem modificações de 2'-F.

[00304] Modalidade 65. O crRNA de qualquer uma das modalidades 55-60, em que LS1 e LS6 são modificados com 2'-O-Me.

[00305] Modalidade 66. O RNAr de qualquer uma das modalidades 55-60 e 65, em que cada um dos nucleotídeos na região de haste superior é modificado com 2'-O-Me. Modalidade 67. Um CRISPR RNA (crRNA) que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em:

- a. LS1 e LS6 na região de haste inferior; e
- b. cada nucleotídeo na região de haste superior.

[00306] Modalidade 68. O RNAr da modalidade 67, que compreende adicionalmente três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00307] Modalidade 69. O gRNA da modalidade 67 ou 68, que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5', e nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos últimos três nucleotídeos no terminal 3'.

[00308] Modalidade 70. O RNAr de qualquer das modalidades 55-60, em que LS1, LS2 e LS6 são modificados com 2'-F.

[00309] Modalidade 71. O RNAr de qualquer das modalidades 55-60 e 70, em que cada nucleotídeo na região de protuberância é modi-

ficado com 2'-F.

[00310] Modalidade 72. Um crispr RNA (crRNA) que compreende nucleotídeos modificados com 2'-F em:

- a. LS1, LS2 e LS6 na região de haste inferior; e
- b. cada nucleotídeo na região de protuberância.

[00311] Modalidade 73. O RNA_t de qualquer das modalidades 70-72, que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00312] Modalidade 74. O gRNA da modalidade 72 ou 73, que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5', e nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos últimos três nucleotídeos no terminal 3'.

[00313] Modalidade 75. Um crRNA que compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 1 - 187.

[00314] Modalidade 76. Um crRNA que compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 19-31, 53-73, 104-130 e 161-187.

[00315] Modalidade 77. Um crRNA que compreende ácidos nucleicos tendo pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 ou 70% de identidade com os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ. ID Nos: 19-31, 53-73, 104-130 e 161-187, em que o padrão de modificação é idêntico ao padrão de modificação mostrado no identificador de sequência de referência.

[00316] Modalidade 78. O gRNA de qualquer uma das modalidades 75-77, que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos ao terminal 3'.

[00317] Modalidade 79. Um tracr RNA (trRNA) que compreende

uma ou mais modificações dentro de uma ou mais das seguintes regiões:

- a. os primeiros cinco nucleotídeos no terminal 5';
- b. a região da haste superior;
- c. a região de protuberância;
- d. a região de haste inferior;
- e. a região denexo;
- f. a região de grampo 1;
- g. a região de grampo 2; e
- h. os últimos cinco nucleotídeos no terminal 3'.

[00318] Modalidade 80. O trRNA da modalidade 79, em que a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-metil (2'-O-Me).

[00319] Modalidade 81. O trRNA da modalidade 79, em que a modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-fluoro (2'-F).

[00320] Modalidade 82. O trRNA da modalidade 79, em que a modificação compreende uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos.

[00321] Modalidade 83. O trRNA de qualquer uma das modalidades 79-82, em que os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' estão ligados com ligações de fosforotioato (PS).

[00322] Modalidade 84. O trRNA de qualquer uma das modalidades 79-82, em que os três primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os três últimos nucleotídeos no terminal 3' são modificados.

[00323] Modalidade 85. O trRNA da modalidade 84, em que a modificação compreende 2'-O-Me.

[00324] Modalidade 86. O trRNA da modalidade 84, em que a modificação compreende 2'-F.

[00325] Modalidade 87. O trRNA de qualquer uma das modalidades

79-86, em que os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' estão ligados com uma ligação de PS e em que os três primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os últimos três nucleotídeos no terminal 3' compreendem modificações de 2'-O-Me.

[00326] Modalidade 88. O trRNA de qualquer uma das modalidades 79-86, em que os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' são ligados com uma ligação de PS e em que os primeiros três nucleotídeos no terminal 5' e os últimos três nucleotídeos no terminal 3' compreendem modificações de 2'-F.

[00327] Modalidade 89. O trRNA de qualquer uma das modalidades 79-84, em que cada nucleotídeo na região de haste superior é modificado com 2'-O-Me.

[00328] Modalidade 90. O trRNA de qualquer uma das modalidades 79-84 e 89, em que B1 e B2 dentro da região de protuberância são modificados com 2'-O-Me.

[00329] Modalidade 91. O trRNA de qualquer uma das modalidades 79-84 e 89-90, em que N3, N4, N5, N15, N16, N17 e N18 na região de nexo são modificados com 2'-O-Me.

[00330] Modalidade 92. O trRNA de qualquer uma das modalidades 79-84 e 89-91, em que cada nucleotídeo na região de grampo 1 $\frac{1}{2}$ é modificado com 2'-O-Me.

[00331] Modalidade 93. O trRNA de qualquer uma das modalidades 79-84 e 89-92, em que cada nucleotídeo na região de grampo 2 é modificado com 2'-O-Me.

[00332] Modalidade 94. Um tracr RNA (trRNA) compreendendo nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em:

- a. cada nucleotídeo na haste superior;
- b. B1 e B2 dentro da região de protuberância;

- c. N3, N4, N5, N15, N16, N17 e N18 na região de nexos;
- d. cada nucleotídeo na região de grampo 1; e
- e. cada nucleotídeo na região de grampo 2.

[00333] Modalidade 95. O trRNA da modalidade 94, que compreende adicionalmente três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00334] Modalidade 96. O gRNA da modalidade 94 ou 95, que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5', e ácidos nucleicos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos últimos três nucleotídeos no terminal 3'.

[00335] Modalidade 97. O trRNA de qualquer das modalidades 79-84, em que N15, N16, N17 e N18 são modificados com 2'-F.

[00336] Modalidade 98. O trRNA de qualquer das modalidades 79-84 e 97, em que LS1, LS3 e LS5 são modificados com 2'-F e LS2, LS4 e LS6 são modificados com 2'-O-Me.

[00337] Modalidade 99. O trRNA de qualquer uma das modalidades 87-98, que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00338] Modalidade 100. O trRNA da modalidade 98 ou 99, que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos no terminal 5', e nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos últimos três nucleotídeos no terminal 3'.

[00339] Modalidade 101. Um trRNA que compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 188-227.

[00340] Modalidade 102. Um trRNA que compreende ácidos nucleicos possuindo pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85,

80, 75 ou 70% de identidade com os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ. ID Nos: 188-227, em que o padrão de modificação é idêntico ao padrão de modificação mostrado no identificador de sequência de referência.

[00341] Modalidade 103. O trRNA de qualquer uma das modalidades 101- 102, que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

[00342] Modalidade 104. Guia duplo que compreende um crRNA e um trRNA, em que o crRNA compreende os nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 1-187, e em que o trRNA compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 188-227.

[00343] Modalidade 105. Guia duplo que compreende um crRNA de qualquer uma das modalidades 55-78 e um trRNA de qualquer uma das modalidades 79-103.

[00344] Modalidade 106. Guia duplo que compreende um crRNA de qualquer uma das modalidades 55-78 e um trRNA não modificado.

[00345] Modalidade 107. Uma guia dual que compreende um crRNA modificado e um trRNA de qualquer uma das modalidades 79-103.

C. Modificações nos nucleotídeos terminais

[00346] Em algumas modalidades, os nucleotídeos terminais 5' ou 3' de qualquer um dos RNAs guia descritos no presente são modificados. Em algumas modalidades, os 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos terminais (ou seja, últimos) na região de terminal 3' do RNA guia, incluindo, por exemplo, o sgRNA, o dgRNA, o crRNA, trRNA, ou ambos crRNA e trRNA são modificados. Em algumas modalidades, os 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos terminais (ou seja, últimos) na região de terminal 3' do RNA guia compreendem mais do que uma modificação. Em algumas modalidades, pelo menos um dos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nu-

cleotídeos terminais (ou seja, últimos) na região de terminal 3' são modificados. Em algumas modalidades, pelo menos dois dos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos terminais (ou seja, últimos) na região de terminal 3' são modificados. Em algumas modalidades, pelo menos três dos nucleotídeos terminais (isto é, último) 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 na região de terminal 3' são modificados. Em algumas modalidades, a modificação compreende uma ligação de PS.

[00347] Em algumas modalidades, a extremidade 5' da região de terminal 5' é modificada, por exemplo, os primeiros 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos do sgRNA, o dgRNA, crRNA, trRNA, ou ambos crRNA e trRNA são modificados. Em algumas modalidades, os primeiros 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos na região de terminal 3' do RNA guia compreendem mais do que uma modificação. Em algumas modalidades pelo menos um dos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos terminais (isto é, primeiros) na extremidade 5' são modificados. Em algumas modalidades, pelo menos dois dos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos terminais na extremidade 5' são modificados. Em algumas modalidades, pelo menos três dos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos terminais na extremidade 5' são modificados. Em algumas modalidades, a modificação compreende uma ligação de PS.

[00348] Em algumas modalidades, ambos os terminais 5' e 3' (por exemplo, extremidades) do RNA guia, por exemplo, sgRNA, dgRNA, crRNA, trRNA, ou ambos, crRNA e trRNA são modificados. Em algumas modalidades, apenas o terminal 5' do RNA guia, por exemplo, sgRNA, dgRNA, crRNA, trRNA ou ambos, crRNA e trRNA, é modificado. Em algumas modalidades, apenas o terminal 3' do RNA guia, por exemplo, sgRNA, dgRNA, crRNA, trRNA ou ambos, crRNA e trRNA, é modificado.

[00349] Em algumas modalidades, o gRNA compreende modificações em 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos primeiros 7 nucleotídeos em uma ex-

tremidade 5' do gRNA. Em algumas modalidades, o gRNA compreende modificações em 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos 7 nucleotídeos terminais em uma extremidade 3'. Em algumas modalidades, 2, 3 ou 4 dos primeiros 4 nucleotídeos na extremidade 5' e/ou 2, 3 ou 4 dos nucleotídeos 4 terminais na extremidade 3' são modificados. Em algumas modalidades, 2, 3 ou 4 dos primeiros 4 nucleotídeos na extremidade 5' estão ligados com ligações de fosforotioato (PS).

[00350] Em algumas modalidades, a modificação do terminal 5' e/ou terminal 3' compreende uma modificação de 2'-O-metil (2'-O-Me) ou 2'-O-(2-metoxietil) (2'-O-moe) de um nucleotídeo. Em algumas modalidades, a modificação compreende uma modificação de 2'-fluoro (2'-F) para um nucleotídeo. Em algumas modalidades, a modificação compreende uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos. Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo abásico invertido. Em algumas modalidades, a modificação compreende mais de uma modificação selecionada de 2'-O-Me, 2'-O-moe, 2'-fluoro (2'-F), uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos, e um nucleotídeo abásico invertido. Em algumas modalidades, uma modificação equivalente é englobada.

[00351] Em algumas modalidades, o RNA guia, por exemplo, sgRNA, dgRNA, crRNA, trRNA, ou ambos crRNA e trRNA compreende um ou mais ligações de fosforotioato (PS) entre o primeiro um, dois, três, quatro, cinco, seis, ou sete nucleotídeos no terminal 5'. Em algumas modalidades, o RNA guia, por exemplo, sgRNA, dgRNA, crRNA, trRNA ou ambos, crRNA e trRNA, compreende uma ou mais ligações de PS entre os últimos um, dois, três, quatro, cinco, seis ou sete nucleotídeos no terminal 3'. Em algumas modalidades, o RNA guia, por exemplo, sgRNA, dgRNA, crRNA, trRNA, ou ambos, crRNA e trRNA, compreende uma ou mais ligações de PS entre os últimos um, dois, três, quatro, cinco, seis ou sete nucleotídeos em ambos os terminal 5' e o

terminal 3'. Em algumas modalidades, para além das ligações de PS, os nucleotídeos terminais 5' e 3' podem compreender nucleotídeos modificados com 2'-O-Me, 2'-O-moe ou 2'-F.

[00352] Em algumas modalidades, o RNA guia, por exemplo, sgRNA, dgRNA, crRNA, trRNA, ou ambos, crRNA e trRNA, compreende nucleotídeos modificados nos terminais 5' e 3' e nucleotídeos modificados em uma ou mais outras regiões descritas nas Tabelas. 1-3 e FIG 21A ou 21C.

[00353] Em algumas modalidades, o crRNA, trRNA, ou ambos crRNA e trRNA compreende nucleotídeos modificados que não estão nas extremidades 5' ou 3'. Padrões específicos de modificações são descritos abaixo e na Tabela 4.

3. Entrega de gRNAs e Proteína Cas

[00354] Em algumas modalidades, além de pelo menos um gRNA, as composições aqui fornecidas compreendem ainda uma nuclease. Em algumas modalidades, a nuclease é uma proteína Cas. Em algumas modalidades, o gRNA juntamente com uma proteína Cas é chamado de Cas RNP. Em algumas modalidades, a proteína Cas é do sistema CRISPR/Cas Tipo II. Em algumas modalidades, a proteína Cas é Cas9. Em algumas modalidades, a proteína Cas9 é uma Cas9 do tipo selvagem. Em algumas modalidades, a proteína Cas9 é derivada da proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, por exemplo, uma Cas9 de *S. pyogenes*. Em algumas modalidades, a proteína Cas9 não é derivada de *S. pyogenes*, mas funciona da mesma maneira que Cas9 de *S. pyogenes*, de tal forma que o gRNA que é específico de Cas9 de *S. pyogenes* direcionará o Cas9 sem *S. pyogenes* para o seu sítio alvo. Em algumas modalidades, o Cas induz uma quebra de duplo filamento no DNA alvo. Os equivalentes da proteína Cas9 de *S. pyogenes* estão englobados pelas modalidades aqui descritas.

[00355] Cas9 engloba modificado e variantes do mesmo. Versões

modificadas de Cas9 tendo um domínio catalítico, ou RuvC ou HNH, que é inativo são denominadas "nickases". As nickases cortam apenas uma cadeia no DNA alvo, criando assim uma quebra de filamento simples. Uma ruptura de cadeia simples pode também ser conhecida como um "nick". Em algumas modalidades, as composições e métodos compreendem nickases. Em algumas modalidades, as composições e métodos compreendem uma nickase Cas9 que induz um nick em vez de uma quebra de duplo filamento no DNA alvo.

[00356] Em algumas modalidades, a proteína Cas pode ser modificada para conter apenas um domínio de nuclease funcional. Por exemplo, a proteína Cas pode ser modificada de tal modo que um dos domínios nuclease seja mutado ou totalmente ou parcialmente deletado para reduzir a sua atividade de clivagem de ácido nucleico. Em algumas modalidades, uma nickase Cas é utilizada com um domínio RuvC com atividade reduzida. Em algumas modalidades, uma nickase Cas é utilizada com um domínio RuvC inativo. Em algumas modalidades, uma nickase Cas é usada com um domínio HNH com atividade reduzida. Em algumas modalidades, uma nickase Cas é usada com um domínio HNH inativo.

[00357] Em algumas modalidades, um aminoácido conservado dentro de um domínio de nuclease de proteína Cas é substituído para reduzir ou alterar a atividade da nuclease. Em algumas modalidades, uma proteína Cas pode compreender uma substituição de aminoácido no domínio de nuclease semelhante a RuvC ou RuvC. Exemplos de substituições de aminoácidos no domínio de nuclease tipo RuvC ou RuvC incluem D10A (com base na proteína Cas9 de *S. pyogenes*). Em algumas modalidades, a proteína Cas pode compreender uma substituição de aminoácido no domínio de nuclease de tipo HNH ou do tipo HNH. Exemplos de substituições de aminoácidos no domínio da nuclease de HNH ou do tipo HNH incluem E762A, H840A, N863A,

H983A e D986A (com base na proteína Cas9 de *S. pyogenes*).

[00358] Em algumas modalidades, o complexo RNP descrito no presente documento compreende uma nickase e um par de RNAs guia que são complementares aos filamentos de senso e antissenso da sequência-alvo, respectivamente. Nesta modalidade, os RNA guia dirigem a nickase para uma sequência-alvo e introduzem uma quebra de duplo filamento (DSB), gerando um corte nos filamentos opostos da sequência-alvo (isto é duplo nick). Em algumas modalidades, o uso de duplo nick pode melhorar a especificidade e reduzir os efeitos fora do alvo. Em algumas modalidades, uma nickase Cas é usada em conjunto com dois RNAs guia separados direcionados a filamentos opostos de DNA para produzir um duplo nick no DNA alvo. Em algumas modalidades, uma nickase Cas é usada em conjunto com dois RNAs guia separados que são selecionados para estarem próximos para produzir um duplo nick no DNA alvo.

[00359] Em algumas modalidades, são utilizadas proteínas Cas quiméricas, em que um domínio ou região da proteína é substituído por uma porção de uma proteína diferente. Em algumas modalidades, um domínio de nuclease Cas pode ser substituído por um domínio de uma nuclease diferente, tal como Fok1. Em algumas modalidades, uma proteína Cas pode ser uma nuclease modificada.

[00360] Em algumas modalidades, a proteína Cas compreende uma proteína de fusão que compreende uma Cas9 cataliticamente inativa ligada a um domínio funcional heterólogo (vide, por exemplo, WO2014152432). Em algumas modalidades, a Cas9 inativa cataliticamente é de *S. pyogenes*. Em algumas modalidades, a Cas9 inativa cataliticamente compreende mutações que inativam a Cas9. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo é um domínio que modifica a expressão gênica, histonas ou DNA. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo é um domínio de ativação

transcricional ou um domínio repressor transcricional.

A. PAM

[00361] Em algumas modalidades, a sequência-alvo pode ser adjacente ao PAM. Em algumas modalidades, o PAM pode ser adjacente a, ou dentro de 1, 2, 3 ou 4, nucleotídeos da extremidade 3' da sequência-alvo. O comprimento e a sequência do PAM podem depender da proteína Cas utilizada. Por exemplo, o PAM pode ser selecionado a partir de um consenso ou uma sequência PAM particular para uma proteína Cas9 específica ou ortólogo de Cas9, incluindo os divulgados na Figura 1 de Ran et al., Nature 520:186-191 (2015), que é incorporada aqui por referência. Em algumas modalidades, o PAM pode compreender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos de comprimento. Exemplos de sequências PAM exemplificativas não limitativas incluem NGG, NAG, NGA, NGAG, NGCG, NNGRRT, TTN, NGGNG, NG, NAAAN, NNAAA AW, NNNNACA, GNNNCNNA e NNNNGATT (em que N definido como qualquer nucleotídeo e W definido como qualquer um dos nucleotídeos; A ou T e R é definido como A ou G). Em algumas modalidades, a sequência PAM pode ser NGG. Em algumas modalidades, a sequência PAM pode ser NGGNG. Em algumas modalidades, a sequência PAM pode ser NNAAA AW.

B. Entrega de gRNA modificado

[00362] As nanopartículas lipídicas (LNPs) são um meio bem conhecido para entrega de cargas de nucleotídeos e proteínas, e podem ser usadas para entrega do gRNA, mRNA, Cas9 e RNPs divulgados aqui. Em algumas modalidades, as LNPs entregam ácido nucleico, proteína ou ácido nucleico juntamente com proteína.

[00363] Em algumas modalidades, a invenção compreende um método para a entrega de qualquer um dos gRNAs divulgados aqui para um objeto, em que o gRNA está associado com uma LNP. Em algumas modalidades, gRNA/LNP também estão associados a uma Cas9

ou a um mRNA codificador de Cas9.

[00364] Em algumas modalidades, a invenção compreende uma composição que compreende qualquer um dos gRNAs divulgados e uma LNP. Em algumas modalidades, a composição adicionalmente compreende uma Cas9 ou um mRNA codificando Cas9.

[00365] Em algumas modalidades, as LNPs compreendem lipídios catiônicos. Em algumas modalidades, as LNPs compreendem octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octilóxi)butanoil)óxi)-2-(((3-(dietilamino)propóxi)carbonil)óxi)metil)propila, também denominado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octilóxi)butanoil)óxi)-2-(((3-(dietilamino)propóxi)carbonil)óxi)metil)propila. Em algumas modalidades, as LNPs compreendem razões molares de uma amina lipídica catiônica para fosfato de RNA (N:P) de cerca de 4,5.

[00366] Em algumas modalidades, LNPs associadas com os gRNAs divulgados aqui são para uso na preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio.

[00367] Eletroporação é um meio bem conhecido para a entrega de carga, e qualquer metodologia de eletroporação pode ser usada para a entrega de qualquer um dos gRNAs aqui divulgados. Em algumas modalidades, a eletroporação pode ser utilizada para administrar qualquer um dos gRNAs aqui divulgados e Cas9 ou um mRNA codificando Cas9.

[00368] Em algumas modalidades, a invenção compreende um método para a entrega de qualquer um dos gRNAs divulgados aqui para uma célula ex vivo, em que o gRNA está associado com uma LNP ou não associado a uma LNP. Em algumas modalidades, gRNA/LNP ou gRNA também estão associados a uma Cas9 ou a um mRNA codificador de Cas9.

4. Métodos de Modulação Genética

[00369] Em algumas modalidades, a invenção compreende uma

formulação farmacêutica que compreende qualquer um dos gRNAs aqui divulgados em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a invenção compreende uma formulação farmacêutica que compreende qualquer um dos gRNAs aqui divulgados e uma LNP em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a invenção compreende uma formulação farmacêutica que compreende qualquer um dos gRNAs aqui divulgados, uma proteína Cas9 ou um mRNA que codifica uma proteína Cas9 e uma LNP em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a formulação farmacêutica é para uso na preparação de um medicamento para tratar uma doença ou distúrbio. Em algumas modalidades, a invenção compreende um método de tratamento de um paciente humano que compreende a administração de qualquer um dos gRNAs ou formulações farmacêuticas aqui descritas.

[00370] Em algumas modalidades, a invenção compreende um método ou uso de modificar um DNA alvo que compreende administrar ou entregar uma proteína Cas ou Cas mRNA e qualquer um ou mais dos gRNAs divulgados no presente documento.

[00371] Em algumas modalidades, a invenção compreende um método ou uso para a modulação de um gene-alvo que compreende administrar ou entregar uma proteína Cas ou Cas mRNA e qualquer um ou mais dos gRNAs divulgados no presente documento. Em algumas modalidades, a modulação está editando o gene-alvo. Em algumas modalidades, a modulação é uma alteração na expressão da proteína codificada pelo gene-alvo.

[00372] Em algumas modalidades, o método ou uso resulta na edição genética. Em algumas modalidades, o método ou uso resulta em uma quebra de duplo filamento dentro do gene-alvo. Em algumas modalidades, o método ou uso resulta na formação de mutações de indel

durante a junção de extremidade não homóloga do DSB. Em algumas modalidades, o método ou uso resulta em uma inserção ou deleção de nucleotídeos em um gene-alvo. Em algumas modalidades, a inserção ou deleção de nucleotídeos em um gene-alvo conduz a uma mutação de deslocamento de enquadramento ou códon de paragem prematura que resulta em uma proteína não funcional. Em algumas modalidades, a inserção ou deleção de nucleotídeos em um gene-alvo conduz a uma neutralização ou eliminação da expressão do gene-alvo. Em algumas modalidades, o método ou uso compreende reparação dirigida por homologia de um DSB. Em algumas modalidades, o método ou uso adicionalmente compreende a entrega à célula de um molde, em que pelo menos uma parte do modelo incorpora-se em um DNA alvo em ou próximo a um sítio de quebra de duplo filamento induzido pela proteína Cas.

[00373] Em algumas modalidades, o método ou uso resulta em modulação genética. Em algumas modalidades, a modulação genética é um aumento ou diminuição na expressão genética, uma alteração no estado de metilação do DNA ou modificação de uma subunidade das histonas. Em algumas modalidades, o método ou uso resulta em expressão aumentada ou diminuída da proteína codificada pelo gene-alvo.

[00374] Em algumas modalidades, qualquer um dos gRNAs divulgados no presente documento pode ser útil na preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio.

A. Medidas de Modulação Genética

[00375] A eficácia dos gRNAs modificados pode ser testada in vitro e in vivo. Em algumas modalidades, a invenção compreende um ou mais dos gRNAs aqui divulgados, em que o gRNA resulta em modulação genética quando fornecido a uma célula em conjunto com Cas9. Em algumas modalidades, a eficácia do gRNA pode ser medida em

ensaios in vitro ou in vivo.

1. Medição in vitro da eficácia de Cas

[00376] Em algumas modalidades, a atividade de uma Cas RNP que compreende um sgRNA modificado é comparada com a atividade de uma Cas RNP que compreende um sgRNA não modificado.

[00377] Em algumas modalidades, a atividade de uma Cas RNP que compreende um dgRNA que compreende um trRNA modificado é comparada com a atividade de uma Cas RNP que compreende um dgRNA que compreende um trRNA não modificado.

[00378] Em algumas modalidades, a atividade de uma Cas RNP que compreende um dgRNA que compreende um crRNA modificado é comparada com a atividade de uma Cas RNP que compreende um dgRNA que compreende um crRNA não modificado.

[00379] Em algumas modalidades, a atividade de uma Cas RNP que compreende um dgRNA que compreende um crRNA modificado e um trRNA modificado é comparada com a atividade de uma Cas RNP que compreende um crRNA não modificado e um trRNA não modificado.

[00380] Em algumas modalidades, a eficiência de um gRNA no aumento ou diminuição da expressão da proteína alvo é determinada medindo a quantidade de proteína alvo. Em algumas modalidades, a invenção compreende qualquer um dos gRNAs aqui descritos, em que o gRNA aumenta ou diminui a quantidade de proteína produzida a partir do gene-alvo. Em algumas modalidades, a invenção compreende um método de modulação da expressão de proteína que compreende a administração de qualquer um dos gRNA aqui divulgados a um objeto, em que o gRNA dirige Cas9 para o gene que codifica a proteína alvo, e a expressão de proteína alvo é aumentada ou diminuída em comparação com um controle de gRNA que não tem como alvo Cas9 para esse gene.

[00381] Em algumas modalidades, a eficiência de edição com gRNAs específicos é determinada pela edição presente no local de destino no genoma após a entrega de Cas9 e o gRNA (sgRNA ou dgRNA que compreende um crRNA e trRNA). Em algumas modalidades, a eficiência de edição com gRNAs específicos é medida por sequenciamento de próxima geração. Em algumas modalidades, a percentagem de edição da região-alvo de interesse é determinada. Em algumas modalidades, o número total de leituras de sequências com inserções ou eliminações de nucleotídeos na região-alvo de interesse em relação ao número total de leituras de sequência é medido após a entrega de um gRNA e Cas9. Em algumas modalidades, a invenção compreende um método para aumentar a eficiência da edição genética que compreende, administrar ou entregar qualquer um dos gRNAs modificados aqui descritos a uma célula, em que a porcentagem de edição genética é aumentada em comparação com um controle de gRNA que não é similarmente modificado.

[00382] Em algumas modalidades, a eficiência de edição com gRNAs específicos é medida pela presença de inserções ou deleções de nucleotídeos introduzidos pela edição genética bem-sucedida. Em algumas modalidades, a invenção compreende um método para criar inserções ou deleções de nucleotídeos em genes que compreende, administrar ou entregar qualquer um dos gRNAs modificados aqui descritos a uma célula, em que os nucleotídeos são inseridos ou eliminados em comparação com um gRNA de controle que é não similarmente modificado. Em algumas modalidades, a atividade de uma Cas9 e gRNAs é testada em ensaios bioquímicos. Em algumas modalidades, a atividade de uma Cas9 e gRNAs é testada em um ensaio de clivagem livre de células. Em algumas modalidades, a atividade de uma Cas9 e gRNAs é testada em células Neuro2A.

[00383] Em algumas modalidades, Cas 9 e sgRNA ou dgRNA que

compreende crRNA e/ou trRNA modificado mostra atividade similar, maior ou reduzida em comparação com sgRNA ou dgRNA não modificados que compreende crRNA e trRNA não modificados. Em algumas modalidades, Cas9 e sgRNA ou dgRNA modificados que compreendem crRNA e/ou trRNA modificados apresentam atividade aumentada em comparação com o sgRNA ou dgRNA não modificados que compreende crRNA e trRNA não modificados.

2. Medição in vivo da eficácia de Cas

[00384] Em algumas modalidades, a atividade de gRNAs modificados é medida após a dosagem in vivo de LNPs que compreende gRNAs modificados e proteína Cas ou mRNA codificando a proteína Cas.

[00385] Em algumas modalidades, a eficácia in vivo de um gRNA ou composição aqui fornecida é determinada pela edição de eficácia medida em DNA extraído do tecido (por exemplo, tecido do fígado) após a administração de gRNA e Cas9.

3. Medição in vivo da ativação do sistema imunológico

[00386] Modificações ao gRNA, como aqui divulgadas, podem reduzir a resposta imune do indivíduo à dosagem in vivo de gRNAs. Em algumas modalidades, a ativação da resposta imune do objeto é medida por concentrações no soro de citocina (s) a seguir a dosagem in vivo de sgRNA ou dgRNA que compreende trRNA e crRNA juntamente com mRNA ou proteína Cas9 (por exemplo, formulado em uma LNP). Em algumas modalidades, a citocina é interferon-alfa (IFN-alfa), interleucina 6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e/ou fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa). Em algumas modalidades, a invenção compreende um método de redução da resposta imune de um objeto à entrega de um gRNA que compreende, administrar qualquer um dos gRNAs aqui divulgados, em que o gRNA produz uma resposta reduzida pelo sistema imunológico do objeto após a adminis-

tração. Em algumas modalidades, a invenção compreende um método de redução da ativação do sistema imune do objeto após administração em comparação com um gRNA de controle que não é modificado de modo semelhante.

[00387] Em algumas modalidades, a administração de Cas RNP ou Cas9 mRNA juntamente com o gRNA modificado (por exemplo, sgRNA ou dgRNA) produz concentrações séricas mais baixas de citocinas imunes em comparação com a administração de sgRNA não modificado. Em algumas modalidades, a invenção compreende um método de redução da concentração de citocinas imunes de um objeto que compreende, administrar qualquer um dos gRNAs aqui divulgados, em que o gRNA produz uma concentração mais baixa de citocinas imunes no soro de um objeto em comparação com um gRNA de controle que não é modificado de forma semelhante.

