



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

(21) BR 112019016205-4 A2



(22) Data do Depósito: 05/02/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/07/2020

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE HEMOGLOBINOPATIAS

(51) Int. Cl.: C12N 15/113; A61K 31/713; A61P 7/00.

(30) Prioridade Unionista: 06/02/2017 US 62/455,464.

(71) Depositante(es): NOVARTIS AG; INTELLIA THERAPEUTICS, INC..

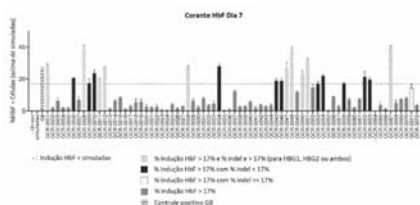
(72) Inventor(es): CRAIG STEPHEN MICKANIN; CHRISTIAN SCHMEDT; JENNIFER SNEAD; SUSAN C. STEVENSON; YI YANG.

(86) Pedido PCT: PCT IB2018050712 de 05/02/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/142364 de 09/08/2018

(85) Data da Fase Nacional: 05/08/2019

(57) Resumo: A presente invenção está dirigida a sistemas de edição do genoma, reagentes e métodos para o tratamento de hemoglobinopatias.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE
HEMOGLOBINOPATIAS".**

REFERÊNCIAS CRUZADAS AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade para o pedido de patente Provisório US 62/455,464, depositado a 6 de fevereiro de 2017, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida eletronicamente em formato ASCII e é deste modo incorporada por referência na sua totalidade. A referida cópia ASCII, criada a 30 de janeiro de 2018, é designada por PAT057603-WO-PCT_SL.txt e tem 258.837 bytes de tamanho.

ANTECEDENTES

[0003] As CRISPRs (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas Regularmente Intercaladas) evoluíram em bactérias como um sistema imunitário adaptativo para se defender contra-ataques virais. Após exposição a um vírus, pequenos segmentos de DNA viral são integrados no locus CRISPR do genoma bacteriano. O RNA é transcrito de uma porção do locus CRISPR que inclui a sequência viral. Esse RNA, que contém a sequência complementar ao genoma viral, medeia o direcionamento de uma proteína Cas9 para a sequência no genoma viral. A proteína Cas9 cliva e, desse modo, silencia o alvo viral.

[0004] Recentemente, o sistema CRISPR/Cas foi adaptado para edição de genoma em células eucarióticas. A introdução de quebra única específica do sítio (SSBs) ou quebra de cadeia dupla (DSBs) permite a alteração da sequência-alvo através de, por exemplo, união de extremidade não-homóloga (NHEJ) ou reparação dirigida por homologia (HDR).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0005] Sem estar limitado pela teoria, a invenção se baseia em parte na descoberta de que os sistemas CRISPR, por exemplo, sistemas Cas9 CRISPR, por exemplo, como aqui descritos, podem ser utilizados para modificar células (por exemplo, células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (HSPCs)), por exemplo, em uma região HPFH não deleção, como aqui descrito, para aumentar a expressão de hemoglobina fetal (HbF) e/ou diminuir a expressão de beta globina (por exemplo, um gene da globina beta com uma mutação causadora de doença), por exemplo, na descendência, por exemplo, descendência dos glóbulos vermelhos, das células modificadas, e que as células modificadas (por exemplo, HSPCs modificadas) podem ser usadas para tratar hemoglobinopatias, por exemplo, doença falciforme e beta-talassemia. Em um aspecto, foi surpreendentemente mostrado aqui que a introdução de sistemas de edição de genes, por exemplo, sistemas CRISPR, por exemplo, como aqui descrito, a células (por exemplo, HSPCs), que direcionam para regiões do genoma para as quais nenhum mapa conhecido de mutação ou deleção HPFH cria HSPCs modificadas (por exemplo, HSPCs que compreendem um ou mais indels, por exemplo, como descrito aqui) que são capazes de enxertar eficientemente em um organismo, persistir a longo prazo no organismo enxertado e diferenciar, incluindo em eritrócitos com expressão de hemoglobina aumentada. Além disso, estas HSPCs modificadas são capazes de serem cultivadas ex vivo, por exemplo, na presença de um expansor de células-tronco (por exemplo, como aqui descrito) sob condições que os levam a expandir e proliferar enquanto mantêm *stemness*. Quando os sistemas de edição de genes, por exemplo, sistemas CRISPR, por exemplo, como aqui descritos, são introduzidos em HPSCs derivadas de pacientes com doença falciforme, as células modificadas e sua descendência (por exemplo, descendência eritroide) mostram surpreendentemente não apenas a regulação positiva da

hemoglobina fetal, mas também mostram uma diminuição significativa da beta-globina falciforme e uma diminuição significativa no número de células falciformes e aumento do número de glóbulos vermelhos normais em relação às populações de células não modificadas.