[00388] Esta descrição e modalidades exemplares não devem ser consideradas limitativas. Para os propósitos desta especificação e reivindicações anexas, salvo indicação em contrário, todos os números expressando quantidades, porcentagens ou proporções, e outros valores numéricos usados na especificação e reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados em todas as instâncias pelo termo "cerca de", na medida em que eles já não são tão modificados. Consequentemente, a menos que indicado em contrário, os parâmetros numéricos apresentados na seguinte descrição e reivindicações anexas são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas que se pretende obter. No mínimo, e não como uma tentativa de limitar a aplicação da doutrina dos equivalentes ao escopo das reivindicações, cada parâmetro numérico deve pelo menos ser interpretado à luz do número de dígitos significativos relatados e pela aplicação de técnicas comuns de arredondamento.

[00389] Nota-se que, tal como utilizado nesta especificação e nas

reivindicações anexas, as formas singulares "um/uma", e "o/a", e qualquer uso singular de qualquer palavra, incluem referências plurais a menos que expressamente e inequivocamente limitadas para um referente. Como aqui utilizado, o termo "incluir" e as suas variantes gramaticais pretendem ser não limitativas, de tal modo que a recitação de itens em uma lista não seja à exclusão de outros itens semelhantes que possam ser substituídos ou adicionados aos itens listados.

EXEMPLOS

[00390] Os exemplos seguintes são fornecidos para ilustrar certas modalidades divulgadas e não devem ser interpretados como limitando o âmbito desta divulgação de qualquer forma.

Exemplo 1 - Materiais e Métodos

A. RNA guia sintético (gRNA)

[00391] O gRNA em ambos os formatos dual (dgRNA, isto é, crRNA e trRNA) e guia único (sgRNA) foram sintetizados quimicamente por vendedores comerciais com nucleotídeos e ligações modificados, conforme fornecido na Tabela 4.

B. Transcrição in vitro ("IVT") de Cas9 mRNA

[00392] O Cas9 mRNA encapsulado e poliadenilado contendo N1-metil pseudo-U foi gerado por transcrição in vitro usando um molde de DNA de plasmídeo linearizado e RNA polimerase de T7. O DNA de plasmídeo contendo um promotor de T7 e uma região de 100 nucleotídeos (nt) poli (A/T) foi linearizado por XbaI e obtido de um fabricante comercial. A reação de IVT para gerar mRNA modificado com Cas9 foi incubada a 37 °C durante 4 horas nas seguintes condições: 50 ng/μL de plasmídeo linearizado; 2 mM de cada um de GTP, ATP, CTP e N1-metil pseudo-UTP (Trilink); ARCA 10 mM (Trilink); Polimerase de 5 U/μL de T7 RNA (NEB); 1 U/μL de inibidor da RNAase de Murino (NEB); 0,004 U/μL de pirofosfatase de *E. coli* inorgânica (NEB); e 1x tampão de reação. Após 4 h de incubação, adicionou-se TURBO

DNase (ThermoFisher) a uma concentração final de 0,01 U/ μ L e a reação foi incubada durante mais 30 minutos para remover o molde de DNA. O Cas9 mRNA foi purificado a partir de enzima e nucleotídeos usando protocolos padrão, incluindo colunas de ligação de sílica, como um kit de limpeza de transcrição MegaClear (ThermoFisher) ou etapas de precipitação usando LiCl seguido por EtOH com NaOAc. A concentração da transcrição foi determinada medindo a absorbância da luz a 260 nm (Nanodrop) e o transcrito foi analisado por eletroforese capilar por Bioanalyzer (Agilent).

C. transfecções de mRNA e gRNA Cas9 em células Neuro2A

[00393] A linhagem celular de camundongo Neuro2A foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e plaqueada a uma densidade de 15.000 células / poço em uma placa de 96 poços 24 horas antes da transfecção. No dia da transfecção, o meio foi aspirado das células e substituído por meio fresco. A lipofectamina-2000 (Invitrogen) foi diluída 1:50 (v/v) em Opti-MEM (Invitrogen). mRNA Cas9 e o RNA guia único foram diluídos separadamente em Opti-MEM. Para o formato de dupla guia, crRNA e trRNA foram diluídos em conjunto na razão molar 1:1 em Opti-MEM. Ambos Cas9 mRNA e gRNA foram misturados separadamente 1:1 (v/v) com Lipofectamina-2000 diluída, produzindo dois lipoplexos. Após 5 minutos de incubação, lipoplexos foram adicionados em sucessão às células, para uma concentração final de 100 ng de Cas9 mRNA/poço e 0,4 μ L de reagente de lipofecção total. Guias foram testadas em dois níveis de dose para cada experiência, incluindo 25 nM e 2,5 nM, 16,7 nM e 1,67 nM, 10 nM e 1 nM, 8,3 nM e 0,83 nM, e 3 nM e 0,3 nM. Para guia dual, esta concentração inclui quantidades equimolares de crRNA e trRNA, tal que, por exemplo, 25 nM de crRNA e 25 nM de trRNA produzem 25 nM de guia dual total. As células foram lisadas 24 horas após a transfecção e os lisados foram utilizados diretamente na reação de PCR

que foi analisada para edição por NGS.

Cas9 mRNA com 1xNLS (SEQ ID NO: 359):

GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUG
UGUGUCGUUGCAGGCCUUAUUCGGAUCCAUGGAUAAGAAGUAC
UCAAUCGGGCUGGAUAUCGGAACUAAUUCGUGGGUUGGGCAG
UGAUCACGGAUGAAUACAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAAGGUC
CUGGGGAACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAAUCUCAUCGG
AGCCCUGCUGUUUGACUCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGG
CUCAAACGUACCGCGAGGCGACGCUACACCCGGCGGAAGAAUC
GCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUCUUUUCGAACGAAUUGGCAAAG
GUCGACGACAGCUUCUUCACCGCCUGGAAGAAUCUUUCCUGG
UGGAGGAGGACAAGAAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAAA
CAUCGUCGACGAAGUGGCGUACCACGAAAAGUACCCGACCAUCU
ACCAUCUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUCAAACUGACAAGGCCGA
CCUCAGAUUGAUCUACUUGGCCUCGCCCAUAUGAUCAAUUC
GCGGACACUUCUGAUCGAAGGCGAUCUGAACCUGAUAAACUC
CGACGUGGAUAAGCUUUUCAUUAACUGGUGCAGACCUACAACC
AACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCAUAGCUAGCGGCGUCGAUGCC
AAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCGAAGUCGCGGCGCCUCG
AAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACUU
UUCGGCAACUUGAUCGCUCUCUCACUGGGACUCACUCCCAAUU
UCAAGUCCAAUUUUGACCUGGCCGAGGACGCGAAGCUGCAACU
CUCAAAGGACACCUACGACGACGACUUGGACAAUUUGCUGGCAC
AAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGUUCUUGCCGCUAAGAA
CCUUUCGGACGCAAUCUUGCUGUCCGAUAUCCUGCGCGUGAAC
ACCGAAUAACCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUCGAUGAUUAAGCG
GUACGACGAGCAUACACAGGAUCUCACGCUGCUCAAAGCGCUC
GUGAGACAGCAACUGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGA
CCAGUCCAAGAAUGGGUACGCAGGGUACAUCGAUGGAGGGCGCU
AGCCAGGAAGAGUUCUAUAAGUUCAUCAAGCCAAUCCUGGAAAA

GAUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGGGAG
GAUCUGCUCCGGAAACAGAGAACCUUUGACAACGGAUCCAUIUCC
CCACCAGAUCUUCUGGGUGAGCUGCACGCCAUUCUUGCGGGCGC
CAGGAGGACUUUUACCCAUIUCCUCAAGGACAACCGGGAAAAGAU
CGAGAAAAUUCUGACGUUCCGCAUCCCGUAUUACGUGGGCCCA
CUGGCGCGCGGCAAUUCGCGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAAU
CAGAGGAAACCAUCACUCCUUGGAAUUUCGAGGAAGUUGUGGA
UAAGGGAGCUUCGGGCACAAAGCUUCAUCGAACGAUGACCAACU
UCGACAAGAAUCUCCCAAACGAGAAGGUGCUUCCUAAGCACAGC
CUCCUUUACGAUACUUCACUGUCUACAACGAACUGACUAAAGU
GAAAUACGUUACUGAAGGAAUGAGGAAGCCGGCCUUUCUGUCC
GGAGAACAGAAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGCUGUUCAAGACCAA
CCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUUAAAGAGGACUACUUCAAGA
AGAUCGAGUGUUUCGACUCAGUGGAAAUCAGCGGGGUGGAGGA
CAGAUUCAACGCUUCGCUUGGGAACCUAUC AUGAUCUCCUGAAGA
UCAUCAAGGACAAGGACUUCUUGACAACGAGGAGAACGAGGAC
AUCCUGGAAGAUUUCGUCCUGACCUUGACCCUUUUCGAGGAUC
GCGAGAUGAUCGAGGAGAGGCUUAAGACCUACGCUCAUCUCUU
CGACGAUAAGGUCAUGAAACAACUCAAGCGCCGCCGGUACACUG
GUUGGGGCGCCUCUCCCGCAAGCUGAUAACGGUAUUCGCGA
UAAACAGAGCGGUAAAACUAUCCUGGAUUUCCUCAAUUCGGAUG
GCUUCGCUAAUCGUAACUUCAUGCAAUUGAUCCACGACGACAGC
CUGACCUUUUAAAGGAGGACAUCCAAAAAGCACAAGUGUCCGGACA
GGGAGACUCACUCCAUGAACACAUCGCGAAUCUGGCGCGGUUCG
CCGGCGAUUAAGAAGGGAAUUCUGCAAACUGUGAAGGUGGUCG
ACGAGCUGGUGAAGGUCAUGGGACGGCACAAACCGGAGAAUUAU
CGUGAUUGAAAUGGCCCGAGAAAACCAGACUACCCAGAAGGGCC
AGAAAAACUCCCGCGAAAGGAUGAAGCGGAUCGAAGAAGGAUUC
AAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCUUGAAAGAGCACCCGGUGGAAA
ACACGCAGCUGCAGAACGAGAAGCUCUACCUGUACUAAUUGCAA

AAUGGACGGGACAUGUACGUGGACCAAGAGCUGGACAUCAUUC
GGUUGUCUGAUUACGACGUGGACCACAUCGUUCCACAGUCCUU
UCUGAAGGAUGACUCGAUCGAUAACAAGGUGUUGACUCGCAGC
GACAAGAACAGAGGGAAGUCAGAUAAUGUGCCAUCGGAGGAGG
UCGUGAAGAAGAUGAAGAAUACUGGCGGCAGCUCCUGAAUGC
GAAGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUUGACAAUCUCACUAAAGCCG
AGCGCGGCGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUGGAUUCAUCAA
ACGGCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCG
CAGAUCUUGGACUCCCGCAUGAACACUAAAUACGACGAGAACGA
UAAGCUCAUCCGGGAAGUGAAGGUGAUUACCCUGAAAAGCAAAC
UUGUGUCGGACUUUCGGAAGGACUUUCAGUUUUACAAAGUGAG
AGAAAUCAACAACUACCAUCACGCGCAUGACGCAUACCUCAACG
CUGUGGUCGGUACCGCCCUGAUCAAAAAGUACCCUAAACUUGAA
UCGGAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUGAGGA
AGAUGAUAGCCAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCG
AAAUACUUCUUUUACUCAACAUCAUGAACUUUUUCAAGACUGA
AAUUACGCUGGCCAAUGGAGAAAUCAGGAAGAGGCCACUGAUC
GAAACUAACGGAGAAACGGGCGAAAUCGUGUGGGACAAGGGCA
GGGACUUCGCAACUGUUCGCAAAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGU
CAAUAUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACCGGCGGAUUUUCAA
AGGAAUCGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAAGCGACAAGCUCAUUGCA
CGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAUU
CGCCGACUGUCGAUACUCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGA
GAAGGGAAAGAGCAAAAAGCUCAAAUCCGUCAAAGAGCUGCUGG
GGAUUACCAUCAUGGAACGAUCCUCGUUCGAGAAGAACCCGAUU
GAUUUCCUCGAGGCGAAGGGUUACAAGGAGGUGAAGAAGGAUC
UGAUCAUCAAACUCCCCAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAAAAU
GGUCGGAAGCGCAUGCUGGCUUCGGCCGGAGAACUCCAAAAAG
GAAUUGAGCUGGCCUUGCCUAGCAAGUACGUCAACUCCUCUA
UCUUGCUUCGCACUACGAAAAACUCAAGGGUCACCGGAAGAU

ACGAACAGAAGCAGCUUUUCGUGGAGCAGCACAAGCAUUAUCUG
GAUGAAAUCAUCGAACAAAUCUCCGAGUUUUCAAAGCGCGUGAU
CCUCGCCGACGCCAACCUCCGACAAAGUCCUGUCGGCCUACAAUA
AGCAUAGAGAUAAAGCCGAUCAGAGAACAGGCCGAGAACAUAUC
CACUUGUUCACCCUGACUAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUCA
AGUACUUCGAUACUACUAUCGAUCGCAAAGAUACACGUCCACC
AAGGAAGUUCUGGACGCGACCCUGAUCCACCAAAGCAUCACUG
GACUCUACGAAACUAGGAUCGAUCUGUCGCAGCUGGGUGGCGA
UGGCGGUGGAUCUCCGAAAAAGAAGAGAAAGGUGUAAUGAGCU
AGCCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGA
GAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCAUCUCUUUUUCUUUU
UCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUC
UUUAAUCAUUUUUGCCUCUUUUUCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAA
AUGGAAAGAACCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG

Cas9 mRNA com 2xNLS e marcador HA (SEQ ID NO: 360):

GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUG
UGUGUCGUUGCAGGCCUUAUUCGGAUCCAUGGAUAAGAAGUAC
UCAUUCGGGCUGGAUAUCGGAACUAAUUCGUGGGUUGGGCAG
UGAUCACGGAUGAAUACAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAAGGUC
CUGGGGAACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAUCUCAUCGG
AGCCCUGCUGUUUGACUCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGG
CUCAAACGUACCGCGAGGCGACGCUACACCCGGCGGAAGAAUC
GCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUCUUUUCGAACGAAUUGGCAAAG
GUCGACGACAGCUUCUUCACCGCCUGGAAGAAUCUUUCCUGG
UGGAGGAGGACAAGAAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAAA
CAUCGUCGACGAAGUGGCGUACCACGAAAAGUACCCGACCAUCU
ACCAUCUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUACUGACAAGGCCGA
CCUCAGAUUGAUCUACUUGGCCCUCCGCAUAUGAUCAAUUC

GCGGACACUUCCUGAUCGAAGGCGAUCUGAACCCUGAUAAACUC
CGACGUGGAUAAGCUUUUCAUUAACUGGUGCAGACCUACAACC
AACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCAAUAGCUAGCGGGCGUCGAUGCC
AAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCGAAGUCGCGGGCGCCUCG
AAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACUU
UUCGGCAACUUGAUCGCUCUCUCACUGGGACUCACUCCCAAUU
UCAAGUCCAAUUUUGACCUGGCCGAGGACGCGAAGCUGCAACU
CUCAAAGGACACCUACGACGACGACUUGGACAAUUUGCUGGCAC
AAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGUUCUUGCCGCUAAGAA
CCUUUCGGACGCAAUCUUGCUGUCCGAUAUCCUGCGCGUGAAC
ACCGAAUAACCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUCGAUGAUUAAGCG
GUACGACGAGCAUCACCAGGAUCUCACGCUGCUCUCAAAGCGCUC
GUGAGACAGCAACUGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGA
CCAGUCCAAGAAUGGGUACGCAGGGUACAUCGAUGGAGGCGCU
AGCCAGGAAGAGUUCUAUAAGUUCAUCAAGCCAAUCCUGGAAAA
GAUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGGGAG
GAUCUGCUCCGGAAACAGAGAACCUUUGACAACGGAUCCAUUCC
CCACCAGAUCCAUCUGGGUGAGCUGCACGCCAUUCUUGCGGCGC
CAGGAGGACUUUUACCCAUUCCUCAAGGACAACCGGGAAAAGAU
CGAGAAAAUUCUGACGUUCCGCAUCCCGUAUUACGUGGGCCCA
CUGGCGCGCGGCAAUUCGCGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAAU
CAGAGGAAACCAUCACUCCUUGGAAUUUCGAGGAAGUUGUGGA
UAAGGGAGCUUCGGCACAAAGCUUCAUCGAACGAUGACCAACU
UCGACAAGAAUCUCCCAAACGAGAAGGUGCUUCCUAAGCACAGC
CUCCUUUACGAUACUUCACUGUCUACAACGAACUGACUAAAGU
GAAAUACGUUACUGAAGGAAUGAGGAAGCCGGCCUUUCUGUCC
GGAGAACAGAAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGCUGUUCAAGACCAA
CCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUUAAAGAGGACUACUUCAAGA
AGAUCGAGUGUUUCGACUCAGUGGAAAUCAGCGGGGUGGAGGA
CAGAUUCAACGCUUCGCUGGGAACCUAUCAUGAUCUCCUGAAGA

UCAUCAAGGACAAGGACUUCCUUGACAACGAGGAGAACGAGGAC
AUCCUGGAAGAUUUCGUCCUGACCUUGACCCUUUUCGAGGAUC
GCGAGAUGAUCGAGGAGAGGCUUAAGACCUACGCUCAUCUCUU
CGACGAUAAGGUCAUGAAACAACUCAAGCGCCGCCGGUACACUG
GUUGGGGCGCCUCUCCCGCAAGCUGAUAACGGUAUUCGCGA
UAAACAGAGCGGUAAAACUAUCCUGGAUUUCCUCAAUUCGGAUG
GCUUCGCUAAUCGUAACUUCAUGCAAUUGAUCCACGACGACAGC
CUGACCUUUUAAAGGAGGACAUCCAAAAAGCACAAGUGUCCGGACA
GGGAGACUCACUCCAUGAACACAUCGCGAAUCUGGCCGGUUCG
CCGGCGAUUAAGAAGGGAAUUCUGCAAACUGUGAAGGUGGUCG
ACGAGCUGGUGAAGGUCAUGGGACGGCACAAACCGGAGAAUUAU
CGUGAUUGAAAUGGCCCGAGAAAACCAGACUACCCAGAAGGGCC
AGAAAAACUCCCGCGAAAGGAUGAAGCGGAUCGAAGAAGGAUUC
AAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCUGAAAGAGCACCCGGUGGAAA
ACACGCAGCUGCAGAACGAGAAGCUCUACCUGUACUAAUUGCAA
AAUGGACGGGACAUGUACGUGGACCAAGAGCUGGACAUCAUUC
GGUUGUCUGAUUACGACGUGGACCACAUCGUUCCACAGUCCUU
UCUGAAGGAUGACUCGAUCGAUAACAAGGUGUUGACUCGCAGC
GACAAGAACAGAGGGAAGUCAGAUAAUGUGCCAUCGGAGGAGG
UCGUGAAGAAGAUGAAGAAUACUGGCGGCAGCUCCUGAAUGC
GAAGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUUGACAAUCUCACUAAAGCCG
AGCGCGGCGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUGGAUUCAUCAA
ACGGCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCG
CAGAUCUUGGACUCCCGCAUGAACACUAAAUACGACGAGAACGA
UAAGCUCAUCCGGGAAGUGAAGGUGAUUACCCUGAAAAGCAAAC
UUGUGUCGGACUUUCGGAAGGACUUUCAGUUUUACAAAGUGAG
AGAAAUCAACAACUACCAUCACGCGCAUGACGCAUACCUCAACG
CUGUGGUCGGUACCGCCCUGAUCAAAAAGUACCCUAAACUUGAA
UCGGAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUGAGGA
AGAUGAUAGCCAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCG

AAAUACUUCUUUUACUCAAAUCAUGAACUUUUUCAAGACUGA
AAUUACGCUGGCCAAUGGAGAAAUCAGGAAGAGGCCACUGAUC
GAAACUAACGGAGAAACGGGCGAAAUCGUGUGGGACAAGGGCA
GGGACUUCGCAACUGUUCGCAAAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGU
CAAUAUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACCGGCGGAUUUUCAA
AGGAAUCGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAAGCGACAAGCUCAUUGCA
CGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAUU
CGCCGACUGUCGCAUACUCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGA
GAAGGGAAAGAGCAAAAAGCUCAAAUCCGUCAAAGAGCUGCUGG
GGAUUACCAUCAUGGAACGAUCCUCGUUCGAGAAGAACCCGAUU
GAUUUCCUCGAGGCGAAGGGUUACAAGGAGGUGAAGAAGGAUC
UGAUCAUCAAACUCCCCAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAAAAU
GGUCGGAAGCGCAUGCUGGCUUCGGCCGGAGAACUCCAAAAAG
GAAUUGAGCUGGCCUUGCCUAGCAAGUACGUCAACUCCUCUA
UCUUGCUUCGCACUACGAAAAACUCAAGGGUCACCGGAAGAU
ACGAACAGAAGCAGCUUUUCGUGGAGCAGCACAAGCAUUAUCUG
GAUGAAAUCAUCGAACAAAUCUCCGAGUUUUCAAAGCGCGUGAU
CCUCGCCGACGCCAACCUCCGACAAAGUCCUGUCGGCCUACAAUA
AGCAUAGAGAUAAAGCCGAUCAGAGAACAGGCCGAGAACAUUAUC
CACUUGUUCACCCUGACUAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUCA
AGUACUUCGAUACUACUAUCGAUCGCAAAAGAUACACGUCCACC
AAGGAAGUUCUGGACGCGACCCUGAUCCACCAAAGCAUCACUG
GACUCUACGAAACUAGGAUCGAUCUGUCGCAGCUGGGUGGCGA
UGGCUCGGCUUACCCAUACGACGUGCCUGACUACGCCUCGCUC
GGAUCGGGCUCCCCCAAAGAAACGGAAGGUGGACGGAUCCC
CGAAAAAGAAGAGAAAGGUGGACUCCGGAUGAGAAUUAUGCAGU
CUAGCCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAA
GAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCAUUCUUUUUCUU
UUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUU
UCUUUAAUCAUUUUUGCCUCUUUUUCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAA

AAAUGGAAAGAACCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG

D. hepatócitos hepáticos primários

[00394] Hepatócitos primários de fígado de camundongo (PMH) (Gibco) foram cultivados de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen, protocolo 11.28.2012). Resumidamente, as células foram descongeladas e ressuspensas em meio de descongelação de hepatócitos com suplementos (Gibco, Cat. CM7000) seguindo-se centrifugação a 100 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células peletizadas ressuspensas em meio de revestimento de hepatócitos mais pacote de suplemento (Invitrogen, Cat. A1217601 e CM3000). As células foram contadas e plaqueadas em placas de 96 poços revestidas com colágeno Bio-coat I (ThermoFisher, Cat. 877272) a uma densidade de 15.000 células / poço e incubadas durante 5 horas a 37°C e 5% de atmosfera de CO₂ para permitir a formação de monocamada. Após 5 horas, o meio de plaqueamento foi removido e substituído por meio de cultura de hepatócito suplementado (Invitrogen, Cat. A1217601 e CM4000) contendo mRNA Cas9 formulada com LNP e RNA guia mais soro de camundongo a 3%. As LNPs foram diluídas a partir de um nível de dose inicial de 100 ng de mRNA Cas9 e aproximadamente 30 nM de RNA guia por poço, realizando diluições em série até 0,1 ng de mRNA e 0,03 nM de guia por poço. As células foram incubadas durante aproximadamente 48 horas a 37 e 5% de atmosfera de CO₂ antes da lise celular e análise NGS como aqui descrito.

E. Formulação de nanopartículas de lipídios ("LNP")

[00395] As LNPs foram formuladas com uma razão molar de amina lipídica catiônica para fosfato de RNA (N:P) de cerca de 4,5. Os componentes das nanopartículas lipídicas foram dissolvidos em etanol a 100% com as seguintes razões molares: lipídio catiônico a 45% molar

(12,7 mM) (por exemplo, octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octilóxi)butanoil)óxi)-2-(((3-(dietilamino)propóxi)carbonil)óxi)metil)propila, também denominado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octilóxi)butanoil)óxi)-2-(((3-(dietilamino)propóxi)carbonil)óxi)metil)propila; 44 % em mol (12,4 mM) de lipídio auxiliar (por exemplo, colesterol); 9 % em mol de lipídio neutro (2,53 mM) (por exemplo, DSPC); e 2% em mol (0,673 mM) de PEG (por exemplo, PEG2k-DMG). A carga de RNA foi preparada em 25 mM de tampão de acetato de sódio, pH 4,5, resultando em uma concentração de carga de RNA de aproximadamente 0,45 mg/mL.

[00396] As LNPs foram formadas por mistura microfluídica das soluções de lipídios e RNA usando um instrumento Precision Nanosystems NanoAssemblr™ Benchtop, de acordo com o protocolo do fabricante. Manteve-se uma razão de 2:1 de solvente aquoso para orgânico durante a mistura, utilizando taxas de fluxo diferenciais.

[00397] Procedimento de Formulação de LNP A: Após mistura, as LNPs foram coletadas, diluídas em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS, aproximadamente 1:1), e depois o tampão restante foi trocado para PBS (100 vezes o excesso do volume da amostra), durante a noite a 4 °C, sob agitação suave, utilizando um cassete de diálise Slide-a-Lyzer™ G2 de 10 kDa (ThermoFisher Scientific). As LNPs foram concentradas usando filtro de spin Amicon de 10 kDa (centrifugação a 4000g a 4 °C) para alcançar a concentração desejada. A mistura resultante foi então filtrada usando um filtro estéril de 0,2 µm. O filtrado resultante foi armazenado a 2-8 °C.

[00398] Procedimento de Formulação de LNP B: Após mistura, as LNPs foram coletadas, diluídas em 50 mM de Tris a pH 7,5 (aproximadamente 1:1), e depois as LNPs foram trocadas para 50 mM de Tris a pH 7,5 (excesso de 100 vezes do volume da amostra), de um dia para o outro a 4 sob agitação suave utilizando um cassete de diálise Slide-

a-Lyzer™ G2 de 10 kDa (ThermoFisher Scientific). As LNPs foram concentradas usando filtro de spin Amicon de 10 kDa (centrifugação a 4000g a 4 °C) para atingir o dobro da concentração desejada. Estas LNPs concentradas foram misturadas 1:1 com 50 mM de Tris, 90 mM de NaCl, 10% de sacarose a pH 7,5 (2X TSS). A mistura resultante foi então filtrada usando um filtro estéril de 0,2 µm. O filtrado resultante foi armazenado a -80 °C.

[00399] Procedimento de Formulação de LNP C: A carga de RNA foi preparada em 25 mM de citrato de sódio, 100 mM de cloreto de sódio a pH 5 resultando em uma concentração de carga de RNA de aproximadamente 0,45 mg/mL. Após a mistura, as LNPs foram coletadas em água na razão de 3:1. As LNPs foram incubadas durante uma hora à temperatura ambiente e misturadas 1: 1 com água. Em seguida, elas foram trocadas por tampão em 1X TSS (50mM de Tris, 45mM de NaCl, 5% sacarose a pH 7,5) em colunas PD-10 (GE Healthcare), usando o protocolo do fabricante. As LNPs foram concentradas usando filtro de spin Amicon de 10 kDa (centrifugação a 4000g a 4 °C) para alcançar a concentração desejada. A mistura resultante foi então filtrada usando um filtro estéril de 0,2 µm. O filtrado resultante foi armazenado a -80 °C.

F. Sequenciamento de Próxima Geração ("NGS") e Análise para Eficiência de Clivagem no Alvo

[00400] Para determinar quantitativamente a eficiência de edição no local de destino no genoma, foi utilizado o sequenciamento profundo para identificar a presença de inserções e deleções introduzidas pela edição genética.

[00401] Os iniciadores de PCR foram desenhados em torno do local alvo (por exemplo, TTR, FVII) e a área genômica de interesse foi amplificada. Sequências de iniciadores são fornecidas abaixo na Tabela 5.

Tabela 5

Guia	Gene	Iniciador Direto (5'-3')	SEQ ID	Iniciador Reverso (5'-3')	SEQ ID
Para experimentos com guias baseados em domínios alvo CR000686/G000209	TTR	AGTCAATAAT CAGAATCAGC AGGT	333	AGAAGGCACTTC TTCTTTATCTAAG GT	337
Para experimentos com guias baseados em domínios alvo CR000705/G000211	TTR	GTTTTGTTCC AGAGTCTATC ACCG	334	ACACGAATAAGA GCAAATGGGAAC	338
Para experimentos com guias baseados em domínios alvo G000269/ G000285	TTR	ATTACCAGCT TAGCATCCTG TGAA	335	ACACGGTTTATA GAGCAAGAACAC	339
Para experimentos com guias baseados em domínios alvo CR000657/G000208	FVII	AGCACATGA GACCTTCTGT TTCTC	336	GACATAGGTGTG ACCCTCACAATC	340

[00402] PCR adicional foi realizada de acordo com os protocolos do fabricante (Illumina) para adicionar a química necessária ao sequenciamento. Os amplicons foram sequenciados em um instrumento Illumina MiSeq. As leituras foram alinhadas com o genoma de referência humano (por exemplo, hg38) após a eliminação daqueles com escores de baixa qualidade. Os arquivos resultantes contendo as leituras foram mapeados para o genoma de referência (arquivos BAM), onde leituras que sobrepujam à região de interesse foram selecionadas e o número de leituras de tipo selvagem versus o número de leituras que contêm uma inserção, substituição ou exclusão foi calculado.

[00403] A porcentagem de edição (por exemplo, a "eficiência de edição" ou "porcentagem de edição") é definida como o número total de leituras de sequência com inserções ou exclusões sobre o número total de leituras de sequência, incluindo o tipo selvagem.

G. Entrega de LNP in vivo

[00404] Foram utilizados camundongos fêmeas CD-1, variando en-

tre 6 a 10 semanas de idade em cada estudo. Os animais foram pesados e agrupados de acordo com o peso corporal para preparar soluções de dosagem com base no peso médio do grupo. As LNPs foram administradas através da veia lateral da cauda em um volume de 0,2 mL por animal (aproximadamente 10 mL por quilograma de peso corporal). Os animais foram observados aproximadamente 6 horas após a dose quanto a efeitos adversos. O peso corporal foi medido às 24 horas após a administração, e os animais foram eutanasiados em vários momentos por ex-sanguinação via punção cardíaca sob anestesia com isofluorano. O sangue foi coletado em tubos separadores de soro ou em tubos contendo citrato de sódio tamponado para plasma como aqui descrito. Para estudos envolvendo edição in vivo, o tecido hepático foi coletado do lobo mediano de cada animal para extração e análise de DNA.

H. Análise de indução de citocinas

[00405] Para esta análise, cerca de 50-100 µL de sangue foram coletados por veia da cauda para medições de citocinas séricas. Deixou-se o sangue coagular à temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas e depois centrifugou-se a 1000xg durante 10 minutos antes de recolher o soro. Um ensaio multiplex de esferas magnéticas baseado em Luminex (Affymetrix ProcartaPlus, número de catálogo Exp040-00000-801) medindo IL-6, TNF-alfa, IFN-alfa e MCP-1 foi utilizado para análise de citocinas em amostras coletadas. Os reagentes e padrões do kit foram preparados conforme indicado no protocolo do fabricante. Foram adicionados 25 µL de soro de camundongo aos poços contendo 25 µL das esferas magnéticas revestidas com o anticorpo diluído. A placa foi incubada durante 2 horas à temperatura ambiente e depois lavada. Anticorpo diluído de biotina (50 µL) foi adicionado às esferas e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. As esferas foram lavadas novamente antes da adição de 50 µL de estreptavi-

dina-PE diluída a cada poço, seguido de incubação por 30 minutos. As esferas foram lavadas novamente e depois suspensas em 100 mL de tampão de lavagem e lidas no instrumento Bio-Plex 200 (Bio-Rad). Os dados foram analisados utilizando o pacote de análise Bioplex Manager ver. 6.1 com concentrações de citocina calculadas a partir de uma curva padrão usando um ajuste de curva logística de cinco parâmetros.

I. Isolamento do DNA Genômico

[00406] Para os estudos in vivo, o DNA genômico foi extraído de 10 mg de tecido usando um kit de extração baseado em esferas, Kit de Amostras Múltiplas de DNA MagMAX-96 (ThermoFisher, Cat # 4413020) de acordo com o protocolo do fabricante, que inclui a homogeneização do tecido em tampão de lise (aproximadamente 400 μ L / 10 mg de tecido). Todas as amostras de DNA foram normalizadas para 100 ng/ μ L de concentração para PCR e posterior análise NGS, como descrito aqui.

J. Análise ELISA de J. Transtiretina (TTR)

[00407] O sangue foi coletado e o soro foi isolado como indicado. Os níveis séricos totais de TTR foram determinados utilizando um kit ELISA de Pré-albumina de camundongo (Transtirretina) (Aviva Systems Biology, Cat. OKIA00111). Os reagentes e padrões do kit foram preparados de acordo com o protocolo do fabricante. Diluiu-se o soro de camundongo até uma diluição final de 10 000 vezes com 1 x diluente de ensaio. Isto foi feito realizando duas diluições sequenciais de 50 vezes resultando numa diluição de 2500 vezes. Uma etapa final de diluição de 4 vezes foi realizada para uma diluição total da amostra de 10.000 vezes. Ambas as diluições da curva padrão (100 μ L cada) e amostras de soro diluídas foram adicionadas a cada poço da placa de ELISA pré-revestida com anticorpo de captura. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos antes da lavagem. Conju-

gado enzima-anticorpo (100 mL por poço) foi adicionado a uma incubação de 20 minutos. O conjugado de anticorpo não ligado foi removido e a placa foi lavada novamente antes da adição da solução de substrato cromogênico. A placa foi incubada durante 10 minutos antes da adição de 100 µL da solução de paragem, por exemplo, ácido sulfúrico (aproximadamente 0,3 M). A placa foi lida em um leitor de placas SpectraMax M5 com uma absorbância de 450 nm. Os níveis séricos de TTR foram calculados pelo software SoftMax Pro ver. 6.4.2 usando uma curva logística de quatro parâmetros fora da curva-padrão. Os valores séricos finais foram ajustados para a diluição do ensaio.

Exemplo 2. gRNA modificado por engenharia e teste in vitro

[00408] Os gRNAs modificados foram projetados no formato de dupla guia (dgRNA), como mostrado na Tabela 4. Consequentemente, ambos os crRNAs e trRNAs foram projetados e quimicamente sintetizados para permitir o emparelhamento de componentes modificados e não modificados formando dgRNA. Estes pares foram transfectados para células Neuro2A em concentrações como indicado nas figuras e a eficiência de edição (por exemplo, percentagem de edição) foi medida por NGS, como descrito no Exemplo 1.

[00409] Certos crRNAs modificados da Tabela 4 tendo como alvo o gene de TTR de camundongo foram transfectados com Cas9 mRNA e trRNA não modificado (TR000002). Guias testados incluíram SEQ ID Nos: 1-18. Como mostrado na Figura 1, alguns dos crRNAs modificados (juntamente com o trRNA não modificado) conferiram atividade similar ou aumentada em comparação com o controle não modificado, enquanto outros crRNAs modificados diminuíram a atividade.

[00410] Em paralelo, trRNAs modificados da Tabela 4 foram transfectados com Cas9 mRNA juntamente com um crRNA não modificado (CR000686) tendo como alvo a mesma sequência do gene de TTR de camundongo. Guias testados incluíram SEQ ID Nos: 188 - 200 e 204.

Como mostrado na Figura 2, muitos dos trRNAs modificados (juntamente com o crRNA não modificado) conferiram atividade similar ou aumentada em comparação com o controle não modificado, enquanto alguns dos trRNAs modificados diminuíram atividade.

[00411] Além de substituir nucleotídeos quimicamente modificados, alguns dos pares de crRNA e trRNA testados foram também manipulados com substituições de sequência, por exemplo, resultando em pares de G-C não encontrados nas sequências parentais. Guias testados incluíram SEQ ID Nos: 15 e 201; 16 e 202; 1 e 188. Como mostrado na Figura 3, um tal emparelhamento (SEQ ID Nos: 16 e 202) resultou em atividade semelhante ou aumentada em comparação com o controle não modificado, enquanto dois dos emparelhamentos diminuíram a atividade.

[00412] Em seguida, pares de crRNAs modificados e trRNAs modificados da Tabela 4 foram testados. Como mostrado na Figura 4, alguns dos emparelhamentos de crRNA modificado com trRNA modificado conferiram atividade semelhante ou aumentada em comparação com os controles não modificados, enquanto alguns dos pares diminuíram a atividade. Na Figura 4, os cabeçalhos das colunas descrevem diferentes trRNA usados no experimento, e os cabeçalhos das fileiras descrevem diferentes crRNA usados. Para determinar a combinação usada no experimento, basta corresponder coluna à fileira. TR000002 e CR000686 são os controles não modificados (vide as células inferiores direitas).

[00413] Com base nos desenhos de dgRNA, RNAs guias únicos correspondentes (sgRNAs) foram projetados com aspectos de alguns dos crRNAs e trRNAs modificados, conforme representado na Tabela 4 e na Figura 15D. Estes sgRNAs, SEQ ID Nos: 228 - 234, também foram testados em células Neuro2A e, como mostrado na Figura 5, cada um dos sgRNAs modificados apresentou atividades comparável

aos controles contendo apenas modificações nas extremidades 5' e 3' (G0000209; SEQ ID NO: 228).

[00414] Um conjunto similar de experimentos foi conduzido para guias adicionais de dgRNAs representados na Tabela 4 e na Figura 6. Guias testados incluíram SEQ ID Nos: 32-47, e 1. crRNAs modificados que também visaram ao gene de TTR de camundongo foram transfectados com Cas9 mRNA e trRNA não modificado (TR000002). Como mostrado na Figura 6, alguns dos crRNAs modificados (juntamente com o trRNA não modificado) conferiram atividade semelhante ou aumentada em comparação com o controle não modificado (CR000686), enquanto outros crRNAs modificados diminuíram a atividade.

[00415] Em paralelo, como mostrado na Figura 7, trRNAs modificados da Tabela 4 foram transfectados com Cas9 mRNA juntamente com um crRNA não modificado (CR000686) tendo como alvo a mesma sequência do gene de TTR de camundongo. Guias testados incluíram SEQ ID Nos: 205 - 222 e 1. Como mostrado na Figura 7, muitos dos trRNAs modificados (juntamente com o crRNA não modificado) conferiram atividade similar ou aumentada em comparação com o controle não modificado (TR000002), enquanto alguns dos trRNAs modificados diminuíram a atividade.

[00416] Além de substituir nucleotídeos quimicamente modificados, alguns dos pares de crRNA e trRNA testados da Tabela 4 também foram projetados com substituições de sequência, por exemplo, resultando em emparelhamentos de C-G ou incompatibilidades de G-U ("GU wobbles") não encontradas nas sequências parentais. Como mostrado na Figura 8, algumas das modificações e emparelhamentos conferiram atividade semelhante ou melhorada em comparação com o controle não modificado, enquanto algumas (por exemplo, "GU wobbles" ou emparelhamentos G-U) diminuíram a atividade. A Figura 8 mostra resultados utilizando guias de trRNA mostrados nas SEQ ID

Nos: 223-227 e 188 com guias de crRNA mostrados nas SEQ ID Nos: 48-52, e 1.

[00417] Em seguida, emparelhamentos selecionados dos crRNAs modificados e trRNAs modificados da Tabela 4 foram testados como mostrado na Figura 9. Alguns dos emparelhamentos de crRNA modificado com trRNA modificado conferiram atividade similar ou aumentada em comparação com os controles não modificados, enquanto alguns dos emparelhamentos diminuíram a atividade. Na Figura 9, os cabeçalhos das colunas descrevem diferentes trRNA usados no experimento, e os cabeçalhos das fileiras descrevem diferentes crRNA usados. Para determinar a combinação usada no experimento, basta corresponder a coluna à fileira. Controles não modificados são TR000002 e CR000686.

[00418] Alguns dos gRNAs modificados (dgRNAs e sgRNAs) da Tabela 4 também foram testados em um ensaio puramente bioquímico (ou seja, ensaio de clivagem livre de células). Curiosamente, muitos dos gRNAs modificados que eram em grande parte inativos nas células Neuro2A estavam ativos no ensaio bioquímico, indicando que tais ensaios bioquímicos podem não ser preditivos de atividade modificada de gRNA nas células (dados não mostrados).

Exemplo 3. Teste adicional de gRNAs modificados para outros alvos

[00419] Tendo estabelecido que certas modificações afetaram a atividade do gRNA, foi testado em seguida se essas modificações afetariam a atividade ao direcionar (1) uma sequência separada no mesmo gene ou (2) uma sequência em um gene diferente. Em conformidade, os gRNA dirigidos a outra sequência no gene de TTR de camundongo, assim como uma sequência no gene de Fator-VII (FVII) de camundongo, foram manipuladas e sintetizadas tendo determinados padrões de modificação testados no Exemplo 2 (vide Tabela 4). Estes

gRNAs foram transfectados em células Neuro2A nas concentrações indicadas nas figuras e a eficiência de edição (por exemplo, percentagem de edição) foi medida por NGS, como descrito no Exemplo 1.

[00420] crRNAs modificados da Tabela 4, tendo como alvo o gene de TTR de camundongo (sequência diferente do alvo no Exemplo 2) ou o gene de FVII de camundongo, foram transfectados com Cas9 mRNA e trRNA não modificado (TR000002). Os guias testados incluíam os mostrados nas Figuras 12A e 12B. Alguns dos crRNAs modificados (juntos com trRNA não modificado) conferiu atividade semelhante ou aumentada em comparação com os controles não modificados, enquanto outros crRNAs modificados diminuíram a atividade.

[00421] Em paralelo, trRNAs modificados da Tabela 4 foram transfectados com Cas9 mRNA juntamente com um crRNA não modificado tendo como alvo a mesma sequência do gene de TTR de camundongo (CR000705; sequência diferente como direcionada no Exemplo 2) ou a mesma sequência que o gene FVII de camundongo (CR000657). Como mostrado nas Figuras 13A e 13B, muitos dos trRNAs modificados (juntamente com os crRNAs não modificados) conferiram atividade similar ou aumentada em comparação com os controles não modificados, enquanto alguns dos trRNAs modificados diminuíram a atividade. Esses dados mostram que certos padrões de modificação tendem a ter efeitos semelhantes sobre as diferentes sequências.

[00422] Com base nos projetos de dgRNA descritos acima, RNAs guias únicos correspondentes (sgRNAs) foram projetados com aspectos de alguns dos crRNAs e trRNAs modificados. Vide, Tabela 4. Estes sgRNAs também foram testados em células Neuro2A. Os resultados são mostrados na Figura 10 (camundongo TTR) e na Figura 11 (camundongo FVII). Esses experimentos mostram que alguns padrões de modificação resultam em efeitos similares, mesmo quando se dirigem a genes diferentes.

Exemplo 4. Teste de gRNA modificado *in vivo*

[00423] Após o teste *in vitro*, sgRNAs modificados foram entregues aos animais em seis estudos separados, a fim de determinar se as modificações conferiram quaisquer benefícios para a edição *in vivo*.

[00424] LNPs foram formuladas com Cas9 mRNA IVT juntamente com sgRNA quimicamente modificado (tendo como alvo TTR ou FVII), como descrito no Exemplo 1. A razão de mRNA:sgRNA foi de aproximadamente 1:1, em peso dos componentes de RNA. Salvo indicação em contrário, o Cas9 mRNA utilizado nos estudos descritos neste exemplo tinha a sequência da SEQ ID NO: 360 e as LNPs foram formuladas utilizando o Procedimento de Formulação LNP descrito acima.

[00425] Em um experimento, camundongos (n = 5 por grupo) receberam uma dose única de LNP a 2 mg/kg e o sangue foi coletado quatro horas após a dose para análise de citocinas séricas. 7 dias após a dose na necropsia, fígados e sangue foram coletados para medições da eficiência de edição de NGS e análise da TTR sérica, respectivamente. Cada um dos sgRNAs nesta experiência teve como alvo a mesma sequência no gene de TTR, sendo a única diferença entre os sgRNAs as modificações feitas em cada (vide Figuras 14A-D e 15A-E; Tabela 4 SEQ ID Nos: 228 - 234). O G000209 (dois lotes testados) serviu como controle menos modificado, possuindo apenas modificações de 2'-O-metila e ligações de fosforotioato nos e entre os três nucleotídeos terminais nos terminais 5' e 3' do sgRNA, respectivamente. (Vide a Figura 15D).

[00426] Os resultados mostrados nas Figuras 14A-D mostram que os sgRNAs mais fortemente modificados tenderam a induzir menos de uma resposta para cada uma das citocinas analisadas, em comparação com os controles G000209 menos modificados. Os sgRNAs mais fortemente modificados também conferiram maior eficiência de edição

nos fígados dos animais tratados, com percentagem de edição chegando a ~ 60% para dois dos sgRNAs mais fortemente modificados (por exemplo, G000263 e G000267) em comparação com ~ 44-47% para os controles menos modificados (lotes G000209) (Figura 15A). Importante, as eficiências de edição correlacionadas com alterações fenotípicas como knockdown sérico de TTR foram comparáveis ou significativamente maiores do que os controles menos modificados (vide, por exemplo, os lotes G000263 e G000267 vs G000209 nas Figuras 15A-15B). As diferenças entre o G000209 modificado no final e o G000267 altamente modificado estão resumidas na Figura 15D e 15E (os nucleotídeos modificados com 2'-O-Me são apresentados a negrito e * representa ligações de fosforotioato).

[00427] Em outro estudo in vivo, três sgRNAs tendo como alvo uma sequência separada no gene de TTR de camundongo foram testados. Os camundongos (n = 5 por grupo) receberam uma dose única de LNP a 2 mg/kg, 1 mg/kg ou 0,3 mg/kg. O sangue foi coletado quatro horas após a dose para análise de citocinas séricas. 7 dias após a dose na necropsia, fígados e sangue foram coletados para medições da eficiência de edição de NGS e análise da TTR sérica, respectivamente. Neste estudo, cada um dos sgRNAs teve como alvo a mesma sequência no gene de TTR (uma sequência diferente daquela foi direcionada no estudo in vivo anterior) com um sgRNA sendo completamente não modificado (G000201 (SEQ ID NO: 243)), outro tendo apenas modificações de extremidade (G000211 (SEQ ID NO: 241)), com modificações de 2'-O-metil e ligações de fosforotioato nos e entre os três nucleotídeos terminais nos terminais 5' e 3' do sgRNA, respectivamente), e um terceiro sgRNA com o mesmo padrão de modificação que G000267 no estudo in vivo anterior (G000282 (SEQ ID NO: 242)).

[00428] Como mostrado nas Figuras 16A-16D, cada um dos sgRNAs resultou em respostas similares de uma maneira dependente da

dose para cada uma das citocinas testadas. Para a eficiência de edição, o sgRNA não modificado (G000201 (SEQ ID NO: 243)) conferiu pouca edição *in vivo*, enquanto o sgRNA altamente modificado (G000282 (SEQ ID NO: 242)) conferiu níveis que atingiram ~ 60% com uma dose de 2mg/kg, que foi significativamente maior do que os níveis alcançados com o sgRNA menos modificado (G000211 (SEQ ID NO: 241)) (Figura 17A e B). Como no estudo *in vivo* anterior, os níveis de edição se correlacionaram com a quantidade de knockdown de TTR sérico (Figura 17C e D).

[00429] Um estudo semelhante ao segundo estudo *in vivo* foi realizado com outro conjunto de três sgRNAs tendo como alvo ainda uma sequência diferente de TTR no gene de TTR de camundongo (tendo como alvo uma sequência diferente daquela direcionada nos dois estudos anteriores *in vivo*). Os camundongos (n = 5 por grupo) receberam uma dose única de LNP a 2 mg/kg, 1 mg/kg ou 0,3 mg/kg. O sangue foi coletado quatro horas após a dose para análise de citocinas séricas. 7 dias após a dose na necropsia, fígados e sangue foram coletados para medições da eficiência de edição de NGS e análise de TTR sérica, respectivamente. Neste estudo, cada um dos sgRNAs teve como alvo a mesma sequência no gene de TTR (uma sequência diferente da que foi alvo nos dois estudos *in vivo* anteriores) com um sgRNA completamente não modificado (G000285; SEQ ID NO: 332), outro tendo apenas modificações de extremidade (G000269 (SEQ ID NO: 330)), com modificações de 2'-O-metil e ligações de fosforotioato nos e entre os três nucleotídeos terminais nas extremidades 5' e 3' do sgRNA, respectivamente), e um terceiro sgRNA possuindo o mesmo padrão de modificação que G000267 e G000282 nos dois estudos *in vivo* anteriores (G000283 (SEQ ID NO: 331)).

[00430] No presente estudo, o sgRNA não modificado (G000285 (SEQ ID NO: 332)) conferiu pouca edição *in vivo*, enquanto o sgRNA

altamente modificado (G000283 (SEQ ID NO: 331)) conferiu níveis que atingiram ~ 60% com uma dose de 2 mg/kg, que foi significativamente maior do que os níveis alcançados com o sgRNA menos modificado (G000269 (SEQ ID NO: 330)) (Figuras 18A-18B). Como nos estudos anteriores *in vivo*, os níveis de edição se correlacionaram com a quantidade de knockdown de TTR sérico (Figura 18C).

[00431] Em um quarto estudo *in vivo*, os efeitos de modificações em gRNAs foram avaliados para outro gene (FVII). Para a comparação no estudo, dois dos sgRNAs testados no primeiro estudo *in vivo* foram incluídos (G000209 e G000267). Aos camundongos (n = 5 por grupo) foi administrada uma dose única de LNP a 2 mg/kg, 1 mg/kg ou 0,3 mg/kg e o sangue foi coletado quatro horas após a dose para análise de citocinas no soro. 6 dias após a dose na necropsia, os fígados foram coletados para medidas de eficiência de edição da NGS. Neste estudo, cada um dos sgRNAs teve como alvo a mesma sequência nos genes TTR ou FVII, com um sgRNA para cada um tendo apenas modificações de extremidade (G000208 (SEQ ID NO: 286)) para FVII, G000209 para TTR, ambos com modificações de 2'-O-metil e ligações de fosforotioato entre os três terminais nucleotídeos em ambas as extremidades 5' e 3' do sgRNA, respectivamente), e um segundo sgRNA com os mesmos padrões de modificação como G000267, G000282, e G000283 no estudos anterior *in vivo* (G000373 (SEQ ID NO: 287) para FVII; G000267 (SEQ ID NO: 234) para TTR).

[00432] Como mostrado nas Figuras 19A-19D, cada um dos sgRNAs resultou em respostas similares de uma maneira dependente da dose para cada uma das citocinas testadas. Para eficiência de edição, o sgRNA mais fortemente modificado tendo como alvo FVII (G000373 (SEQ ID NO: 287)) teve um aumento na eficiência de edição em comparação com a versão menos modificada (G000208 (SEQ ID NO: 286)) em cada uma das doses testadas (Figura 18A). Estes resultados

foram também observados para os gRNA dirigidos ao TTR (Figuras 20A-20B).

[00433] Em outro estudo *in vivo*, dez sgRNAs adicionais tendo como alvo a mesma sequência no gene de TTR de camundongo como G000282 foram testados. O G000282 também foi incluído no estudo para fins comparativos. Os camundongos (n = 5 por grupo) receberam uma dose única de LNP a 1 mg/kg ou 0,5 mg/kg. As LNPs utilizadas neste estudo foram formuladas utilizando o Procedimento de Formulação de LNP B descrito acima. Sete (7) dias após a dose na necropsia, fígados e sangue foram coletados para as medições da eficiência de edição de NGS e análise de TTR sérica, respectivamente. Neste estudo, cada um dos sgRNAs teve como alvo a mesma sequência no gene de TTR. O padrão de modificação de cada sgRNA testado variou e incluiu modificações de 2'-OMe, 2'-F e PS no terminal 5', terminal 3', grampo 1, grampo 2, nexa, haste inferior, protuberância e haste superior do sgRNA. Os resultados deste estudo são mostrados nas Figuras 22A-22C, incluindo % de edição (Figura 22A), edição média e desvio padrão (Figura 22B), e níveis séricos de TTR (Figura 22C). Estes mesmos sgRNAs foram testados em hepatócitos de camundongo primários, de acordo com os métodos aqui descritos. Os resultados deste estudo de edição de TTR de resposta à dose são mostrados nas Figuras 24A-24C, incluindo % de edição (Figura 24A), curvas de dose-resposta (Figura 24B) e valores de EC50 (Figura 24C).

[00434] Em outro estudo *in vivo*, treze sgRNAs tendo como alvo a mesma sequência no gene de TTR de camundongo como G000282 foram testados. O G000282 também foi incluído no estudo para fins comparativos. Os camundongos (n = 5 por grupo) receberam uma dose única de LNP a 1 mg/kg. As LNPs utilizadas neste estudo foram formuladas utilizando o Procedimento de Formulação de LNP C descrito acima. O Cas9 mRNA utilizado neste estudo teve a sequência de

SEQ ID NO: 359. O sangue foi coletado quatro horas após a dose para análise de citocinas no soro. 7 dias após a dose na necropsia, fígados e sangue foram coletados para medições da eficiência de edição de NGS e análise da TTR sérica, respectivamente. Neste estudo, cada um dos sgRNAs teve como alvo a mesma sequência no gene de TTR. Os sgRNAs testados incluem modificações adicionais de 2'-OMe e PS nos terminais 5', 3', grampo 1, grampo 2 e haste superior do sgRNA. Os resultados deste estudo são mostrados nas Figuras 23A-23C, incluindo % de edição (Figura 23A), % de edição média (Figura 23B) e níveis séricos de TTR (Figura 23C).

REIVINDICAÇÕES

1. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende uma modificação de extremidade 5' e uma ou mais modificações em um ou mais de:

- a. a região da haste superior;
- b. a região de grampo 1; e
- c. a região de grampo 2,

em que a modificação da extremidade 5' compreende pelo menos duas ligações de fosforotioato (PS) nos primeiros sete nucleotídeos na extremidade 5' da extremidade 5'.

2. RNA guia único de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-metil (2'-O-Me).

3. RNA guia único de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-fluoro (2'-F).

4. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma modificação compreende uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos.

5. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende uma ou mais modificações na região de haste superior.

6. RNA guia único de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que compreende modificações em US1 a US12.

7. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende uma ou mais modificações na região de grampo 1.

8. RNA guia único de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende uma modificação em

H1-1.

9. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende uma ou mais modificações na região de grampo 2.

10. RNA guia único de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende uma modificação em H2-1.

11. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende modificações em H1-1 a H1-12.

12. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende modificações em H2-1 a H2-15.

13. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende uma ou mais modificações em cada uma das regiões de haste superior, região de grampo 1 e região de grampo 2.

14. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende um nucleotídeo modificado entre as regiões de grampo 1 e de grampo 2.

15. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende uma região de haste inferior que compreende uma modificação.

16. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-15, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende uma região de terminal 3' que compreende uma modificação.

17. RNA guia único de acordo com a reivindicação 16, que adicionalmente compreende uma modificação de extremidade 3' no

terminal 3'.

18. RNA guia único de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que pelo menos dois dos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são modificados.

19. RNA guia único de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que pelo menos dois dos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são modificados com 2'-O-Me, 2'-F ou 2'-O-moe.

20. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-19, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende ligações de fosforotioato (PS) entre um ou mais dos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

21. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-20, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende uma região de protuberância que compreende uma modificação.

22. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-21, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende uma região denexo que compreende uma modificação.

23. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-22, caracterizado pelo fato de que pelo menos os primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os três nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são modificados.

24. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23, caracterizado pelo fato de que os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são ligados a ligações de fosforotioato (PS).

25. RNA guia único de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que as modificações de extremidade compre-

endem 2'-O-Me.

26. RNA guia único de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que as modificações de extremidade compreendem 2'-F.

27. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-26, caracterizado pelo fato de que os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são ligados com uma ligação de PS, e em que os primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos três nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' compreendem modificações de 2'-O-Me.

28. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-26, caracterizado pelo fato de que os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' são ligados com uma ligação de PS, e em que os primeiros três nucleotídeos no terminal 5' terminal e os últimos três nucleotídeos no terminal 3' compreendem modificações de 2'-O-Me, 2'-F e/ou 2'-O-moe.

29. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-28, caracterizado pelo fato de que LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e/ou LS12 são modificados com 2'-O-Me.

30. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-29, caracterizado pelo fato de que cada um dos nucleotídeos na região de protuberância é modificado com 2'-O-Me.

31. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-29, caracterizado pelo fato de que pelo menos 50% dos nucleotídeos na região de protuberância são modificados com 2'-O-Me.

32. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-31, caracterizado pelo fato de que cada um dos nucleotídeos na região de protuberância é modificado com 2'-O-Me.

tídeos na região de haste superior é modificado com 2'-O-Me.

33. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-32, caracterizado pelo fato de que N16, N17 e/ou N18 na região de nexo são modificados com 2'-O-Me.

34. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-32, caracterizado pelo fato de que N15, N16, N17 e/ou N18 na região de nexo são modificados.

35. RNA guia único de acordo com a reivindicação 33 ou reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que as modificações na região de nexo são selecionadas de 2'-O-Me e 2'F.

36. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 32-35, caracterizado pelo fato de que N16, N17 e N18 são ligados a ligações de PS.

37. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-36, caracterizado pelo fato de que cada um dos nucleotídeos na região de grampo 1 é modificado com 2'-O-Me.

38. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-37, caracterizado pelo fato de que cada um dos nucleotídeos na região de grampo 2 é modificado com 2'-O-Me.

39. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nas seguintes posições:

- a. os primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';
- b. LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e/ou LS12 na região de haste inferior;
- c. B1 e/ou B2 na região de protuberância;
- d. cada nucleotídeo na região de haste superior;
- e. N16, N17 e/ou N18 na região de nexo;
- f. cada nucleotídeo na região de grampo 1;

- g. cada nucleotídeo na região de grampo 2; e
- h. os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

40. RNA guia único de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que B3-B6 são modificados com 2'-O-Me.

41. RNA guia único de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

42. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que LS9 e LS10 são modificados, por exemplo, com 2'-F ou 2'-OMe.

43. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que N15, N16, N17 e N18 são modificados, por exemplo, com 2'-F ou 2'-OMe.

44. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 e H2-15 são modificados com 2'-F.

45. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o segundo ao último, o terceiro ao último e o quarto ao último nucleotídeos no terminal 3' são modificados com 2'-F.

46. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende nucleotídeos modificados com 2'-F nas seguintes posições:

- a. LS9 e LS10 na região de haste inferior;
- b. N15, N16, N17 e N18 na região de nexo; e
- c. H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 e H2-15 na região de grampo 2.

47. RNA guia único de acordo com a reivindicação 46, ca-

racterizado pelo fato de que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-F no penúltimo, terceiro ao último e quarto aos últimos nucleotídeos no terminal 3'.

48. RNA guia único de acordo com a reivindicação 46 ou reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

49. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 46-48, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5', e 2'-O-Me ou nucleotídeos modificados com 2'-F nos três dos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

50. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende:

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
- e
- e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

51. RNA guia único de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1 e/ou LS6.

52. RNA guia único de acordo com a reivindicação 50 ou reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que adicionalmente com-

preende um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2.