[0006] Assim, em um aspecto, a invenção proporciona sistemas CRISPR (por exemplo, sistemas Cas CRISPR, por exemplo, sistemas Cas9 CRISPR, por exemplo, sistemas Cas9 CRISPR de *S. pyogenes*) compreendendo uma ou mais, por exemplo, uma molécula de gRNA como aqui descrito. Qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas pode ser utilizada em tais sistemas, e nos métodos e células aqui descritos.

[0007] Em um aspecto, a invenção fornece uma molécula de gRNA, incluindo um tracr e crRNA, em que o crRNA inclui um domínio-alvo que:

- a) é complementar com uma sequência-alvo de uma região HFPH não deleção (por exemplo, uma região HPFH não deleção humana);
- b) é complementar com uma sequência-alvo na sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,249,833 a Chr11:5,250,237, - cadeia, hg38;
- c) é complementar com uma sequência-alvo na sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,254,738 a Chr11:5,255,164, - cadeia, hg38;
- d) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,250,094-5,250,237, - cadeia, hg38;
- e) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,255,022-5,255,164, - cadeia, hg38;
- f) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11: 5,249,833-5,249,927, - cadeia, hg38;

g) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11: 5,254,738-5,254,851, - cadeia, hg38;

h) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,250,139-5,250,237, - cadeia, hg38; ou

i) suas combinações.

[0008] Em modalidades, o domínio-alvo inclui, por exemplo, consiste em, qualquer uma de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 72. Em modalidades, o domínio-alvo inclui, por exemplo, consiste em, qualquer uma de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, ou SEQ ID NO: 67. Em modalidades, o domínio-alvo inclui, por exemplo, consiste em, qualquer uma de a) SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 51, ou SEQ ID NO: 67; ou b) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, ou SEQ ID NO: 54. Em modalidades, a molécula de gRNA inclui um domínio-alvo que inclui, por exemplo, consiste em, SEQ ID NO: 8. Em modalidades, a molécula de gRNA inclui um domínio-alvo que inclui, por exemplo, consiste em, SEQ ID NO: 67. Em modalidades, a molécula de gRNA inclui um domínio-alvo que inclui (por exemplo, consiste em) um fragmento de qualquer das sequências acima.

[0009] Em qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados, a molécula de gRNA pode ainda ter regiões e/ou as propriedades aqui descritas. Em modalidades, a molécula de gRNA inclui um fragmento de qualquer um dos domínios-alvo acima mencionados. Em modalidades, o domínio-alvo inclui, por exemplo,

consiste em, 17, 18, 19 ou 20 ácidos nucleicos consecutivos de qualquer uma das sequências de domínio-alvo recitadas. Em modalidades, os 17, 18, 19 ou 20 ácidos nucleicos consecutivos de qualquer uma das sequências de domínio-alvo recitadas são os 17, 18, 19 ou 20 ácidos nucleicos consecutivos dispostos na extremidade 3' da sequência de domínio-alvo recitada. Em outras modalidades, os 17, 18, 19 ou 20 ácidos nucleicos consecutivos de qualquer uma das sequências de domínio-alvo recitadas são os 17, 18, 19 ou 20 ácidos nucleicos consecutivos dispostos na extremidade 5' da sequência de domínio-alvo recitada. Em outras modalidades, os 17, 18, 19 ou 20 ácidos nucleicos consecutivos de qualquer uma das sequências de domínio-alvo recitadas não incluem o ácido nucleico 5' ou 3' da sequência de domínio-alvo recitada. Em modalidades, o domínio-alvo consiste na sequência do domínio-alvo recitada.

[0010] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, a porção do crRNA e uma porção do tracr hibridiza para formar um mastro, incluindo a SEQ ID NO: 182 ou 183. Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, o mastro inclui adicionalmente uma primeira extensão do mastro, localizada 3' em relação à porção de crRNA do mastro, em que a referida primeira extensão do mastro inclui a SEQ ID NO: 184. Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, o mastro inclui adicionalmente uma segunda extensão do mastro, localizada 3' em relação à porção de crRNA do mastro e, se presente, a primeira extensão do mastro, em que a segunda extensão do mastro inclui a SEQ ID NO: 185.