53. RNA guia único (sgRNA) que compreende:

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS1-LS6;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- e. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre o grampo 1 e o grampo 2;
- f. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
- e
- g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

54. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende:

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';
- b. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS2-LS5;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1 e LS6;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;
- f. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre o grampo 1 e o grampo 2;
- g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;
- e
- h. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

55. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5'; b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS7, LS8, LS11 e LS12;

d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;

e. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre o grampo 1 e o grampo 2;

f. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;

e

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

56. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';

b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS7, LS8, LS11 e LS12;

d. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS9 e LS10;

e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;

f. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre o grampo 1 e o grampo 2;

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;

e

h. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

57. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros

nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';

b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS8, LS10 e LS12;

d. nucleotídeos modificados com 2'-O-F em LS7, LS9 e LS11;

e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;

f. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre o grampo 1 e o grampo 2;

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;

e

h. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

58. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende:

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';

b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12

c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;

e. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre o grampo 1 e o grampo 2;

f. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;

e

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

59. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros

nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';

b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 e LS12;

c. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS9 e LS10;

d. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;

f. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre o grampo 1 e o grampo 2;

g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-15;

e

h. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

60. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';

b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;

c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-1 - H1-12;

d. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me entre Grampo 1 e Grampo 2;

e. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1 - H2-8;

f. nucleotídeos modificados com 2'-F em H2-9 - H2-15;

g. nucleotídeos modificados com 2'-F no segundo do último, terceiro do último e quarto do último nucleotídeo no terminal 3'; e

h. um nucleotídeo modificado com 2'-O-Me no último nucleotídeo na extremidade 3' do terminal 3'.

61. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende

a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';

- b. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em US1-US12;
- c. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10 e H1-12;
- d. nucleotídeos modificados com 2'-F em H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9 e H1-11;
- e. um nucleotídeo modificado com 2'-F entre o de grampo 1 e de grampo 2;
- f. nucleotídeos modificados com 2'-F em H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12; e H2-14;
- g. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11; H2-13 e H2-15;
- h. nucleotídeos modificados com 2'-F no segundo do último e quarto do último nucleotídeo no terminal 3'; e
- i. Nucleotídeo modificado com 2'-O-Me no terceiro e último nucleotídeo na extremidade 3' do terminal 3'.

62. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 50-61, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

63. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 50-61, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato (PS) dentro dos primeiros sete nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5'.

64. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende

- a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me LS8, LS10, LS12, H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10, H1-12, H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11, H2-13 e H2-15; e

b. nucleotídeos modificados com 2'-F em LS7, LS9, LS11; H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9, H1-11, H1-13, H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12 e H2-14.

65. RNA guia único de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

66. RNA guia único de acordo com a reivindicação 64 ou reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a. nucleotídeos modificados com 2'-O-Me no último e terceiro a último nucleotídeo na extremidade 3' do terminal 3'; e

b. nucleotídeos modificados com 2'-F no segundo ao último e no quarto ao último nucleotídeo na extremidade 3' do terminal 3'.

67. RNA guia único caracterizado pelo fato de que compreende qualquer uma das SEQ ID Nos: 228-332, incluindo as modificações da Tabela 4.

68. RNA guia único caracterizado pelo fato de que compreende qualquer uma das SEQ ID Nos: 235-240, 265-285 e 309-329, incluindo as modificações da Tabela 4.

69. RNA guia único caracterizado pelo fato de que compreende a SEQ ID No: 240.

70. RNA guia único caracterizado pelo fato de que compreende a SEQ ID No. 240, incluindo as modificações da Tabela 4.

71. RNA guia único caracterizado pelo fato de que compreende a SEQ ID No: 242, incluindo as modificações da Tabela 4.

72. RNA guia único caracterizado pelo fato de que compreende as modificações da SEQ ID No: 242, como representado na Tabela 4.

73. RNA guia único caracterizado pelo fato de que compre-

ende a SEQ ID No: 358.

74. RNA guia único caracterizado pelo fato de que compreende ácidos nucleicos possuindo pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 ou 70% de identidade com os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID. Nos: 235-240, 265-285 e 309-329, em que a modificação em cada nucleotídeo do sgRNA que corresponde a um nucleotídeo do identificador de sequência de referência na Tabela 4, idêntica ou equivalente modificação mostrada na referência identificador de sequência na Tabela 4.

75. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 66-74, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos no terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3'.

75. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-74, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende pelo menos três ligações de PS ligando os nucleotídeos na região de grampo 1.

76. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-75, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende pelo menos três ligações de PS ligando os nucleotídeos na região de grampo 2.

77. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-76, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende pelo menos três ligações de PS ligando os nucleotídeos na região de haste superior.

78. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-77, caracterizado pelo fato de que o sgRNA forma um complexo de ribonucleoproteína com uma Cas9 de *S. pyogenes*.

79. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende

modificações de 2'-O-Me em cada nucleotídeo na região de haste superior.

80. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende modificações de 2'-O-Me em um, dois, três ou quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou onze dos seguintes nucleotídeos: US1, US2, US3, US4, US5, US6, US7, US8, US9, US10, US11 e US12.

81. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende modificações de 2'-O-Me a 50% ou mais dos nucleotídeos nas regiões de grampo 1 e de grampo 2.

82. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende modificações de 2'-O-Me em cada nucleotídeo na região de haste superior e modificações de 2'-O-Me a 50% ou mais dos nucleotídeos nas regiões de grampo 1 e de grampo 2.

83. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende ou consiste em modificações de 2'-O-Me em cada nucleotídeo, iniciando em H2-1 ou H2-2 até o último nucleotídeo do terminal 3'.

84. RNA guia caracterizado pelo fato de que inclui ou consiste em uma modificação 2'-O-Me em LS1 e/ou LS6 e nenhuma modificação em LS2-LS5.

85. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em 2 ou mais de LS8, LS9, LS10, LS11 e/ou LS12.

86. RNA guia de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que pelo menos LS8 e LS10 são modificados com 2'-O-Me.

87. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-86, que compreende adicionalmente modificações de 2'-O-Me a 50% ou mais dos nucleotídeos na região do nexo.

88. RNA guia de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que pelo menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,

85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99 % dos nucleotídeos na região de nexa são modificados com 2'-O-Me.

89. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende modificações de 2'-O-Me em até 50% dos nucleotídeos na região de nexa.

90. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende modificações de 2'-O-Me em quatro ou mais nucleotídeos na região de nexa.

91. RNA guia de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que pelo menos um, dois, três, quatro ou cinco dos nucleotídeos N2-N6 na região de nexa são modificados com 2'-O-Me.

92. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em dez ou mais nucleotídeos na região de nexa.

93. RNA guia de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que pelo menos N2-N6 são modificados com 2'-O-Me.

94. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende modificações de 2'-O-Me a 50% ou mais dos nucleotídeos na região de protuberância.

95. RNA guia de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que pelo menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99 % dos nucleotídeos na região de protuberância são modificados com 2'-O-Me.

96. RNA guia de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que B2, B3 e/ou B4 são modificados com 2'-O-Me.

97. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em três ou mais nucleotídeos na região de protuberância.

98. RNA guia de acordo com a reivindicação 97, caracteri-

zado pelo fato de que B2, B3 e/ou B4 são modificados com 2'-O-Me.

99. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende os nucleotídeos da SEQ ID NO: 357 com o padrão de modificação do RNA guia de qualquer reivindicação precedente.

100. RNA guia caracterizado pelo fato de que compreende os nucleotídeos da SEQ ID NO: 356 com o padrão de modificação do RNA guia de qualquer reivindicação precedente.

101. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-100, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente modificações de 2'-O-Me nos primeiros três, quatro ou cinco nucleotídeos na extremidade 5' da região 5' terminal.

102. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-100, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente modificações de 2'-O-Me nos três, últimos quatro ou cinco últimos nucleotídeos na extremidade 3' da região 3' do terminal.

103. RNA guia de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que o último nucleotídeo na extremidade 3' da região de terminal 3' não é modificado.

104. RNA guia de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que apenas o segundo a último e o terceiro a último nucleotídeo na extremidade 3' da região de terminal 3' são modificados.

105. RNA guia de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que apenas o segundo ao quinto, o terceiro ao quinto e o quarto ao quinto nucleotídeo na região de terminal 3' são modificados.

106. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-100, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente ligações de PS entre os primeiros três, quatro ou cinco nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5'.

107. RNA guia de acordo com a reivindicação 106, caracte-

rizado pelo fato de que os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' são ligados a ligações de PS.

108. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-100, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente as ligações de PS entre os últimos três, quatro ou cinco nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

109. RNA guia de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato de que os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' estão ligados a ligações de PS.

110. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-100, caracterizado pelo fato de que os primeiros três ou quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5', e os últimos três ou quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' compreendem Modificações de 2'-O-Me.

111. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-100, caracterizado pelo fato de que os primeiros três ou quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' são ligados a ligações de PS, e os últimos três ou quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' está ligado a ligações de PS.

112. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-100, caracterizado pelo fato de que os primeiros três ou quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' compreendem modificações de 2'-O-Me e são ligados a ligações de PS, e os três últimos ou quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' compreendem modificações de 2'-O-Me e estão ligados a ligações de PS.

113. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-100, caracterizado pelo fato de que pelo menos dois dos nucleotídeos LS8, LS9, LS10, LS11 e LS12 compreendem modificações de 2'-O-Me.

114. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 79-100, caracterizado pelo fato de que pelo menos LS8 e LS10 são modificados com 2'-O-Me.

115. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-100, caracterizado pelo fato de que pelo menos 50% dos nucleotídeos na região de nexa são modificados com 2'-O-Me.

116. RNA guia de acordo com a reivindicação 115, caracterizado pelo fato de que pelo menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99 % dos nucleotídeos na região de nexa são modificados com 2'-O-Me.

117. RNA guia de acordo com a reivindicação 115, caracterizado pelo fato de que pelo menos N2-N6 são modificados com 2'-O-Me.

118. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-100, caracterizado pelo fato de que pelo menos dez dos nucleotídeos na região de nexa são modificados com 2'-O-Me.

119. RNA guia de acordo com a reivindicação 115, caracterizado pelo fato de que pelo menos N2-N6 são modificados com 2'-O-Me.

120. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-100, caracterizado pelo fato de que pelo menos 50% dos nucleotídeos na região de protuberância são modificados com 2'-O-Me.

121. RNA guia de acordo com a reivindicação 120, caracterizado pelo fato de que pelo menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99 % dos nucleotídeos na região de protuberância são modificados com 2'-O-Me.

122. RNA guia de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que B2, B3 e/ou B4 são modificados com 2'-O-Me.

123. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-100, caracterizado pelo fato de que pelo menos três dos nucleotídeos na região de protuberância são modificados com 2'-O-Me.

124. RNA guia de acordo com a reivindicação 123, caracterizado pelo fato de que B2, B3 e/ou B4 são modificados com 2'-O-Me.

125. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-124, caracterizado pelo fato de que o RNA guia é um RNAg.

126. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79-125, caracterizado pelo fato de que o RNA guia é um dgRNA.

127. RNA guia de acordo com a reivindicação 81 ou 82, caracterizado pelo fato de que pelo menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% dos nucleotídeos nas regiões de de grampo 1 e de grampo 2 são modificados com 2'-OMe.

128. RNA guia de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 127, caracterizado pelo fato de que o gRNA forma um complexo ribonucleoproteico com uma Cas9 de *S. pyogenes*.

129. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende ou consiste em nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em:

- a. os primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';
- b. cada nucleotídeo na região de haste superior;
- c. cada nucleotídeo na região de grampo 1;
- d. o nucleotídeo entre o de grampo 1 e o de grampo 2;
- e. cada nucleotídeo na região de grampo 2; e
- f. os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

130. RNA guia único de acordo com a reivindicação 129, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente ligações de PS ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

131. RNA guia único caracterizado pelo fato de que possui

o padrão de modificação mostrado na SEQ ID NO: 350, 351, 352 ou 353, como representado na Tabela 4.

132. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende ou consiste em nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em:

- a. os primeiros três, quatro, cinco ou sete nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';
- b. cada nucleotídeo na região de haste superior;
- c. cada nucleotídeo na região de grampo 1;
- d. o nucleotídeo entre o de grampo 1 e o de grampo 2;
- e. cada nucleotídeo na região de grampo 2; e
- f. os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

133. RNA guia único (sgRNA) caracterizado pelo fato de que compreende ou consiste em nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em:

- a. os primeiros três, quatro, cinco ou sete nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';
- b. cada um dos nucleotídeos US1, US2, US3, US4, US5, US6, US7, US8, US9, US10, US11 e US12;
- c. cada um dos nucleotídeos H1-1, H1-2, H1-3, H1-4, H1-5, H1-6, H1-7, H1-8, H1-9, H1-10, H1-11 e H1-12;
- d. o nucleotídeo entre o de grampo 1 e o de grampo 2;
- e. cada um dos nucleotídeos H2-1, H2-2, H2-3, H2-4, H2-5, H2-6, H2-7, H2-8, H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 e H2-15; e
- f. os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

134. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 129-133, caracterizado pelo fato de que adicionalmente

compreende ligações de PS ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

135. RNA guia único caracterizado pelo fato de que possui o padrão de modificação da SEQ ID NO: 350, 351, 352 ou 353, como mostrado na Tabela 4.

136. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 129-135, caracterizado pelo fato de que o sgRNA forma um complexo de ribonucleoproteína com uma Cas9 de *S. pyogenes*.

137. RNA crispr (crRNA) caracterizado pelo fato de que compreende uma ou mais modificações dentro de uma ou mais das seguintes regiões:

- a. os primeiros cinco nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';
- b. a região de haste inferior;
- c. a região de protuberância;
- d. a região da haste superior; e
- e. os últimos cinco nucleotídeos na extremidade 3' do crRNA.

138. RNA crispr de acordo com a reivindicação 136, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende uma modificação de extremidade 5', caracterizado pelo fato de que a modificação da extremidade 5' compreende uma ou mais ligações de fosforotioato dentro dos primeiros sete nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5'.

139. RNA crispr de acordo com a reivindicação 136, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende uma modificação de extremidade 5', caracterizado pelo fato de que a modificação da extremidade 5' compreende pelo menos duas ligações de fosforotioato nos primeiros sete nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5'.

140. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-139, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-O-metil (2'-O-Me).

141. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-140, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-fluoro (2'-F).

142. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-141, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma modificação compreende uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos.

143. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-142, caracterizado pelo fato de que os primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os três nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são modificados.

144. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-143, caracterizado pelo fato de que os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são ligados a ligações de fosforotioato (PS).

145. RNA crispr de acordo com a reivindicação 143, caracterizado pelo fato de que a modificação compreende 2'-O-Me.

146. RNA crispr de acordo com a reivindicação 143, caracterizado pelo fato de que a modificação compreende 2'-F.

147. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-146, caracterizado pelo fato de que os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são ligados com uma ligação de PS, e em que os primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos três nucleotídeos na extremidade 3' do ter-

minal 3' compreendem modificações de 2'-O-Me.

148. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-146, caracterizado pelo fato de que os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são ligados com uma ligação de PS, e em que os primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos três nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' compreendem modificações de 2'-F.

149. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-148, caracterizado pelo fato de que LS1 e LS6 são modificados com 2'-O-Me.

150. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-149, caracterizado pelo fato de que cada um dos nucleotídeos na região de haste superior é modificado com 2'-O-Me.

151. RNA crispr (crRNA) caracterizado pelo fato de que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em:

- a. LS1 e LS6 na região de haste inferior; e
- b. cada nucleotídeo na região de haste superior.

152. RNA crispr de acordo com a reivindicação 151, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

153. RNA crispr de acordo com a reivindicação 151 ou da reivindicação 152, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5', e 2'-O-Me ou nucleotídeos modificados em 2'-F nos três últimos nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

154. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações

cações 137-153, caracterizado pelo fato de que LS1, LS2 e LS6 são modificados com 2'-F.

155. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-154, caracterizado pelo fato de que cada nucleotídeo na região de protuberância é modificado com 2'-F.

156. RNA crispr (crRNA) caracterizado pelo fato de que compreende nucleotídeos modificados com 2'-F em:

- a. LS1, LS2 e LS6 na região de haste inferior; e
- b. cada nucleotídeo na região de protuberância.

157. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-156, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

158. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-157, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5', e 2'-O-Me ou nucleotídeos 2'-F modificados nos últimos três nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

159. RNA crispr caracterizado pelo fato de que compreende qualquer uma das SEQ ID Nos: 1-187, incluindo as modificações da Tabela 4.

160. RNA crispr caracterizado pelo fato de que compreende qualquer uma das SEQ ID Nos: 19-31, 53-73, 104-130 e 161-187, incluindo as modificações da Tabela 4.

161. RNA crispr caracterizado pelo fato de que compreende ácidos nucleicos tendo pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 ou 70% de identidade com qualquer uma das SEQ

ID Nos: 19- 31, 53-73, 104-130 e 161-187, em que a modificação em cada nucleotídeo do crRNA que corresponde a um nucleotídeo do identificador de sequência de referência na Tabela 4, idêntica ou equivalente modificação mostrada na referência identificador de sequência na Tabela 4.

162. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 159-161, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

163. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-162, caracterizado pelo fato de que o RNAr combinado com um RNAt forma um complexo de ribonucleoproteína com uma Cas9 de *S. pyogenes*.

164. RNA tracr (trRNA) caracterizado pelo fato de que compreende uma ou mais modificações dentro de uma ou mais das seguintes regiões:

- a. os primeiros cinco nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5';
- b. a região da haste superior;
- c. a região de protuberância;
- d. a região de haste inferior;
- e. a região denexo;
- f. a região de grampo 1;
- g. a região de grampo 2; e
- h. os últimos cinco nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

165. RNA tracr de acordo com a reivindicação 164, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma modificação compreende um

nucleotídeo modificado com 2'-O-metila (2'-O-Me).

166. RNA tracr de acordo com a reivindicação 164 ou da reivindicação 165, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma modificação compreende um nucleotídeo modificado com 2'-fluoro (2'-F).

167. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-166, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma modificação compreende uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos.

168. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-167, caracterizado pelo fato de que os quatro primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' estão ligados a ligações de fosforotioato (PS).

169. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-168, caracterizado pelo fato de que os primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os três nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são modificados.

170. RNA tracr de acordo com a reivindicação 169, caracterizado pelo fato de que a modificação compreende 2'-O-Me.

171. RNA tracr de acordo com a reivindicação 169, caracterizado pelo fato de que a modificação compreende 2'-F.

172. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-171, caracterizado pelo fato de que os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são ligados com uma ligação de PS, e em que os primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos três nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' compreendem modificações de 2'-O-Me.

173. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações

cações 164-171, caracterizado pelo fato de que os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' são ligados com uma ligação de PS, e em que os primeiros três nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e os últimos três nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3' compreendem modificações de 2'-F.

174. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-173, caracterizado pelo fato de que cada nucleotídeo na região de haste superior é modificado com 2'-O-Me.

175. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-174, caracterizado pelo fato de que B1 e B2 dentro da região de protuberância são modificados com 2'-O-Me.

176. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-175, caracterizado pelo fato de que N3, N4, N5, N15, N16, N17 e/ou N18 na região de nexa são modificados com 2'-O-Me.

177. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-176, caracterizado pelo fato de que cada nucleotídeo na região de grampo 1 é modificado com 2'-O-Me.

178. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-177, caracterizado pelo fato de que cada nucleotídeo na região de grampo 2 é modificado com 2'-O-Me.

179. RNA tracr (trRNA) caracterizado pelo fato de que compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me em:

- a. cada nucleotídeo na haste superior;
- b. B1 e/ou B2 dentro da região de protuberância;
- c. N3, N4, N5, N15, N16, N17 e/ou N18 na região de nexa;
- d. cada nucleotídeo na região de grampo 1; e
- e. cada nucleotídeo na região de grampo 2.

180. RNA tracr de acordo com a reivindicação 179, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende três ligações de

fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

181. RNA tracr de acordo com a reivindicação 179 ou da reivindicação 180, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5', e 2'-O-Me ou ácidos nucleicos modificados em 2'-F nos últimos três nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

182. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-181, caracterizado pelo fato de que N15, N16, N17 e N18 são modificados com 2'-F.

183. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-182, caracterizado pelo fato de que LS1, LS3 e LS5 são modificados com 2'-F e LS2, LS4 e LS6 são modificados com 2'-O-Me.

184. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-183, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

185. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-184, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende nucleotídeos modificados com 2'-O-Me ou 2'-F nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5', e 2'-O-Me ou nucleotídeos 2'-F modificados nos últimos três nucleotídeos na extremidade 3' do terminal 3'.

186. RNA tracr caracterizado pelo fato de que compreende qualquer uma das SEQ ID Nos: 188-227, incluindo as modificações da Tabela 4.

187. RNA tracr caracterizado pelo fato de que compreende ácidos nucleicos tendo pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 ou 70% de identidade com qualquer uma das SEQ ID Nos: 188- 227, em que a modificação em cada nucleotídeo do trRNA que corresponde a um nucleotídeo do identificador de sequência de referência na Tabela 4, é idêntica ou equivalente à modificação mostrada no identificador de sequência de referência na Tabela 4.

188. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 186-187, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende três ligações de fosforotioato (PS) ligando os primeiros quatro nucleotídeos na extremidade 5' do terminal 5' e três ligações de PS ligando os últimos quatro nucleotídeos ao terminal 3'. fim do terminal 3'.

189. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-188, caracterizado pelo fato de que o trRNA combinado com um crRNA forma um complexo de ribonucleoproteína com uma Cas9 de *S. pyogenes*.

190. Guia duplo que compreende um crRNA e um trRNA, caracterizado pelo fato de que o crRNA compreende qualquer uma das SEQ ID Nos: 1-187 como representado na Tabela 4, e em que o trRNA compreende os ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 188- 227 como mostrado na Tabela 4.

191. Guia duplo caracterizado pelo fato de que compreende um crRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 137-163 e um trRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 164-189.

192. Guia duplo caracterizado pelo fato de que compreende um crRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 137-163 e um trRNA não modificado.

193. Guia duplo caracterizado pelo fato de que compreende

um crRNA não modificado e um trRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 137-189.

194. Guia duplo de acordo com qualquer uma das reivindicações 190-193, caracterizado pelo fato de que a guia dual forma um complexo de ribonucleoproteína com uma Cas9 de *S. pyogenes*.

195. Composição de LNP caracterizada pelo fato de que compreende um sgRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 1-78 e 129-136.

196. Composição de LNP caracterizada pelo fato de que compreende um gRNA que compreende ou consiste no RNA como definido em qualquer uma das reivindicações 1-193.

197. Composição caracterizada pelo fato de que compreende um sgRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 1-78 e 129-136, associado a uma nanopartícula lipídica (LNP).

198. Composição caracterizada pelo fato de que compreende um crRNA como definido em qualquer das reivindicações 137-163, associado a uma nanopartícula lipídica (LNP).

199. Composição caracterizada pelo fato de que compreende um trRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 164-189, associado a uma nanopartícula lipídica (LNP).

200. Composição que compreende o sgRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 1-78 e 129-136, o gRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 79-128, o crRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 137-163, o trRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 164-189, o dgRNA de qualquer uma das reivindicações 190-194, ou a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 195-199, caracterizada pelo fato de que adicionalmente compreende uma nuclease ou um mRNA que codifica a nuclease.

201. Composição de acordo com a reivindicação 200, ca-

racterizada pelo fato de que a nuclease é uma proteína Cas.

202. Composição de acordo com a reivindicação 201, caracterizada pelo fato de que a proteína Cas é uma Cas9.

203. Composição de acordo com a reivindicação 202, caracterizado pelo fato de que a Cas9 é uma Cas9 de *S. pyogenes*.

204. Composição de qualquer uma das reivindicações 200-203, caracterizada pelo fato de que a nuclease é uma nickase.

205. Composição de qualquer uma das reivindicações 200-204, caracterizada pelo fato de que a nuclease é modificada.

206. Composição de acordo com a reivindicação 205, caracterizada pelo fato de que a nuclease modificada compreende um sinal de localização nuclear (NLS).

207. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 200-206, caracterizada pelo fato de que compreende um mRNA que codifica a nuclease.

208. Formulação farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende o sgRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 1-78 e 129-136, o gRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 79-128, o crRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 137-163, o trRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 164-189, o dgRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 190-194, ou a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 195-207 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

209. Método para modificar um DNA alvo, caracterizado pelo fato de que compreende liberar uma proteína Cas ou um ácido nucleico que codifica uma proteína Cas e qualquer um ou mais dos seguintes, para uma célula:

a. sgRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 1-78 e 129-136;

b. o RNA g como definido em qualquer uma das reivindicações 79-128;

c. o gRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 137-163;

d. trRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 164-189;

e. o dgRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 190-194;

f. a composição como definido em qualquer uma das reivindicações 195-207; ou

g. formulação farmacêutica como definido na reivindicação 208.

210. Método de acordo com a reivindicação 209, caracterizado pelo fato de que o método resulta em uma inserção ou deleção em um gene.

211. Método de acordo com a reivindicação 209, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a entrega na célula de um molde, em que pelo menos uma parte do molde incorpora um DNA alvo no em ou próximo a uma quebra de duplo filamento induzida pela proteína Cas.

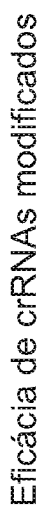
212. RNA guia único de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-78 e 129-136, caracterizado pelo fato de que é para uso na preparação de um medicamento para tratar uma doença ou distúrbio.

213. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-163, caracterizado pelo fato de que é para uso na preparação de medica para o tratamento de uma doença ou distúrbio.

214. RNA tracr de acordo com qualquer uma das reivindicações 164-189, caracterizado pelo fato de que é para uso na preparação de um medicamento para tratar uma doença ou distúrbio.

215. RNA crispr de acordo com qualquer uma das reivindicações 137-163 em combinação com crRNA de qualquer uma das reivindicações 164-189, caracterizado pelo fato de que é para uso na preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio.

216. Formulação farmacêutica de acordo com a reivindicação 208, caracterizada pelo fato de que é para uso na preparação de um medicamento para tratar uma doença ou distúrbio.