[0011] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, o tracr inclui SEQ ID NO: 224, ou uma SEQ ID NO: 225. Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos

aspectos e modalidades acima mencionados, o tracr inclui SEQ ID NO: 232, opcionalmente incluindo adicionalmente, na extremidade 3', 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U) adicionais. Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, o crRNA inclui, de 5' a 3', [domínio-alvo]: a) SEQ ID NO: 182; b) SEQ ID NO: 183; c) SEQ ID NO: 199; d) SEQ ID NO: 200; e) SEQ ID NO: 201; f) SEQ ID NO: 202; ou g) SEQ ID NO: 226.

[0012] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, o tracr inclui, de 5' a 3': a) SEQ ID NO: 187; b) SEQ ID NO: 188; c) SEQ ID NO: 203; d) SEQ ID NO: 204; e) SEQ ID NO: 224; f) SEQ ID NO: 225; g) SEQ ID NO: 232; h) SEQ ID NO: 227; i) (SEQ ID NO: 228; j) SEQ ID NO: 229;; k) quaisquer de a) a j), acima, incluindo ainda, na extremidade 3', pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U), por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U); l) qualquer de a) a k), acima, incluindo ainda, na extremidade 3', pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A), por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A); ou m) qualquer de a) a l), acima, incluindo ainda, na extremidade 5' (por exemplo, no terminal 5'), pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A), por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A).

[0013] Em um aspecto, incluindo qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, o domínio-alvo e o tracr estão dispostos em moléculas de ácido nucleico separadas. Em um aspecto, incluindo qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, o domínio-alvo e o tracr estão dispostos em moléculas de ácido nucleico separadas e a molécula de ácido nucleico incluindo o domínio-alvo inclui a SEQ ID NO: 201, opcionalmente disposto imediatamente 3' em relação ao domínio-alvo, e a molécula de ácido nucleico incluindo o tracr inclui, por exemplo, consiste em, SEQ ID NO:

224. Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, a porção de crRNA do mastro inclui SEQ ID NO: 201, ou uma SEQ ID NO: 202. Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, o tracr inclui SEQ ID NO: 187 ou 188 e, opcionalmente, se uma primeira extensão do mastro estiver presente, uma primeira extensão de tracr, disposta em 5' em relação a SEQ ID NO: 187 ou 188, incluindo a referida primeira extensão de tracr a SEQ ID NO: 189.

[0014] Em um aspecto, incluindo qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, o domínio-alvo e o tracr estão dispostos em uma única molécula de ácido nucleico, por exemplo, em que o tracr é disposto em 3' no domínio-alvo. Em um aspecto, a molécula de gRNA inclui uma alça, disposta 3' em relação ao domínio-alvo e 5' em relação ao tracr. Em modalidades, a alça inclui a SEQ ID NO: 186. Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, a molécula de gRNA inclui, de 5' a 3', [domínio-alvo] -: (a) SEQ ID NO: 195; (b) SEQ ID NO: 196; (c) SEQ ID NO: 197; (d) SEQ ID NO: 198; (e) SEQ ID NO: 231; ou (f) qualquer um de (a) a (e), acima, incluindo adicionalmente, na extremidade 3', 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U).

[0015] Em um aspecto, incluindo qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, o domínio-alvo e o tracr estão dispostos em uma molécula de ácido nucleico única e em que a referida molécula de ácido nucleico inclui, por exemplo, consiste em, o referido domínio-alvo e SEQ ID NO: 231, opcionalmente disposto imediatamente 3' em relação ao referido domínio-alvo.

[0016] Em um aspecto, incluindo qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, uma, ou opcionalmente mais do que uma, das moléculas de ácido nucleico incluindo a molécula de gRNA inclui:

- a) uma ou mais, p.ex., três, modificações de fosforotioato na extremidade 3' da referida molécula ou moléculas de ácido nucleico;
- b) uma ou mais, p.ex., três, modificações de fosforotioato na extremidade 5' da referida molécula ou moléculas de ácido nucleico;
- c) uma ou mais, p.ex., três, modificações de 2'-O-metila na extremidade 3' da referida molécula ou moléculas de ácido nucleico;
- d) uma ou mais, p.ex., três, modificações de 2'-O-metila na extremidade 5' da referida molécula ou moléculas de ácido nucleico;
- e) uma modificação de 2' O-metila em cada um dos 4º, 3º e 2º resíduos em relação ao terminal 3' da referida molécula ou moléculas de ácido nucleico;
- f) uma modificação de 2' O-metila em cada um dos 4º, 3º e 2º resíduos em relação ao terminal 5' da referida molécula ou moléculas de ácido nucleico; ou
- f) qualquer combinação das mesmas.