76

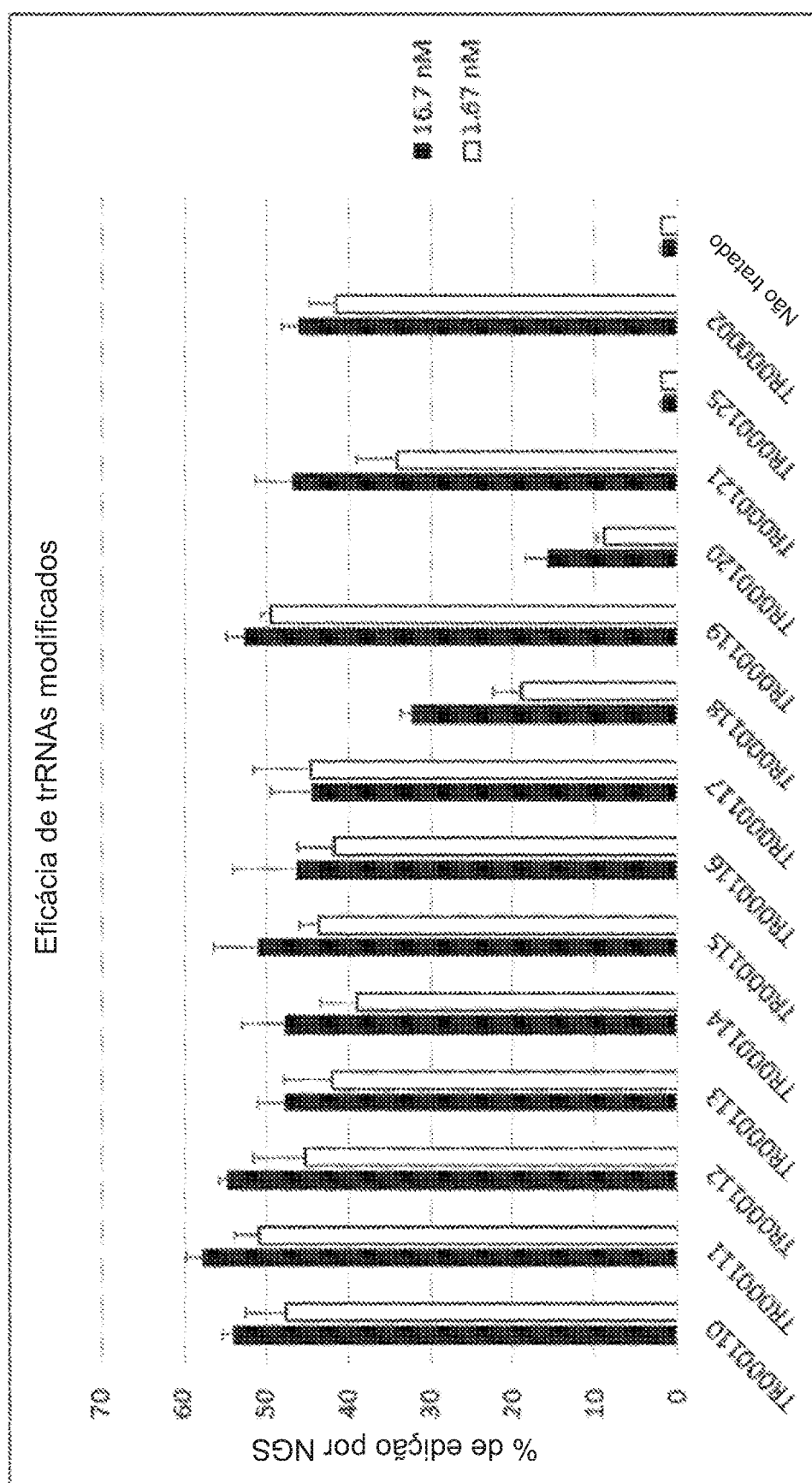


FIG. 2

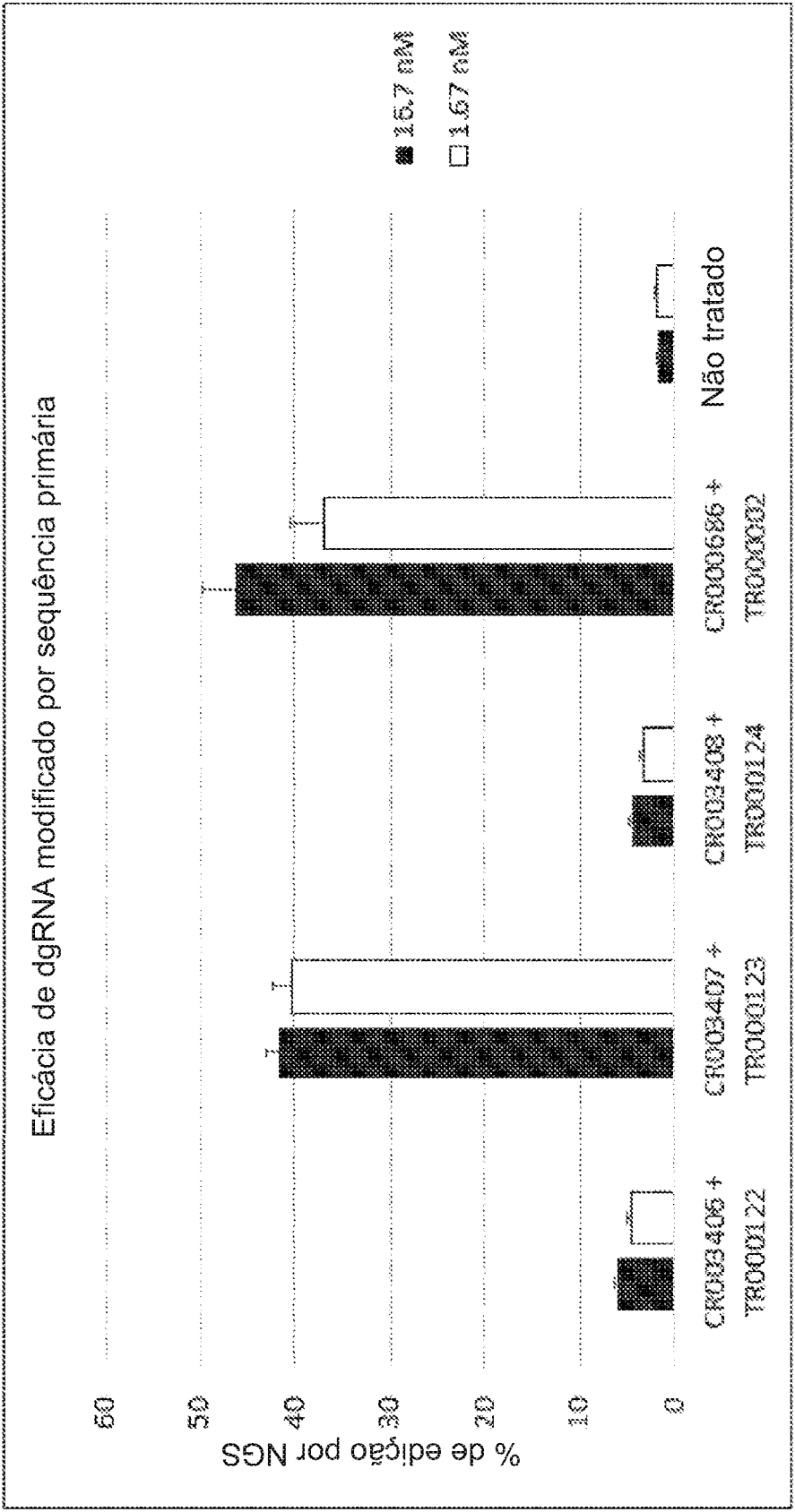


FIG. 3

25 nM													
	TR000110	TR000111	TR000112	TR000113	TR000114	TR000115	TR000116	TR000117	TR000118	TR000119	TR000121	TR000002	
CR003393	54.1 ± 5	61.2 ± 3.1	56.7 ± 5	55.9 ± 4	53.8 ± 10.7	56.3 ± 10	52.7 ± 5.8	55.5 ± 7	40.7 ± 12.9	48.5 ± 8.1	51.3 ± 11.4		
CR003394	57.7 ± 4.7	61.5 ± 8.2	64.8 ± 6.4	65.4 ± 8.9	60.1 ± 2.5	61.6 ± 4.6	57.3 ± 7.2	57.8 ± 8.3	38.6 ± 7.9	50.9 ± 10.3	54.8 ± 8.9		
CR003395	52.4 ± 2.4	62.8 ± 6.8	61.1 ± 7.2	62.8 ± 11.1	55.9 ± 7.6	57 ± 4.9	53.4 ± 7.1	52.5 ± 8.1	38.2 ± 7.5	49.7 ± 14.4	53.1 ± 11.7		
CR003396	56 ± 3.9	56.4 ± 7.6	58.7 ± 7.3	58.1 ± 7.3	54.7 ± 4.9	58.8 ± 5	48.9 ± 2.8	52.5 ± 9.7	34.3 ± 6	48.3 ± 10.3	52.4 ± 9.5		
CR003398	50.8 ± 10.2	56.2 ± 8.2	62.5 ± 6.9	59.7 ± 8.9	56.3 ± 3.4	61.2 ± 5	53 ± 7.1	53.8 ± 9.2	29.4 ± 9.3	52.2 ± 12.2	51.9 ± 15.6		
CR003402	42.7 ± 4.5	53.3 ± 5.4	56.9 ± 11	57.4 ± 12.1	52.8 ± 9.3	55.1 ± 8.5	46.1 ± 8.4	50.5 ± 8.8	17.7 ± 6.7	45.2 ± 12	52.8 ± 11.3		
CR003403	45.8 ± 9.9	52.7 ± 8.6	59.7 ± 13.9	54.8 ± 13.7	47.2 ± 12.1	50.9 ± 8.4	43.4 ± 10.3	47 ± 13	10.5 ± 5.9	44.5 ± 15.2	46 ± 19.3		
CR000686												34.5 ± 6.4	
2.5 nM													
	TR000110	TR000111	TR000112	TR000113	TR000114	TR000115	TR000116	TR000117	TR000118	TR000119	TR000121	TR000002	
CR003393	41.8 ± 6.2	50.4 ± 3.2	40.2 ± 4.7	43.4 ± 2	40.1 ± 4.8	43.1 ± 3.9	39.1 ± 4.2	43 ± 6	15.6 ± 3.1	34.9 ± 11.6	38.6 ± 2.2		
CR003394	45.4 ± 4.7	49.6 ± 7.9	43.9 ± 6.6	46.7 ± 5.6	40.4 ± 7.5	47.2 ± 6.9	46.8 ± 3.1	43.9 ± 2.4	13.7 ± 1.6	28.9 ± 4.3	35.9 ± 6.2		
CR003395	39 ± 10	56 ± 5.1	42.2 ± 3.5	48.2 ± 3.2	36 ± 2.8	47.4 ± 7.3	44.4 ± 5.9	41.6 ± 7	12 ± 1.4	25.8 ± 1	31.4 ± 1.8		
CR003396	34.8 ± 2.3	46.5 ± 0.4	42 ± 4.9	42.4 ± 1.8	32 ± 4	44.4 ± 5.5	41.1 ± 7.7	40.5 ± 5.1	20.7 ± 1.2	26 ± 1.2	42.4 ± 8.9		
CR003398	33.6 ± 3.3	47 ± 6.8	41.9 ± 2.6	41.9 ± 1.1	37.1 ± 4.1	43.2 ± 9.4	40.1 ± 3.9	42.9 ± 3.6	1.4 ± 0.1	34.2 ± 2	40.7 ± 7.4		
CR003402	31.2 ± 4.7	46.4 ± 5	38.5 ± 2.8	40.7 ± 3.5	29.9 ± 1.1	42.4 ± 6.6	31.7 ± 2.9	32.8 ± 4.6	7 ± 0.8	31.3 ± 2.1	46.8 ± 3.8		
CR003403	28 ± 4.3	38.3 ± 3.3	37.5 ± 4.4	36.4 ± 2.7	31.4 ± 4.6	34.6 ± 3.7	32.9 ± 4	35.8 ± 4.2	1.4 ± 0.1	34.6 ± 6.1	40.7 ± 6.6		
CR000686												21.7 ± 4.9	

FIG. 4

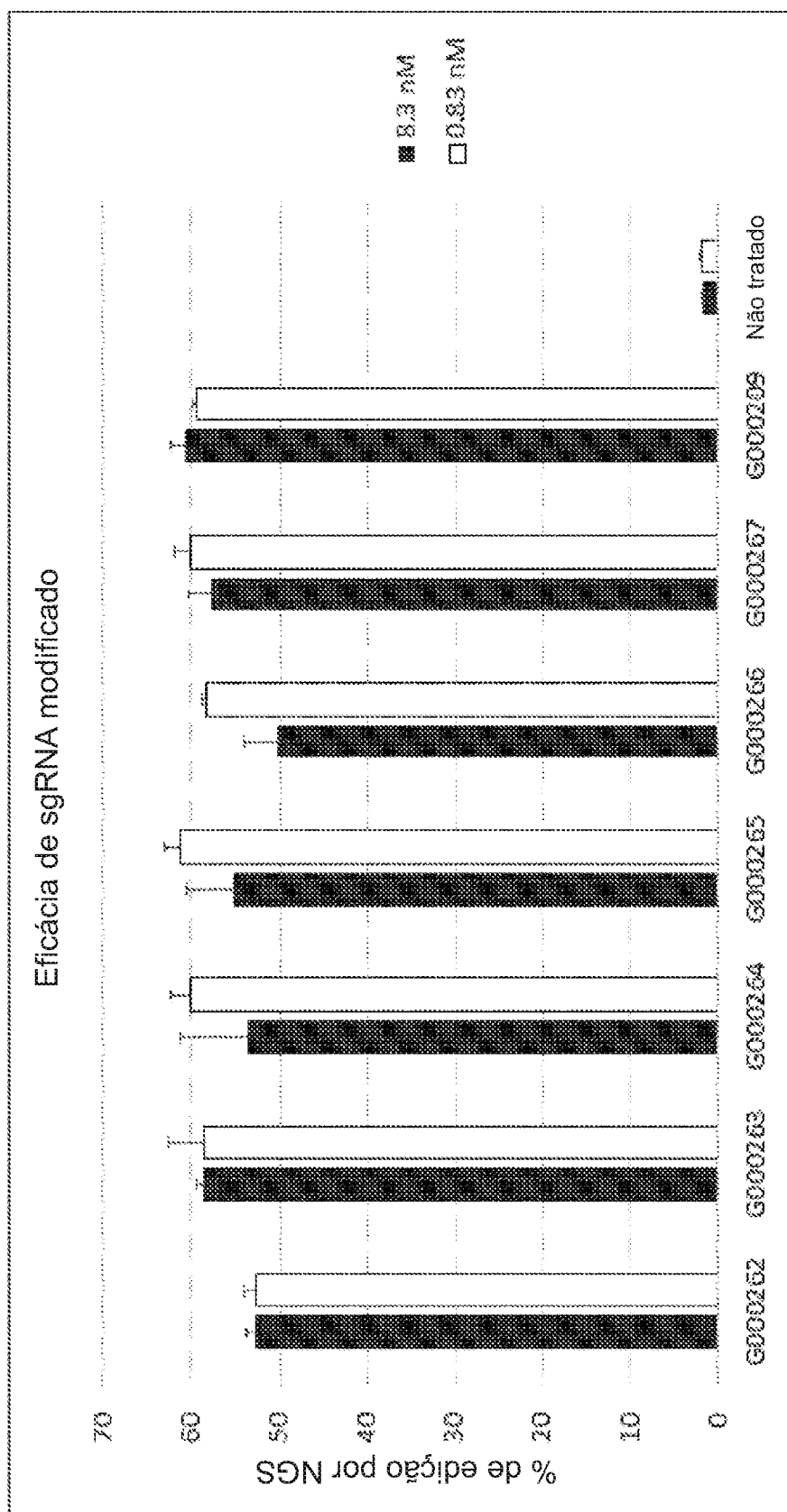


FIG. 5



6
6.
6

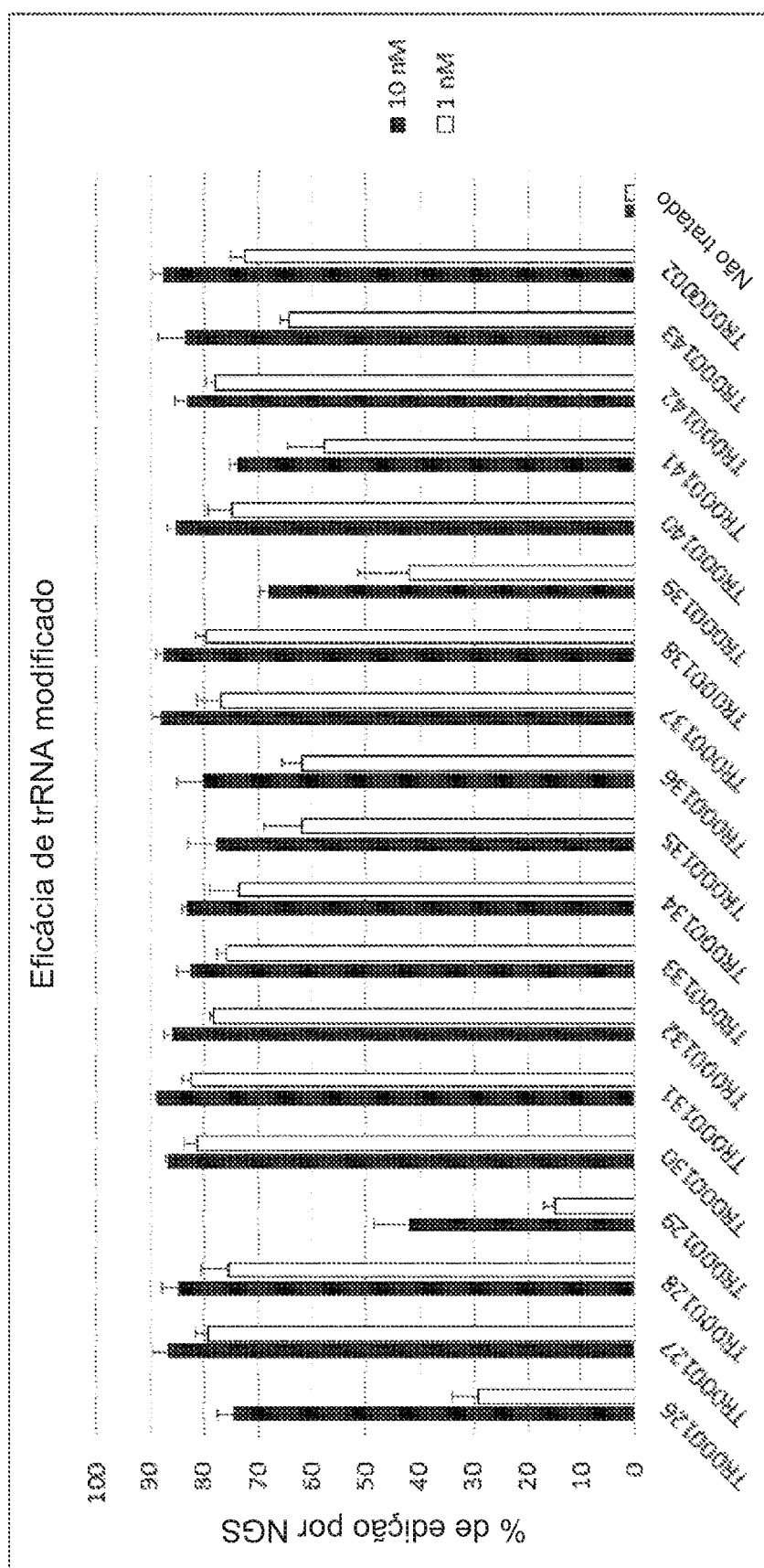


FIG. 7

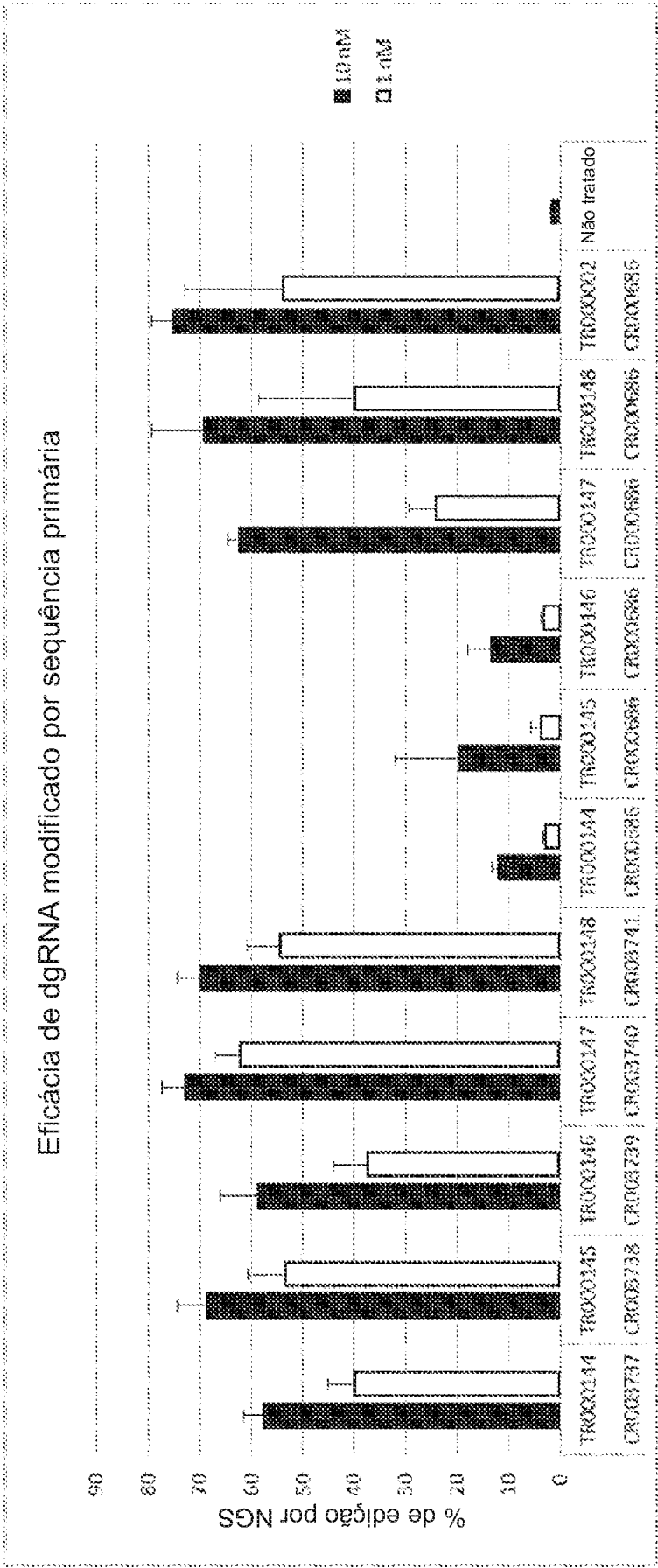


FIG. 8

30 nM												
	TR000127	TR000128	TR000130	TR000134	TR000135	TR000136	TR000137	TR000138	TR000139	TR000142	TR000143	TR000002
CR003723	18 ± 13.8	22.8 ± 4.1	24 ± 2.6	26.9 ± 2.8	29.8 ± 5	22.2 ± 5.7	26.7 ± 5	23.6 ± 4.1	13.7 ± 2.4	22.3 ± 4.4	10.8 ± 2.2	18.5 ± 1.5
CR003725	28.4 ± 1.2	29.2 ± 4.2	27.9 ± 1.3	30.6 ± 3.4	26.1 ± 3.8	25.9 ± 4.4	30 ± 3	26.9 ± 2	18.5 ± 2.2	25.1 ± 0.9	23.1 ± 1.7	
CR003726	30.4 ± 1.1	31.3 ± 3.2	30.6 ± 2.9	32 ± 2.2	29.8 ± 2.5	29.9 ± 2.8	32.3 ± 1	28.7 ± 2.2	20.9 ± 2.4	27 ± 1.4	23.6 ± 2.3	24.9 ± 1.1
CR003727	31.6 ± 2.1	27 ± 2.7	29.6 ± 0.8	32.1 ± 1.3	26.7 ± 1.2	27.2 ± 5.2	31 ± 2	28.1 ± 0.7	19.2 ± 0.7	26.7 ± 2.1	22.5 ± 1.2	25.6 ± 3
CR003728	34.6 ± 2.4	24 ± 0.1	34.9 ± 2.6	37.7 ± 3.1	33.1 ± 2.1	33.1 ± 4	35.4 ± 0.9	32.4 ± 2.9	25.8 ± 4.8	30.7 ± 2.7	28.2 ± 2.2	28.6 ± 0.7
CR003729	34.8 ± 0.9	32.3 ± 1.5	33.8 ± 1.1	34.8 ± 2.5	29.8 ± 1.8	31.5 ± 3.6	32.6 ± 1.7	31 ± 1.9	25.4 ± 3.7	28.6 ± 0.5	25.6 ± 1.1	27.8 ± 0.6
CR003734	27.5 ± 0.3	21.5 ± 1.5	29.8 ± 1.6	29.5 ± 1.6	13.7 ± 2.1	14.6 ± 1.2	31 ± 2.4	28 ± 2.5	7 ± 1.1	25.5 ± 1.3	34 ± 0.1	22.7 ± 2.8
CR000685	23 ± 2.8	22.4 ± 3.9	23.6 ± 6.7	26.4 ± 1	22.2 ± 2	19.5 ± 1.1	24.6 ± 3	27.4 ± 2.6	12.2 ± 1.7	22.9 ± 1.8	20.2 ± 1.1	22.6 ± 5
1 nM												
	TR000127	TR000128	TR000130	TR000134	TR000135	TR000136	TR000137	TR000138	TR000139	TR000142	TR000143	TR000002
CR003723	18.3 ± 14.1	16 ± 12.1	25.3 ± 0.8	22.5 ± 3.4	14.3 ± 10.6	17.5 ± 2	23.1 ± 3.8	21 ± 1.4	8.8 ± 1.4	18.3 ± 0.7	8.3 ± 1.5	14.6 ± 0.4
CR003725	26.9 ± 1.8	25.1 ± 4.1	25 ± 2.7	24.8 ± 2.3	23.1 ± 2.8	16.2 ± 12.1	17.3 ± 13.1	22.5 ± 1	15.2 ± 1.7	24.7 ± 1.5	19.7 ± 3.1	
CR003726	16.8 ± 12.9	26.4 ± 2	23.6 ± 2.6	25.2 ± 1.5	22.7 ± 3.4	20.7 ± 1.5	26.6 ± 1.4	20.4 ± 0.9	13.3 ± 0.3	21.6 ± 1.5	18.6 ± 0.5	17 ± 1
CR003727	24.1 ± 3.1	20.3 ± 1.4	21 ± 1.3	23.6 ± 2.6	19.7 ± 1.7	20.3 ± 1.4	15.3 ± 11.3	20.2 ± 1.5	11.7 ± 1.7	20.7 ± 0.7	15.1 ± 0.8	19.7 ± 4.2
CR003728	26.9 ± 0.8	24 ± 0.1	28.2 ± 2.4	27.9 ± 0.6	26.4 ± 3.2	22.9 ± 1.2	26.4 ± 1.9	24.8 ± 0.5	18.8 ± 1.8	23.3 ± 1.4	20.3 ± 1.1	23.4 ± 3.7
CR003729	26.3 ± 2.5	30.5 ± 4.6	28.3 ± 2.7	28.6 ± 2	25.3 ± 3.1	24.6 ± 1.6	25 ± 0.3	23.7 ± 0.6	17.1 ± 1.7	21.9 ± 0.5	21 ± 2	22 ± 2
CR003734	28.9 ± 5.3	15.2 ± 3	21.4 ± 1.7	20.1 ± 0.1	8.5 ± 1.7	7.4 ± 0.9	20.4 ± 0.8	20.4 ± 1.4	3 ± 0.1	19.3 ± 0.8	2.5 ± 0.3	17.3 ± 2.1
CR000685	16.2 ± 1	17.3 ± 3.4	18.3 ± 3.3	20.5 ± 5	15.4 ± 1.2	14.8 ± 3	18.9 ± 3.6	20.1 ± 1.7	7.9 ± 2.3	17.5 ± 3.3	15.4 ± 1	14.1 ± 1.6