[0017] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 74;
- (b) SEQ ID NO: 75; ou
- (c) SEQ ID NO: 76.

[0018] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 77 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 77 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 78 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 78 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0019] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 79;
- (b) SEQ ID NO: 80; ou
- (c) SEQ ID NO: 81.

[0020] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 82 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 82 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 83 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 83 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0021] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 84;
- (b) SEQ ID NO: 85; ou
- (c) SEQ ID NO: 86.

[0022] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 87 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 87 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 88 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 88 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0023] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 89;
- (b) SEQ ID NO: 90; ou
- (c) SEQ ID NO: 91.

[0024] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 92 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 92 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 93 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 93 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0025] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 94;
- (b) SEQ ID NO: 95; ou
- (c) SEQ ID NO: 96.

[0026] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 97 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 97 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 98 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 98 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0027] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 99;
- (b) SEQ ID NO: 100; ou
- (c) SEQ ID NO: 101.

[0028] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 102 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 102 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 103 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 103 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0029] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 104;
- (b) SEQ ID NO: 105; ou
- (c) SEQ ID NO: 106.

[0030] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 107 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 107 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 108 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 108 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0031] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 109;
- (b) SEQ ID NO: 110; ou
- (c) SEQ ID NO: 111.

[0032] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 112 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 112 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 113 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 113 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0033] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 114;
- (b) SEQ ID NO: 115; ou
- (c) SEQ ID NO: 116.

[0034] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 117 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 117 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 118 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 118 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0035] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 119;
- (b) SEQ ID NO: 120; ou
- (c) SEQ ID NO: 121.

[0036] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 122 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 122 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 123 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 123 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0037] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 124;
- (b) SEQ ID NO: 125; ou
- (c) SEQ ID NO: 126.

[0038] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 127 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 127 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 128 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 128 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0039] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 129;
- (b) SEQ ID NO: 130; ou
- (c) SEQ ID NO: 131.

[0040] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 132 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 132 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 133 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 133 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0041] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 134;
- (b) SEQ ID NO: 135; ou
- (c) SEQ ID NO: 136.

[0042] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 137 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 137 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 138 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 138 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0043] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 139;
- (b) SEQ ID NO: 140; ou
- (c) SEQ ID NO: 141.

[0044] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 142 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 142 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 143 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 143 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0045] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 144;
- (b) SEQ ID NO: 145; ou
- (c) SEQ ID NO: 146.

[0046] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 147 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 147 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 148 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 148 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0047] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 149;
- (b) SEQ ID NO: 150; ou
- (c) SEQ ID NO: 151.

[0048] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 152 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 152 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 153 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 153 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0049] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 154;
- (b) SEQ ID NO: 155; ou
- (c) SEQ ID NO: 156.

[0050] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 157 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 157 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 158 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 158 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0051] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 159;
- (b) SEQ ID NO: 160; ou
- (c) SEQ ID NO: 161.

[0052] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 162 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 162 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 163 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 163 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0053] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 164;
- (b) SEQ ID NO: 165; ou
- (c) SEQ ID NO: 166.

[0054] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 167 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 167 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 168 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 168 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0055] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 169;
- (b) SEQ ID NO: 170; ou
- (c) SEQ ID NO: 171.

[0056] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 172 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 172 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 173 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 173 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0057] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) SEQ ID NO: 174;
- (b) SEQ ID NO: 175; ou
- (c) SEQ ID NO: 176.

[0058] Em um aspecto, a invenção proporciona uma molécula de gRNA incluindo, por exemplo, que consiste em, a sequência:

- (a) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 177 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 177 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 178 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 178 e um tracr incluindo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0059] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, a invenção proporciona uma molécula de gRNA em que:

a) quando um sistema CRISPR (por exemplo, um RNP como descrito aqui) incluindo uma molécula de gRNA é introduzido em uma célula, um indel é formado na ou próximo da sequência-alvo complementar ao domínio-alvo da molécula de gRNA; e/ou

b) quando um sistema CRISPR (por exemplo, um RNP como aqui descrito) incluindo a molécula de gRNA é introduzido em uma célula, é criada uma deleção incluindo a sequência, por exemplo, incluindo substancialmente toda a sequência, entre uma sequência complementar ao domínio-alvo de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora HBG1 e uma sequência complementar ao domínio-alvo de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora HBG2. Em modalidades, o indel não inclui um nucleotídeo de um sítio de ligação do fator de transcrição ou HPFH não deleção.