FIG. 9

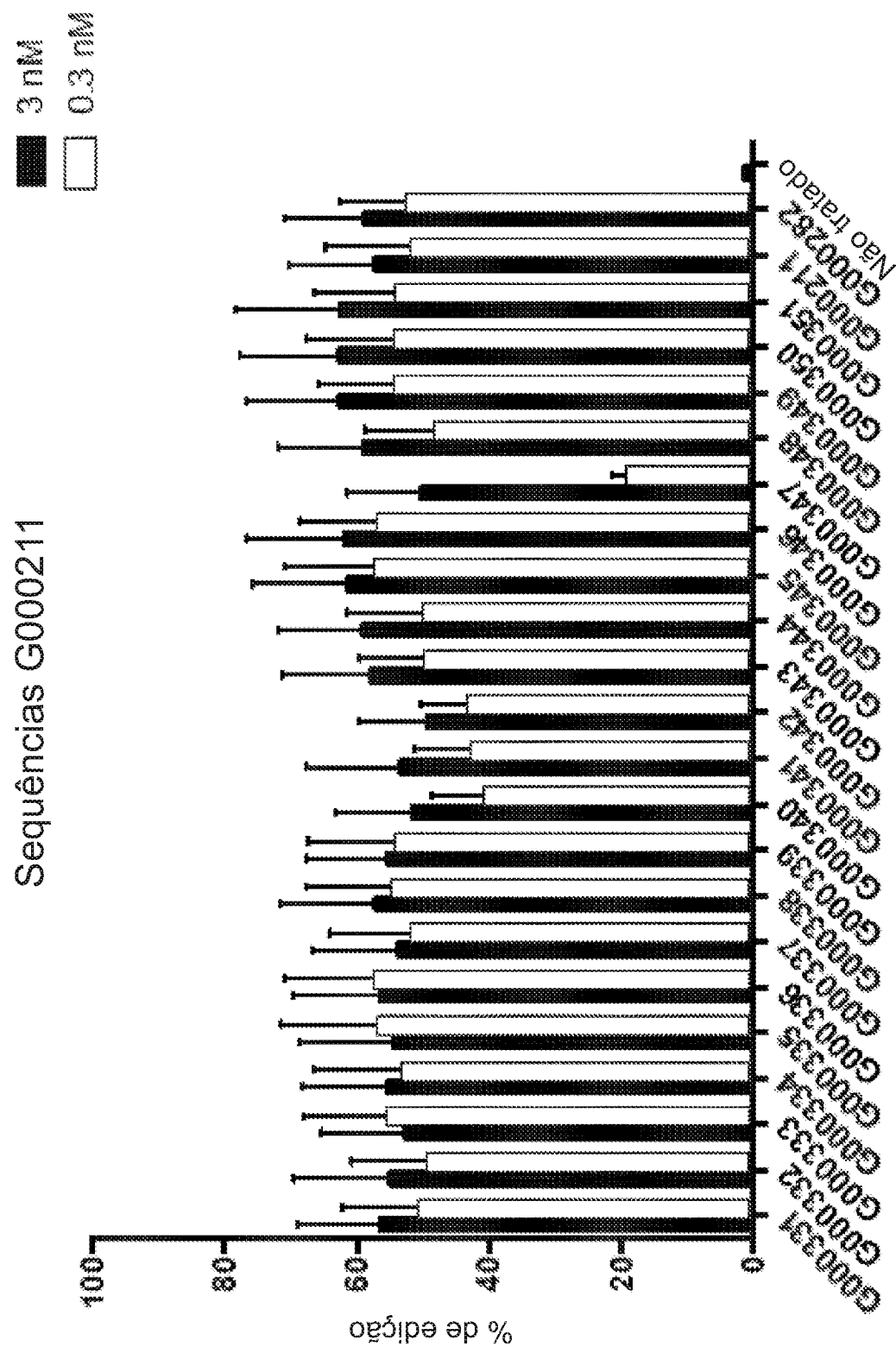


FIG. 10

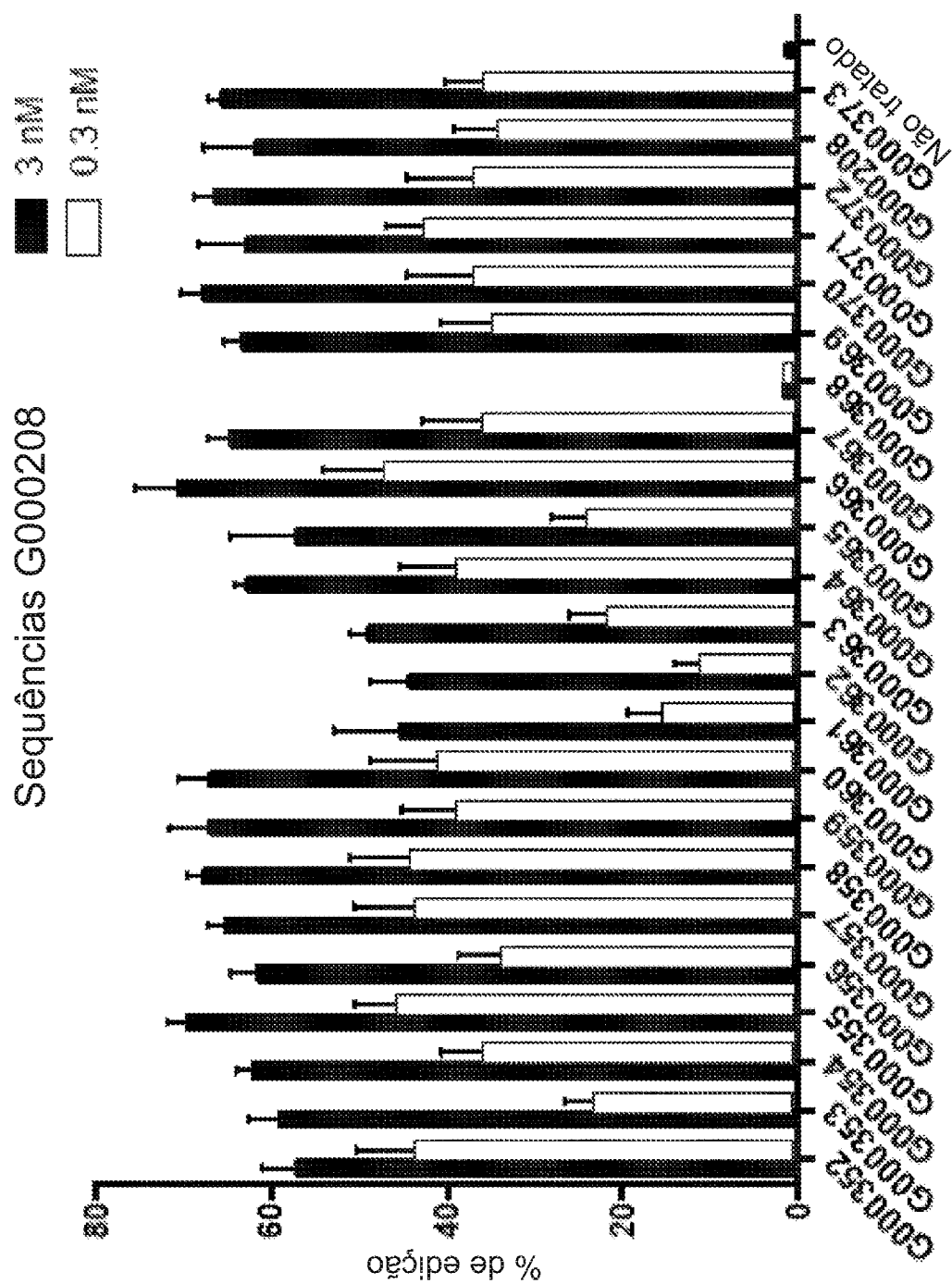


FIG. 11

Sequências CR705

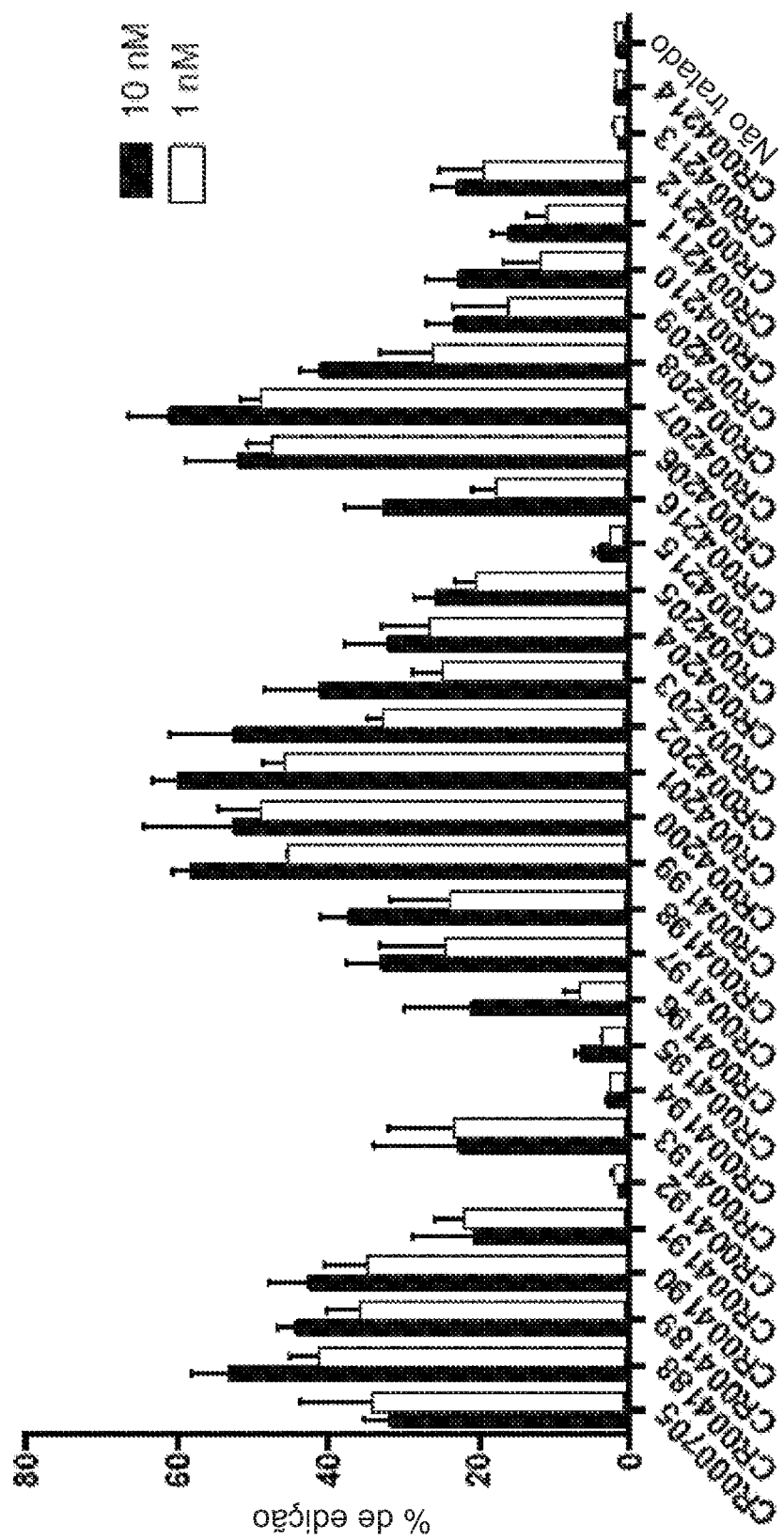


FIG. 12A

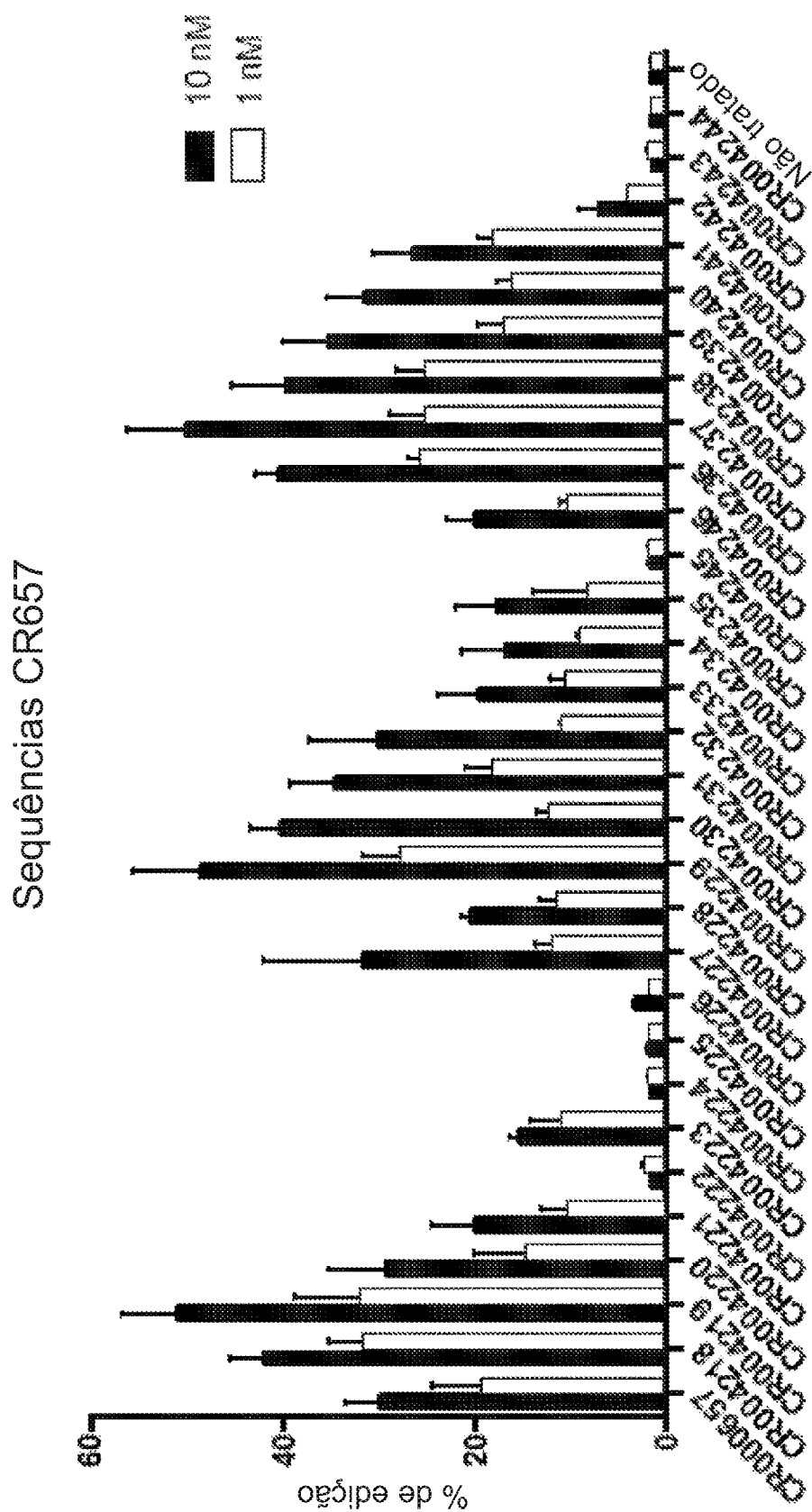


FIG. 12B

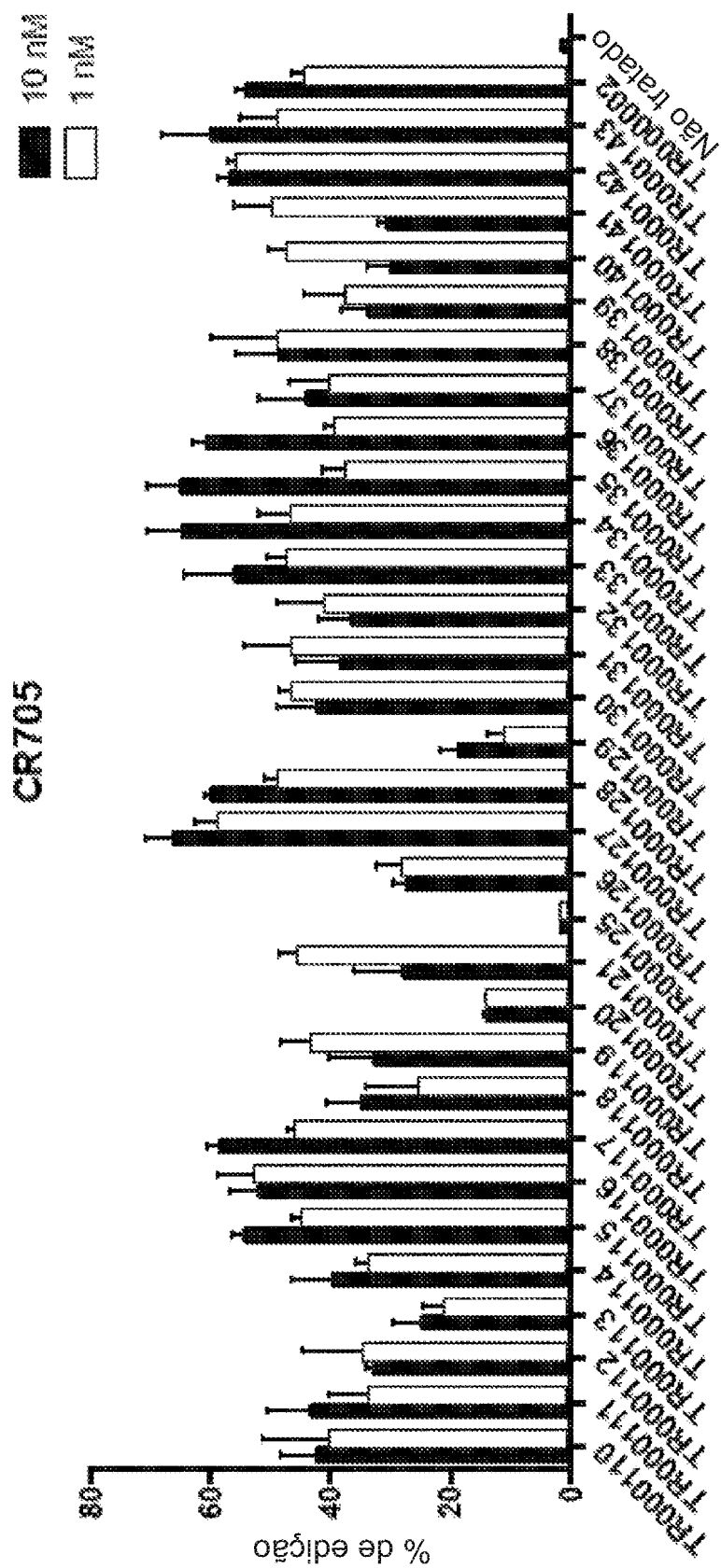


FIG. 13A

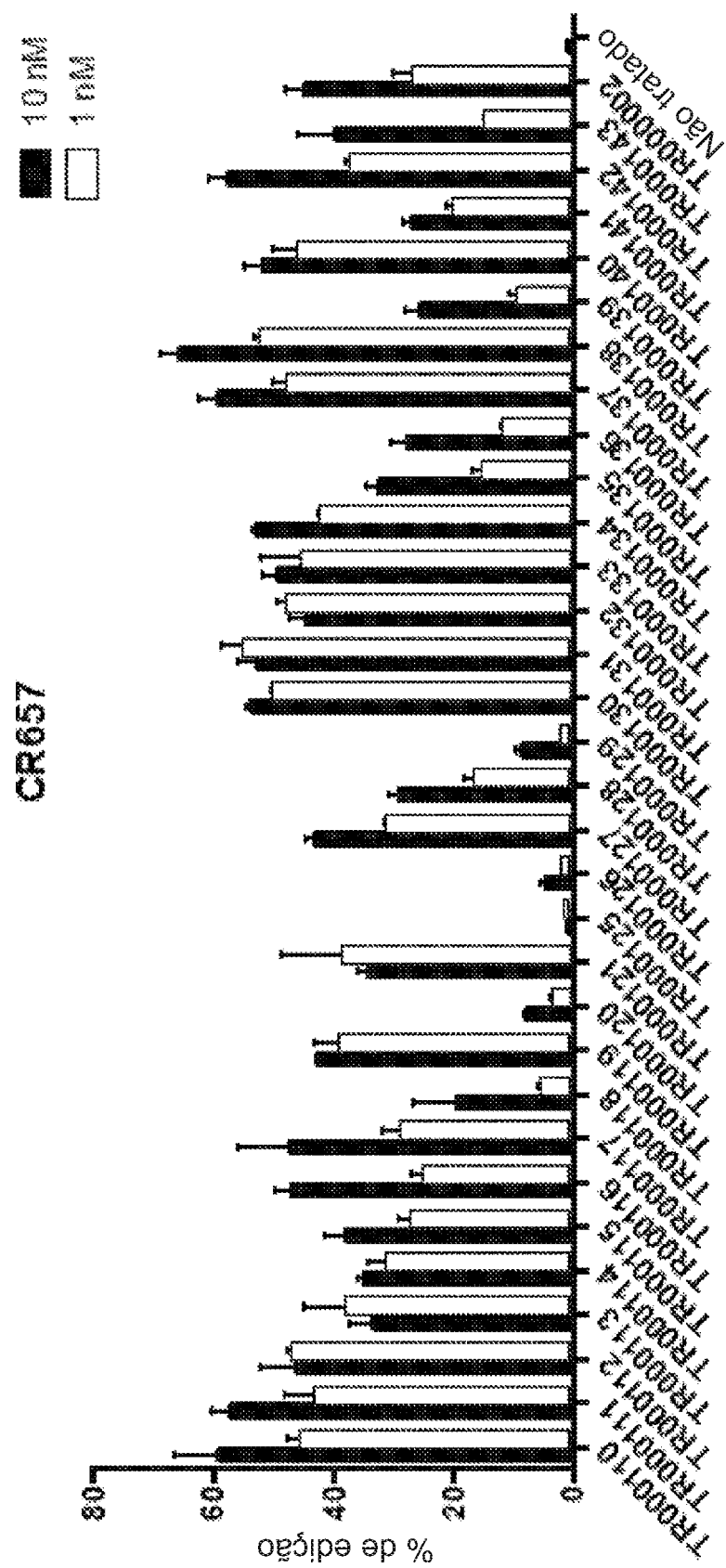


FIG. 13B

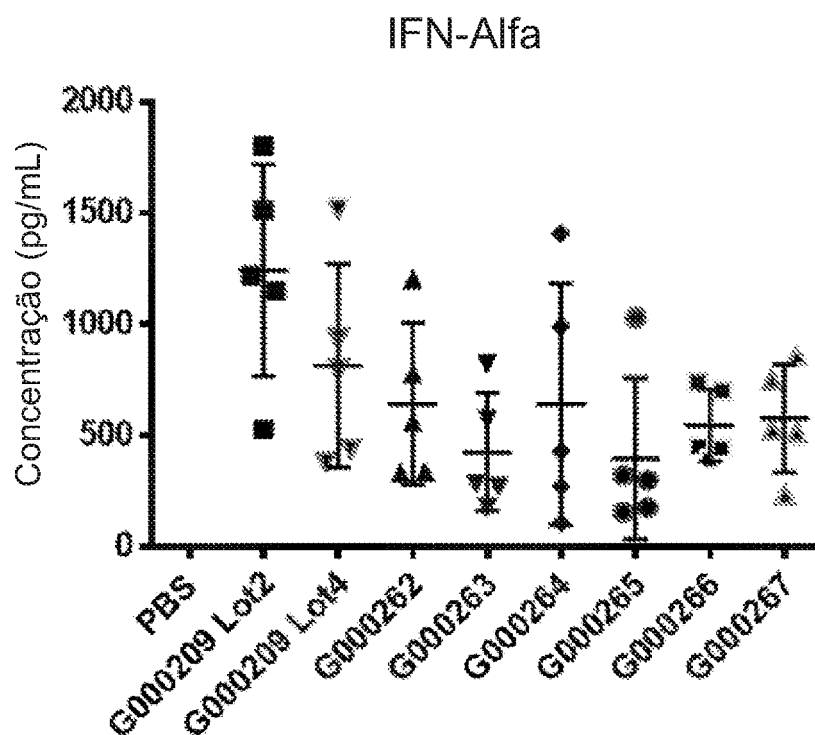


FIG. 14A

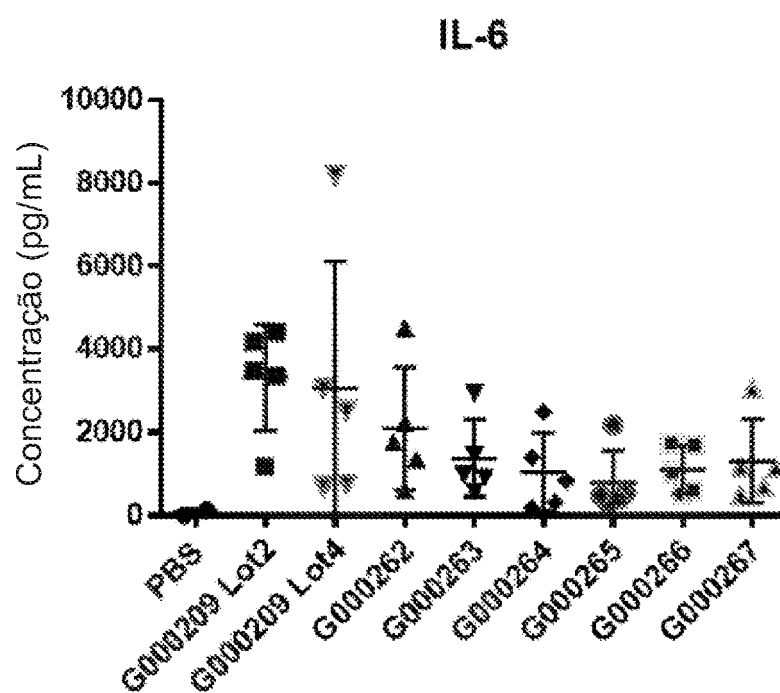


FIG. 14B

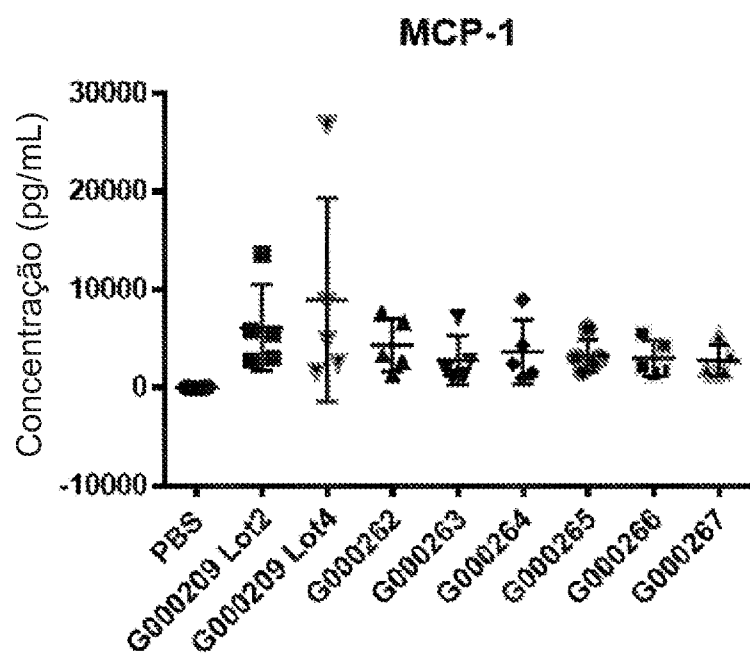


FIG. 14C

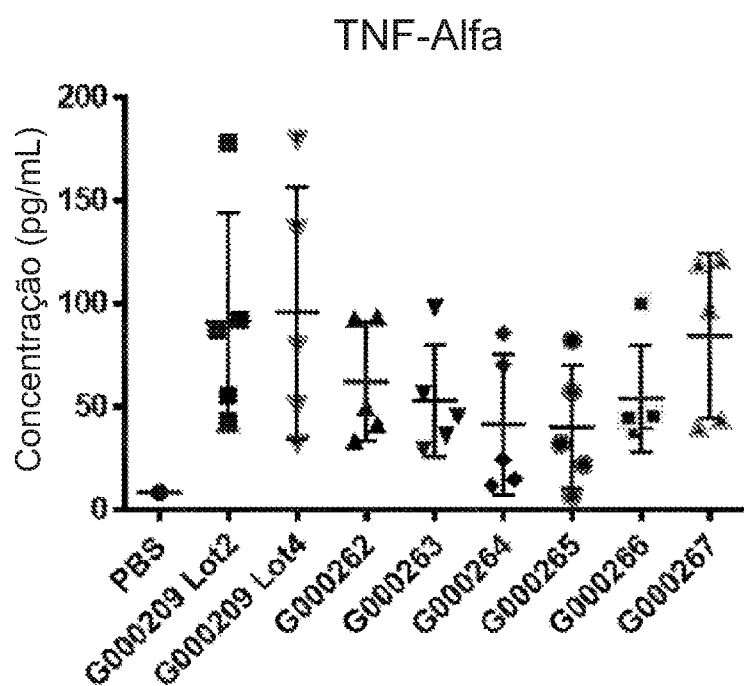


FIG. 14D

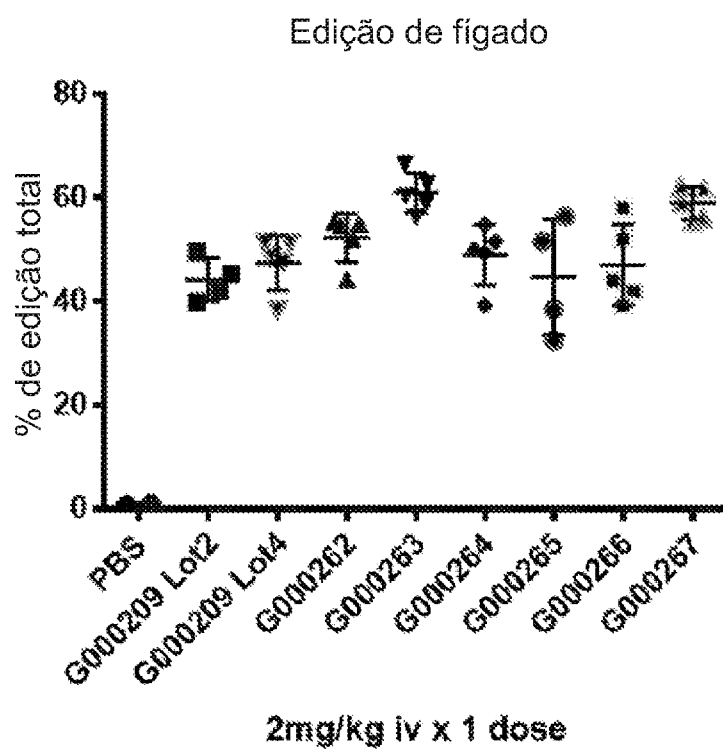


FIG. 15A

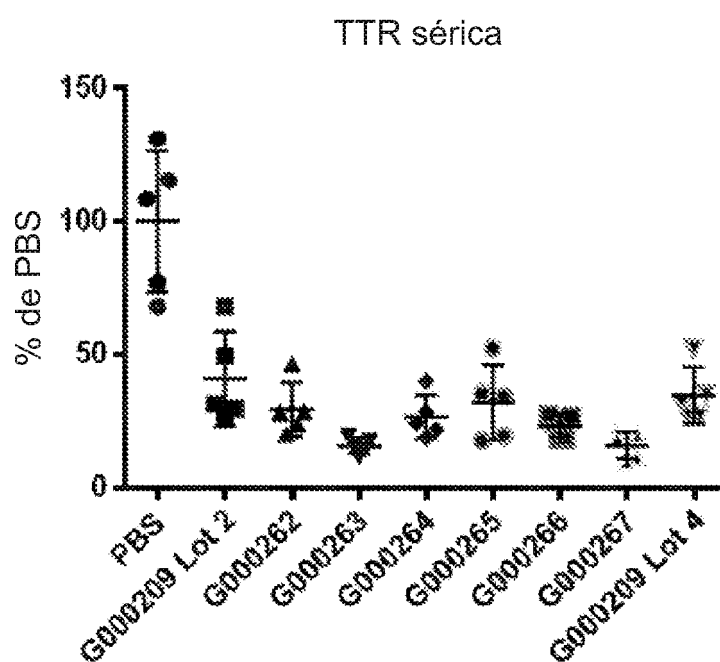
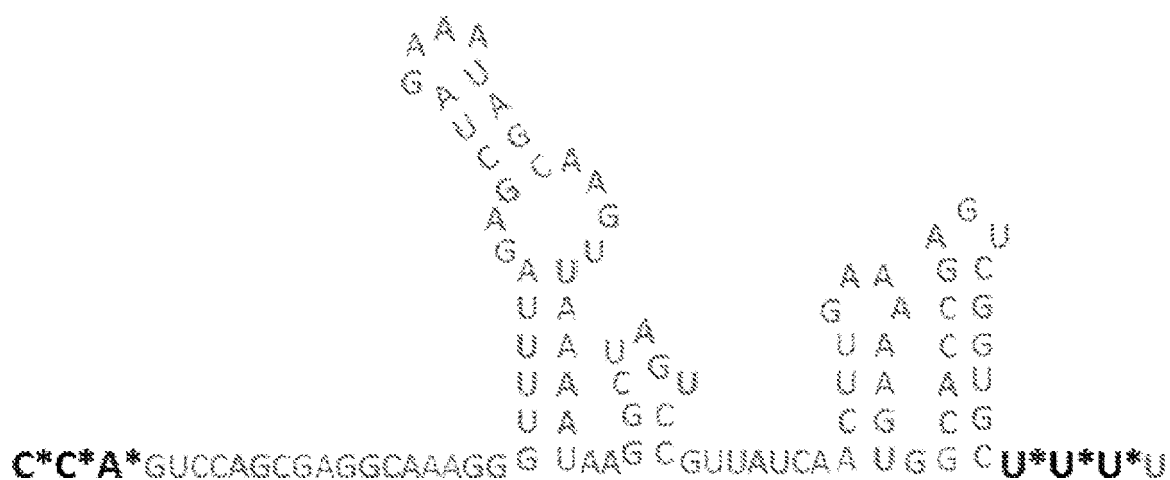


FIG. 15B

Guia	Média de % de edição	Desv. Padrão
<i>G209 Lot#2</i>	<i>44.2</i>	<i>4.1</i>
<i>G209 Lot#4</i>	<i>47.5</i>	<i>5.3</i>
<i>G262</i>	<i>52.2</i>	<i>4.7</i>
<i>G263</i>	<i>60.9</i>	<i>3.8</i>
<i>G264</i>	<i>48.9</i>	<i>5.8</i>
<i>G265</i>	<i>44.7</i>	<i>11.1</i>
<i>G266</i>	<i>47.0</i>	<i>7.8</i>
<i>G267</i>	<i>58.9</i>	<i>3.1</i>

FIG. 15C

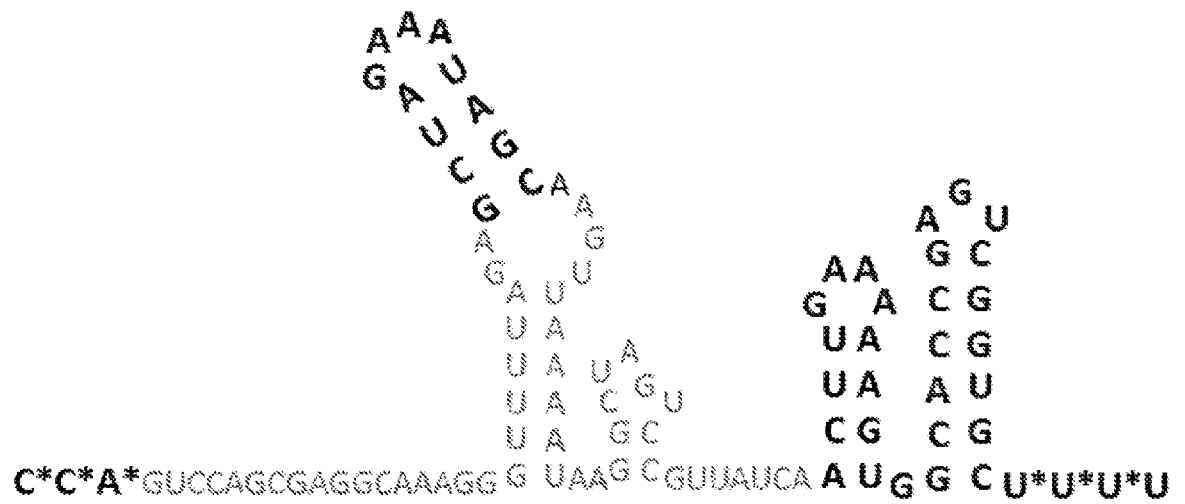


* = Fosforotioato

sgRNA modificado com extremidade

G000209

FIG. 15D



* = Fosforotioato

sgRNA altamente modificado

G000267

FIG. 15E

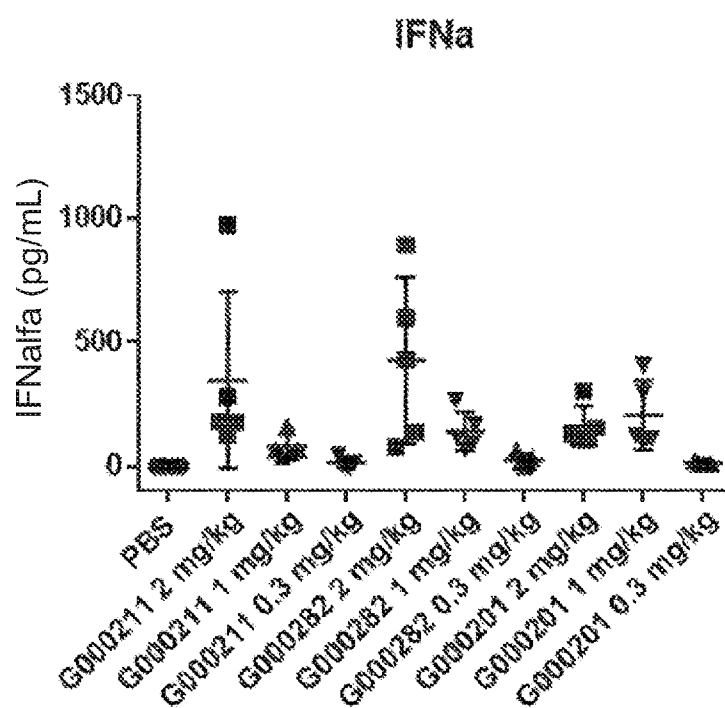


FIG. 16A

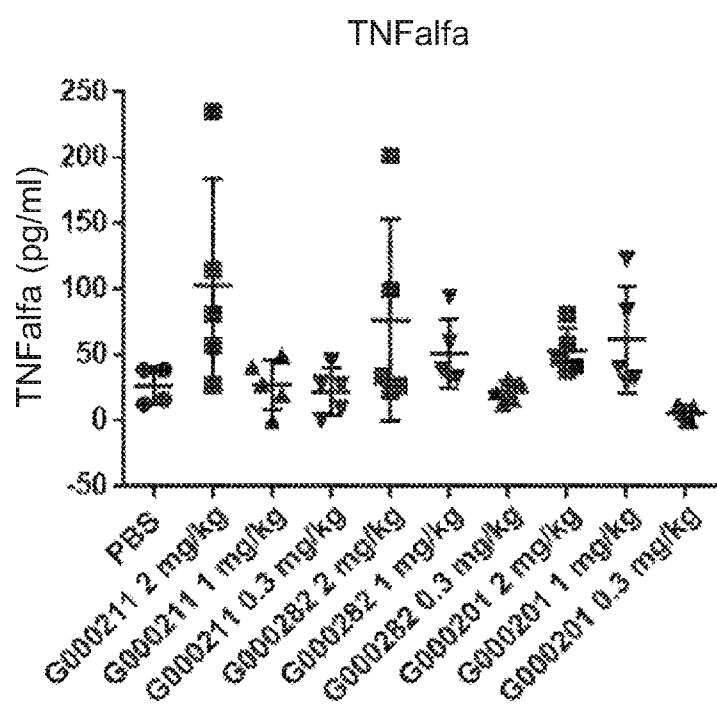


FIG. 16B

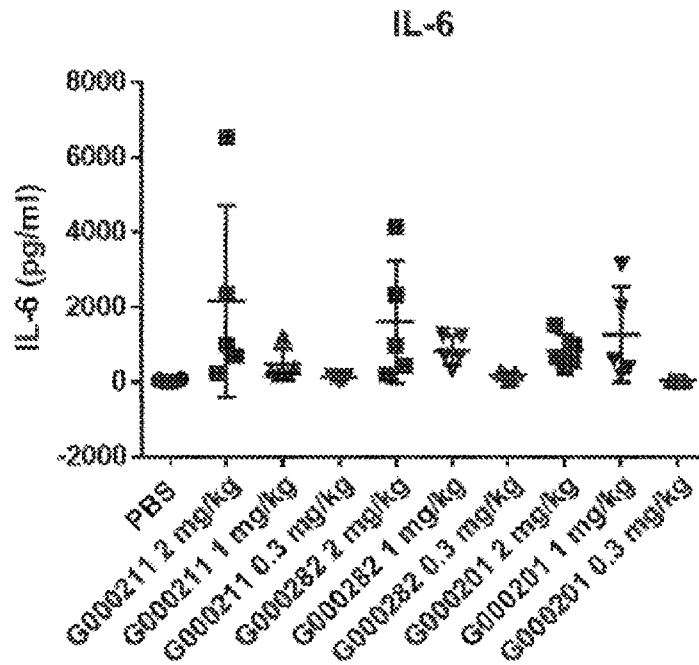


FIG. 16C

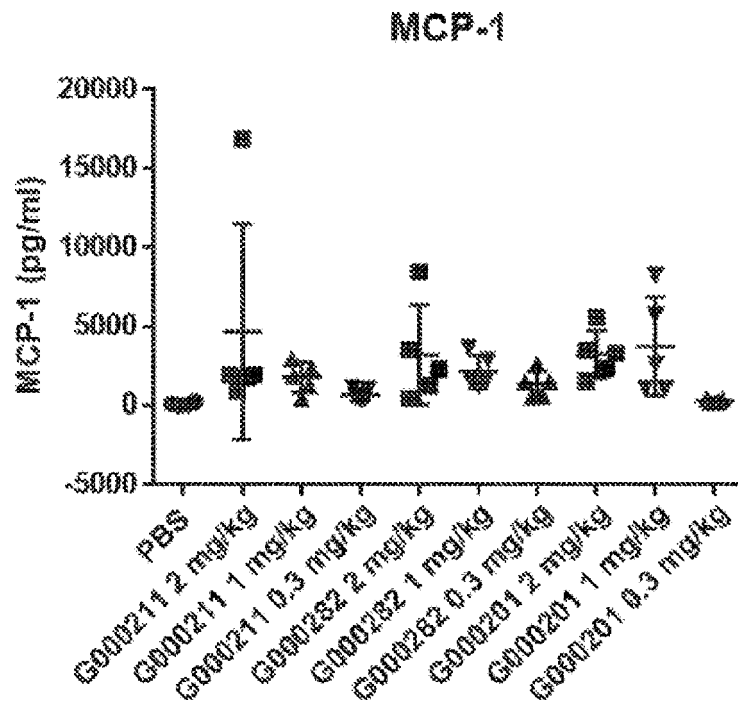


FIG. 16D

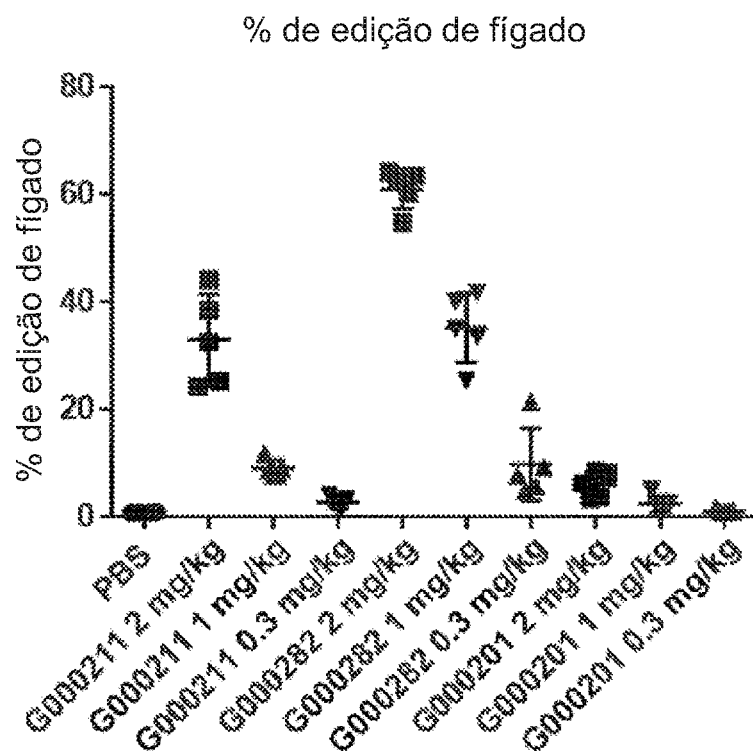


FIG. 17A

	Média de % de edição	Desv. Padrão
PBS	0.8370155	0.03184162
G211 2 mg/kg	32.89082	8.520595
G211 1 mg/kg	9.024511	1.640143
G211 0.3 mg/kg	2.762495	0.9668095
G282 2 mg/kg	60.99886	3.792423
G282 1 mg/kg	35.13641	6.434229
G282 0.3 mg/kg	9.812781	6.713302
G284 2 mg/kg	6.007987	2.434861
G284 1 mg/kg	2.413099	1.540902
G284 0.3 mg/kg	1.130903	0.3189707

FIG. 17B

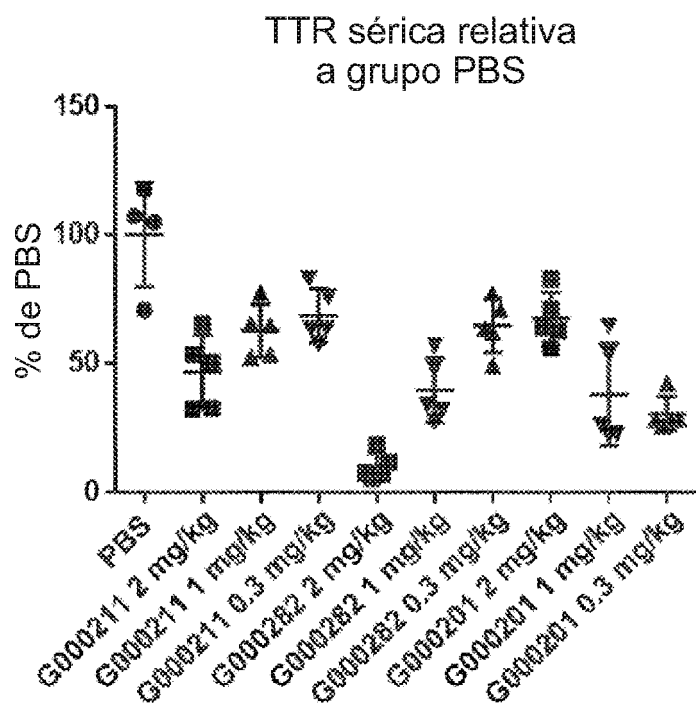


FIG. 17C

	Média de % de redução do TTR	Desv. Padrão
PBS	100.000	20.31276
G211 2 mg/kg	46.73565	14.33137
G211 1 mg/kg	62.66805	10.30656
G211 0.3 mg/kg	68.51203	10.40399
G282 2 mg/kg	9.890765	5.288372
G282 1 mg/kg	39.58118	12.35095
G282 0.3 mg/kg	64.59702	10.51861
G284 2 mg/kg	67.28742	10.217
G284 1 mg/kg	37.76873	19.77835
G284 0.3 mg/kg	30.4822	6.612638

FIG. 17D

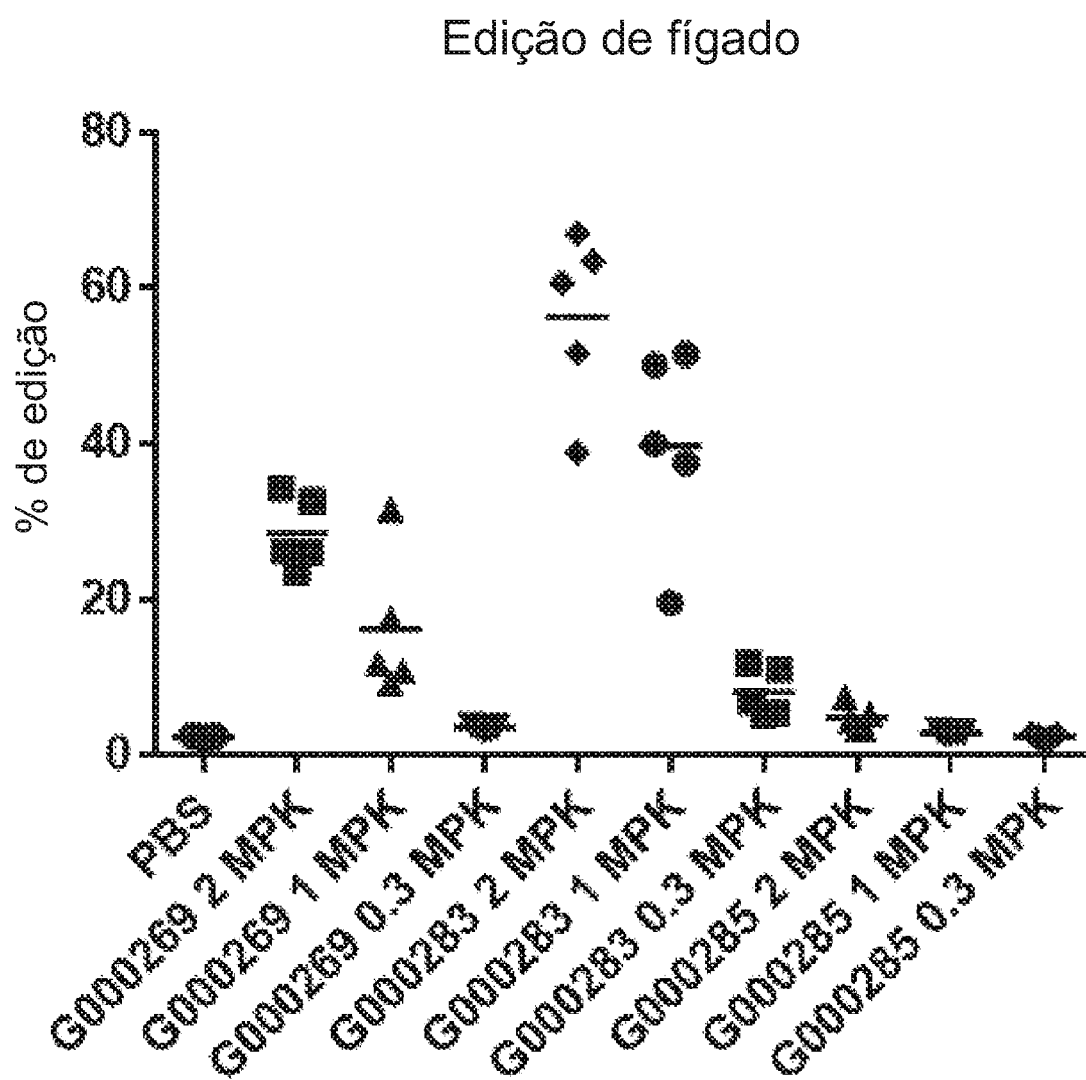


FIG. 18A

Guia	Dose	Média de % de edição
<i>PBS</i>		<i>2.38</i>
<i>G269</i>	<i>2 MPK</i>	<i>28.57</i>
	<i>1 MPK</i>	<i>16.21</i>
	<i>0.3 MPK</i>	<i>3.54</i>
<i>G283</i>	<i>2 MPK</i>	<i>56.32</i>
	<i>1 MPK</i>	<i>39.73</i>
	<i>0.3 MPK</i>	<i>8.08</i>
<i>G285</i>	<i>2 MPK</i>	<i>4.80</i>
	<i>1 MPK</i>	<i>2.90</i>
	<i>0.3 MPK</i>	<i>2.44</i>

FIG. 18B

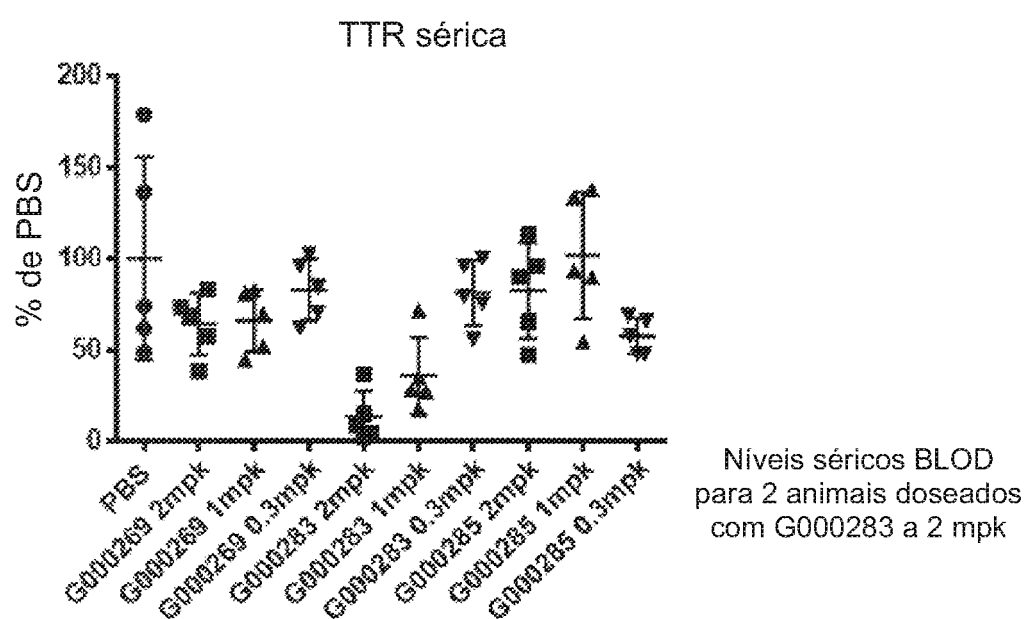


FIG. 18C

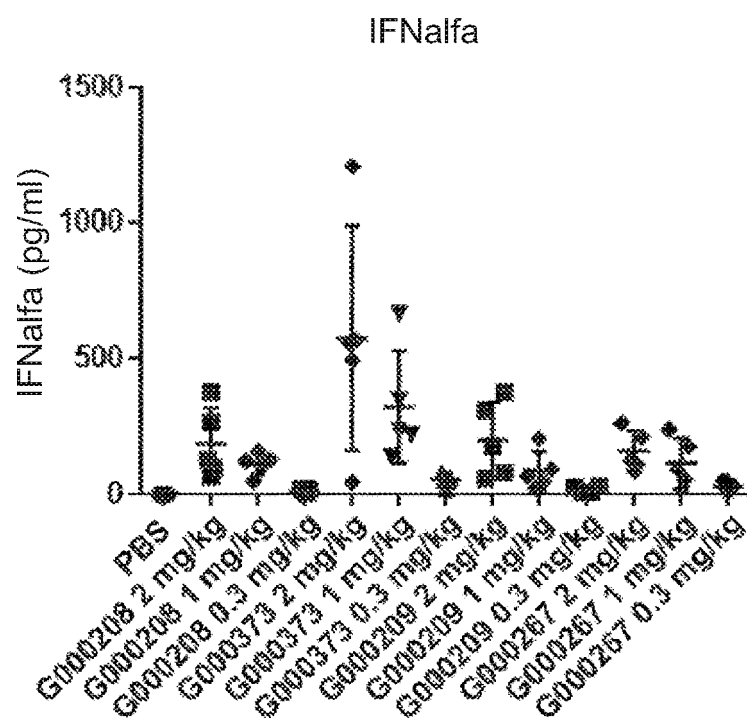


FIG. 19A

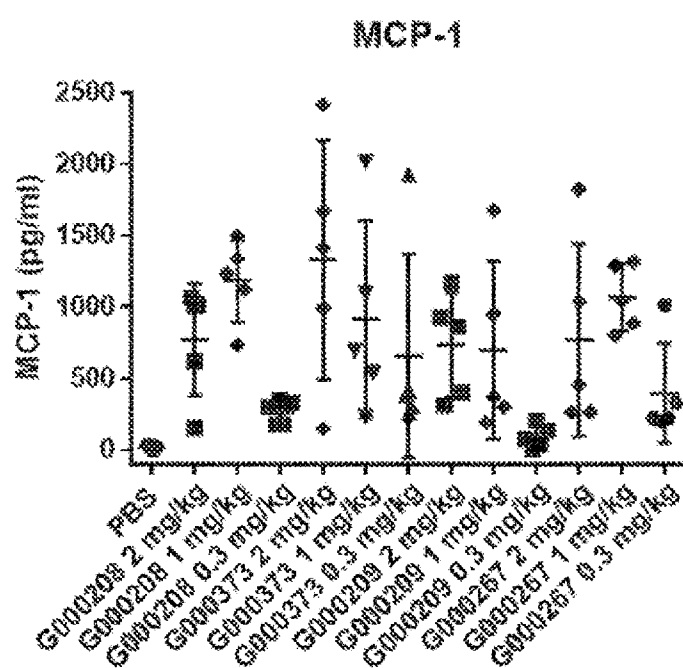


FIG. 19B

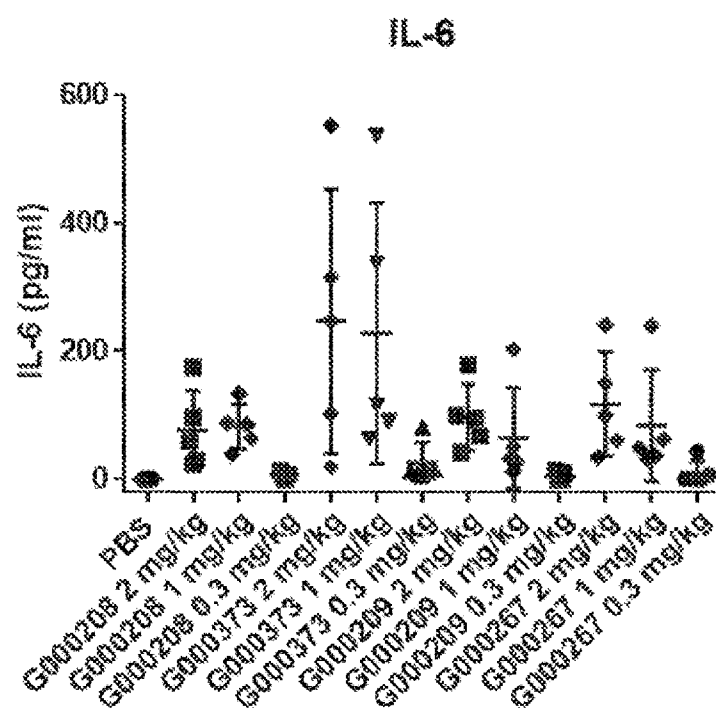


FIG. 19C

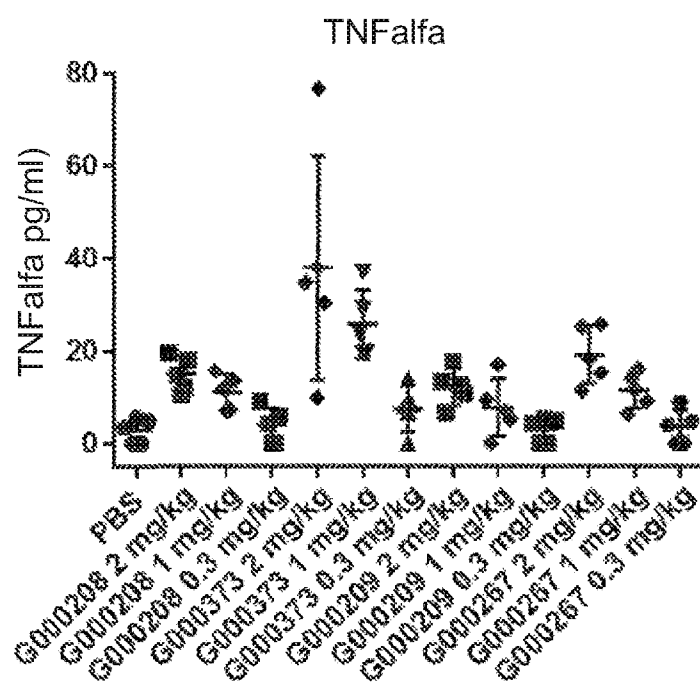


FIG. 19D

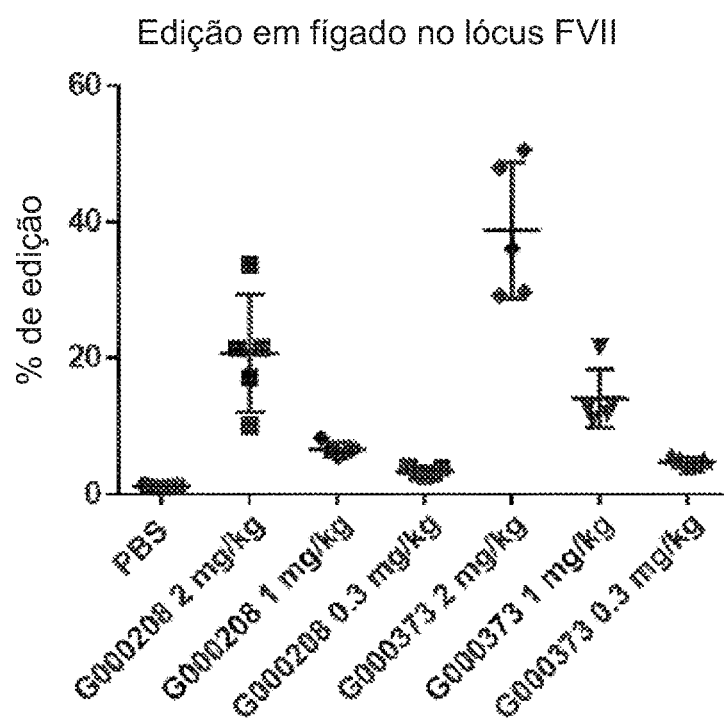


FIG. 20A

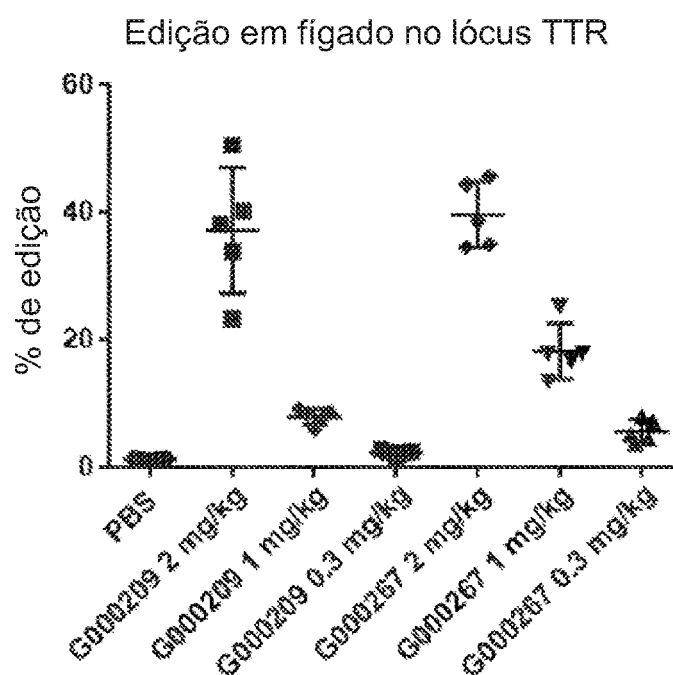


FIG. 20B

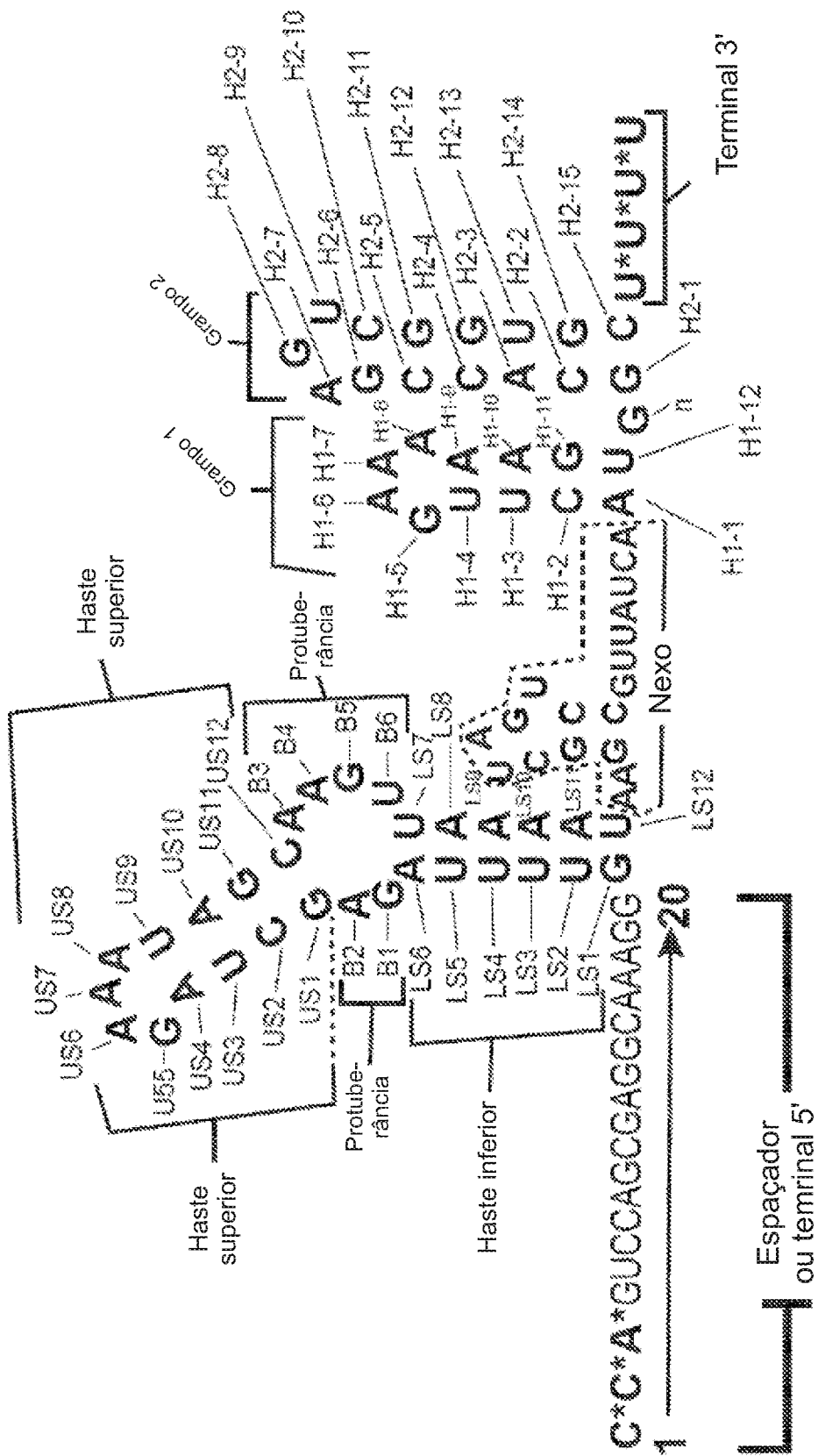
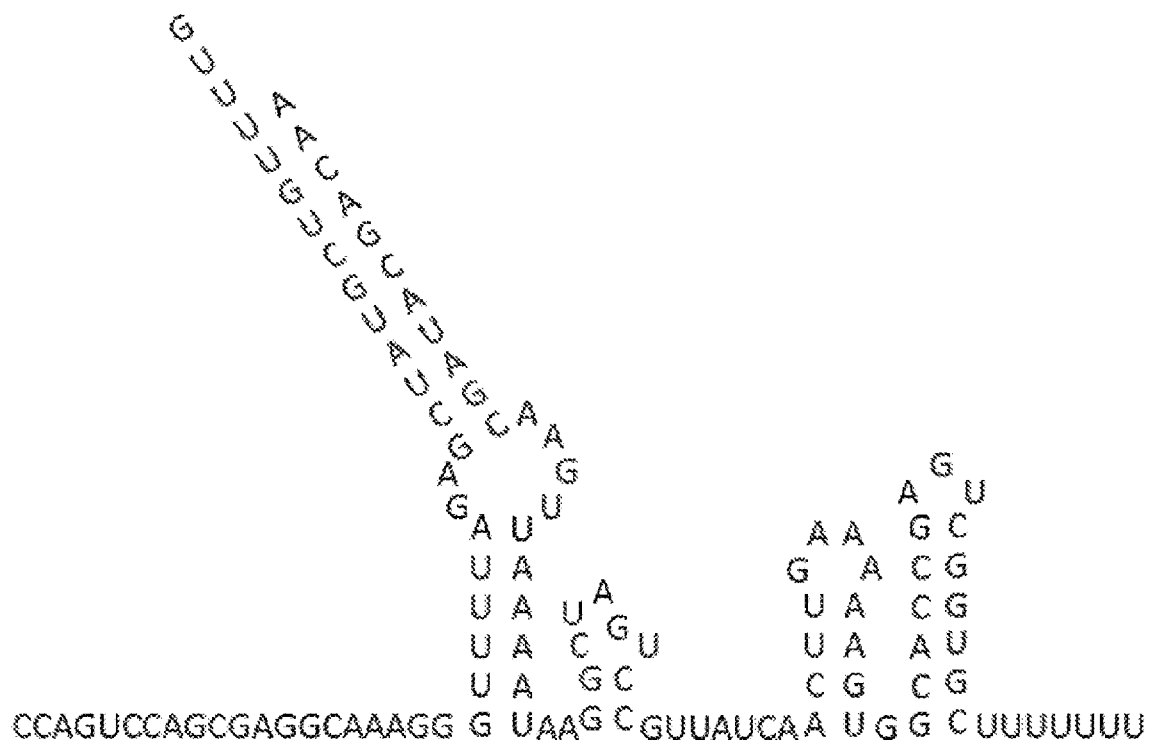


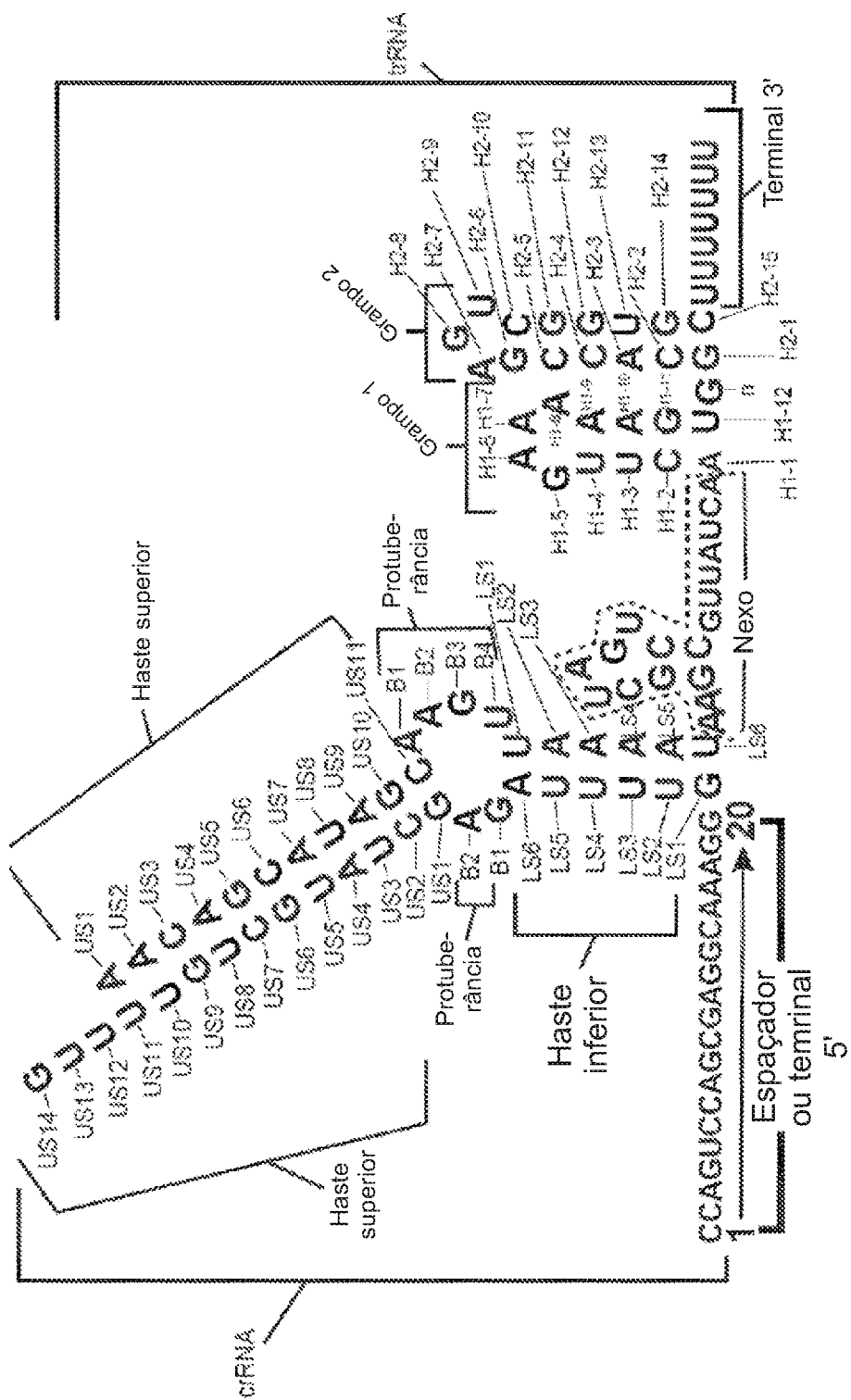
FIG. 21A



dgRNA

CR000686 + TR000002

FIG. 21B



2000

FIG. 21C

Edição dde fígado – todos mods TTR

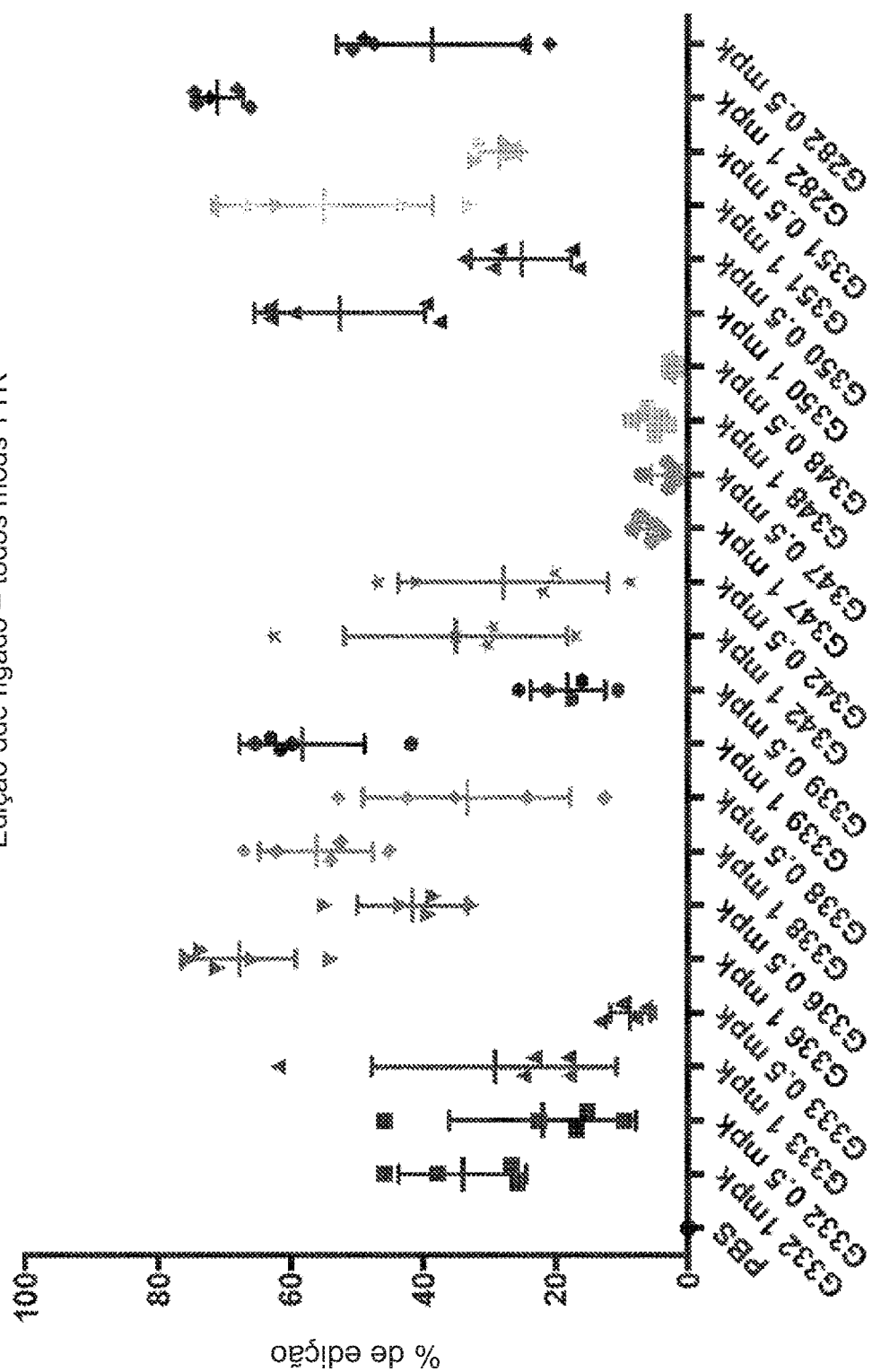


FIG. 22A

Grupo	Média de % de edição	Desv. Padrão
PBS	0	0
G332 1mpk	34.14	9.575
G332 0.5 mpk	22.08	14.13
G333 1 mpk	29.28	18.53
G333 0.5 mpk	8.801	3.082
G336 1 mpk	67.92	8.609
G336 0.5 mpk	41.72	8.277
G338 1 mpk	56.25	8.561
G338 0.5 mpk	33.48	15.63
G339 1 mpk	58.36	9.444
G339 0.5 mpk	18.23	5.654
G342 1 mpk	35.12	16.84
G342 0.5 mpk	27.94	15.83
G347 1 mpk	6.073	1.825
G347 0.5 mpk	3.399	2.13
G348 1 mpk	5.464	2.171
G348 0.5 mpk	2.333	0.448
G350 1 mpk	52.66	12.88
G350 0.5 mpk	25.27	7.695
G351 1 mpk	54.94	16.24
G351 0.5 mpk	28.52	3.014
G282 1 mpk	71.08	3.789
G282 0.5 mpk	38.6	14.45

FIG. 22B

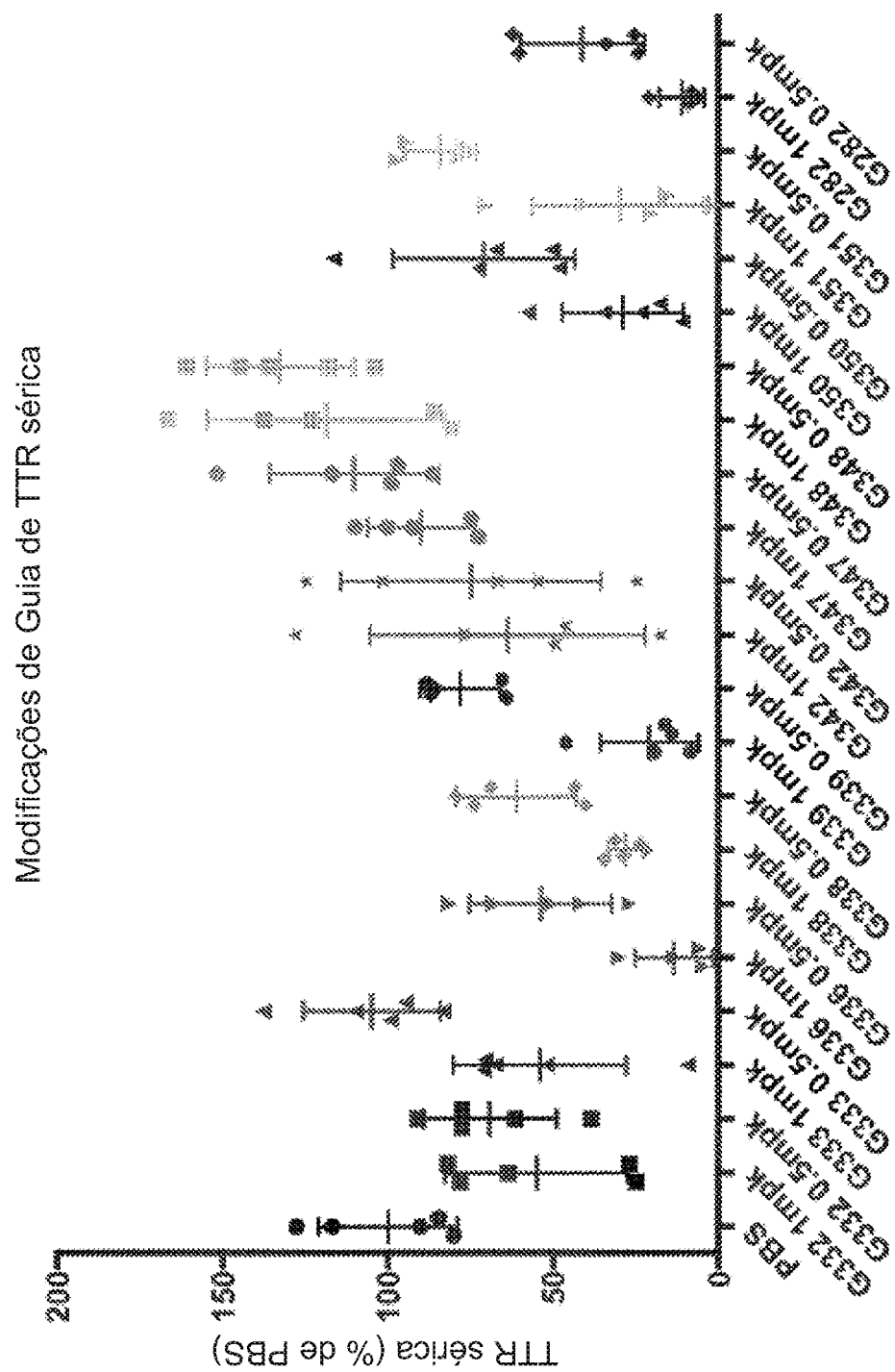


FIG. 22C

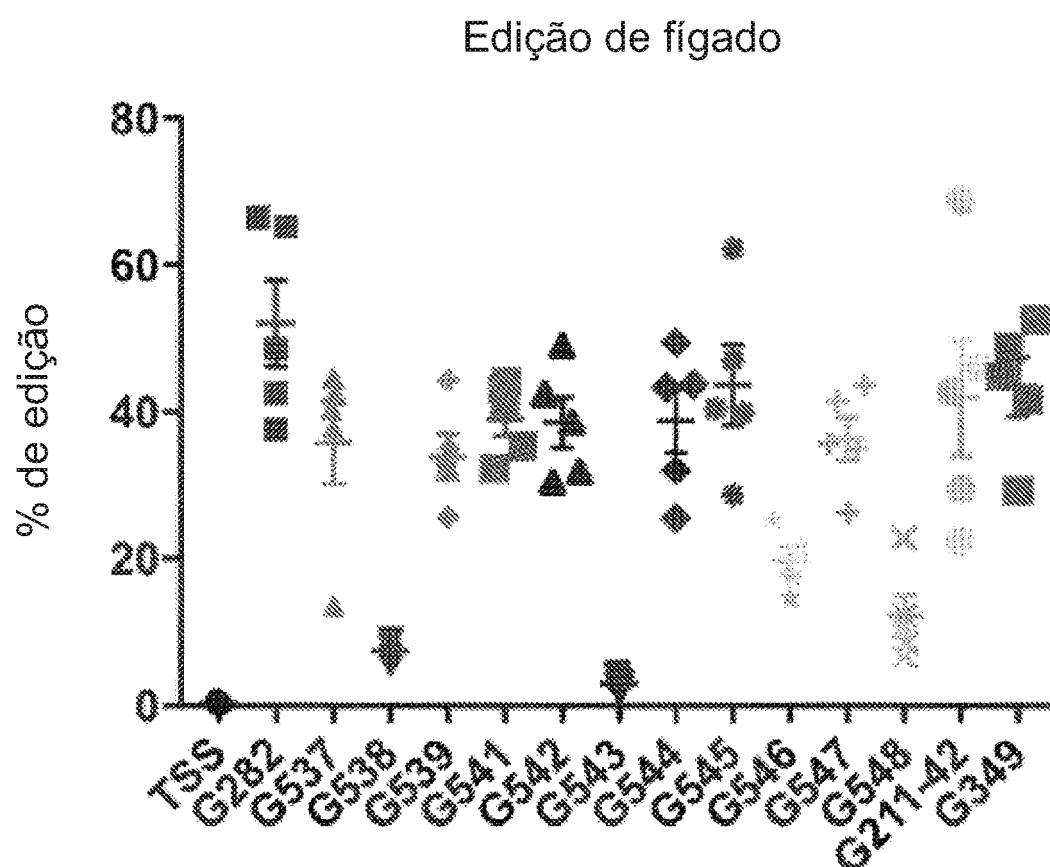


FIG. 23A

Guia	Média de % de edição
TSS	0.32
G282	52.06
G537	35.78
G538	7.5
G539	33.9
G541	39.04
G542	38.54
G543	2.96
G544	38.78
G545	43.6
G546	19.74
G547	36.44
G548	12.2
G211-42	42.04
G349	43.48

FIG. 23B

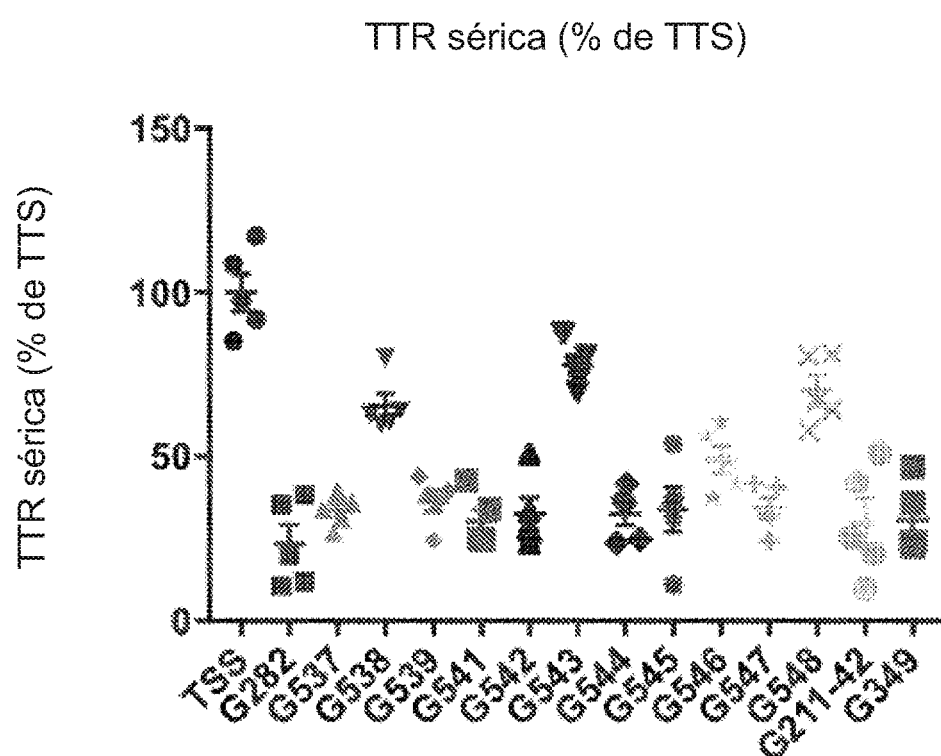


FIG. 23C

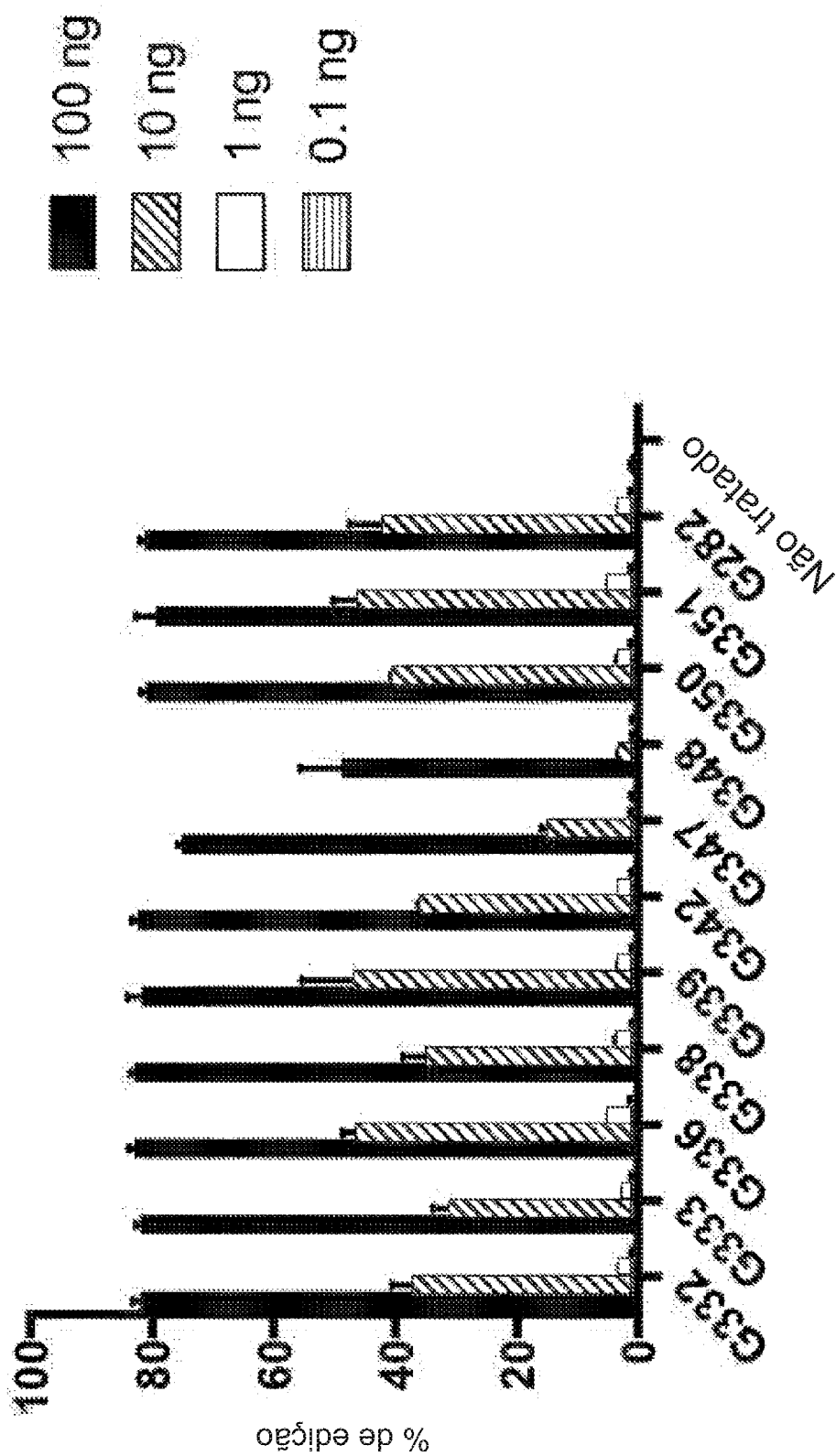


FIG. 24A

Normalizar de transformação de cálc. EC50

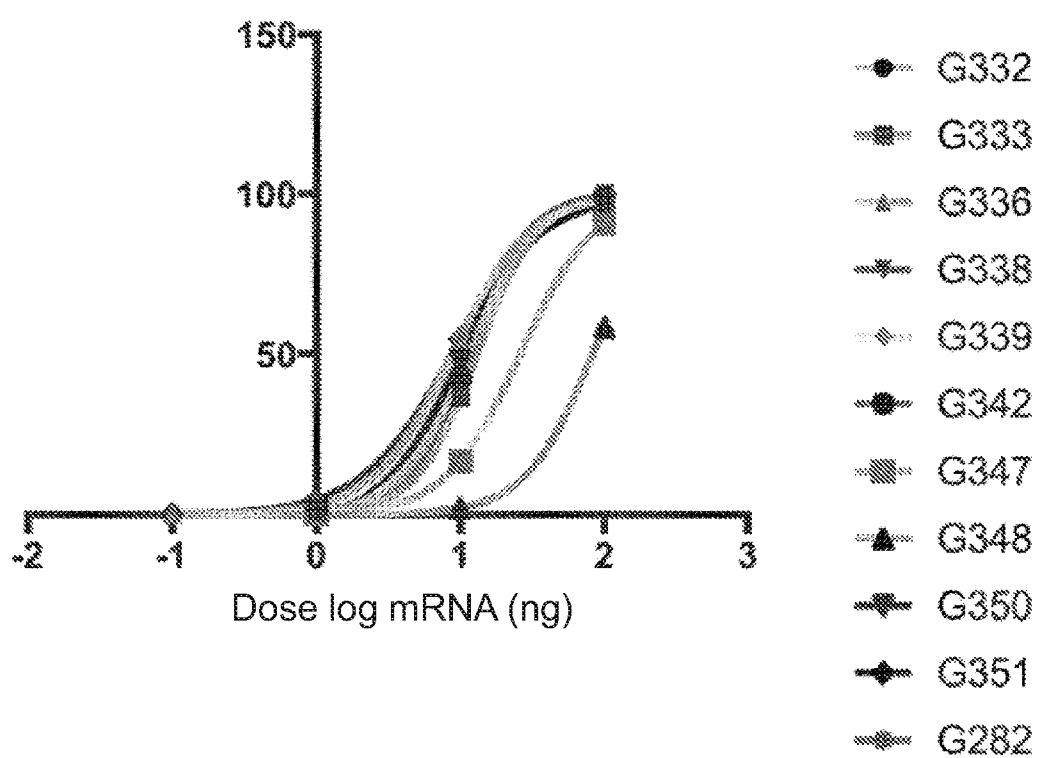


FIG. 24B

Guia	EC50
G332	11.42
G333	13.07
G336	8.735
G338	11.80
G339	8.778
G342	11.60
G347	26.07
G348	83.09
G350	10.57
G351	8.797
G282	10.04

FIG. 24C

RESUMO

Patente de Invenção: **"RNAS GUIAS MODIFICADOS"**.

Esta descrição refere-se a RNAs guias simples e duplos modificados tendo atividade *in vitro* e *in vivo* melhorada em métodos de edição de gene.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P240839 ListSeq.txt
- Data de Geração do Código: 04/06/2019
- Hora de Geração do Código: 12:22:50
- Código de Controle:
 - Campo 1: F656A3BA35B3D824
 - Campo 2: 328C877EC7BF2A94