[0060] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, a invenção fornece uma molécula de gRNA, em que um sistema CRISPR (p.ex., um RNP como descrito aqui) incluindo a molécula de gRNA é introduzido em uma população de células, um indel é formado na ou próximo da sequência-alvo complementar ao domínio-alvo da molécula de gRNA em pelo menos cerca de 15%, p.ex., pelo menos cerca de 17%, p.ex., pelo menos cerca de 20%, p.ex., pelo menos cerca de 30%, p.ex., pelo menos cerca de 40%, p.ex., pelo menos cerca de 50%, p.ex., pelo menos cerca de 55%, p.ex., pelo menos cerca de 60%, p.ex., pelo menos cerca de 70%, p.ex., pelo menos cerca de 75% das células da população. Em um aspecto,

incluindo em qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados, o indel inclui pelo menos um nucleotídeo de uma região promotora de HBG1 ou pelo menos um nucleotídeo de uma região promotora de HBG2. Em modalidades, pelo menos cerca de 15% das células da população incluem um indel que inclui pelo menos um nucleotídeo de uma região promotora de HBG1 e um indel que inclui pelo menos um nucleotídeo de uma região promotora de HBG2. Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, a percentagem das células da população, que incluem um indel que inclui pelo menos um nucleotídeo de uma região promotora de HBG1 difere da percentagem das células da população que incluem um indel que inclui pelo menos um nucleotídeo de uma região promotora de HBG2 em pelo menos cerca de 5%, por exemplo, pelo menos cerca de 10%, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, por exemplo, pelo menos cerca de 30%. Em modalidades, o indel é medido per sequenciamento de próxima geração (NGS).

[0061] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, a invenção proporciona uma molécula de gRNA, em que, quando um sistema CRISPR (p.ex., um RNP como descrito aqui) incluindo a molécula de gRNA é introduzido em uma célula, a expressão de hemoglobina fetal é aumentada na referida célula ou sua descendência, p.ex., sua descendência eritroide, p.ex., sua descendência de glóbulos vermelhos. Em modalidades, quando um sistema CRISPR (por exemplo, um RNP, tal como aqui descrito), incluindo a molécula de gRNA, é introduzido em uma população de células, a percentagem de células F na referida população, ou população da sua descendência, por exemplo, a sua descendência eritroide, por exemplo, a sua descendência de glóbulos vermelhos é aumentada em pelo menos cerca de 15%, por exemplo, pelo menos cerca de 17%, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, por

exemplo, pelo menos cerca de 25%, por exemplo, pelo menos cerca de 30%, por exemplo, pelo menos cerca de 35%, por exemplo, pelo menos cerca de 40%, relativamente à percentagem de células F em uma população de células à qual a molécula de gRNA não foi introduzida ou uma população da sua descendência, por exemplo, a sua descendência eritroide, por exemplo, a sua descendência de glóbulos vermelhos. Em modalidades, a referida célula ou sua descendência, p.ex., sua descendência eritroide, p.ex., sua descendência de glóbulos vermelhos, produz pelo menos cerca de 6 picogramas (p.ex., pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal por célula.

[0062] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, a invenção fornece uma molécula de gRNA, em que um sistema CRISPR (p.ex., um RNP como descrito aqui), incluindo uma molécula de gRNA, é introduzido em uma célula, por exemplo, não se formam indels fora do alvo fora das regiões promotoras de HBG1 e/ou HBG2 (por exemplo, dentro de um gene, por exemplo, uma região codificadora de um gene), por exemplo, como detectável por sequenciamento de próxima geração e/ou ensaio de inserção de nucleotídeos.

[0063] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, a invenção fornece uma molécula de gRNA, em que um sistema CRISPR (p.ex., um RNP como descrito aqui), incluindo uma molécula de gRNA, é introduzido em uma população de células, nenhum indel fora do alvo, por exemplo, nenhum indel fora do alvo fora das regiões promotoras de HBG1 e/ou HBG2 (por exemplo, dentro de um gene, por exemplo, uma região codificadora de um gene), é detectado em mais de cerca de 5%, por exemplo, mais do

que cerca de 1%, por exemplo, mais de cerca de 0,1%, por exemplo, mais de cerca de 0,01% das células da população de células, por exemplo, como detectável por sequenciamento de próxima geração e/ou ensaio de inserção de nucleotídeos.

[0064] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados, a célula é (ou a população de células inclui) uma célula de mamífero, primata ou humana, por exemplo, é uma célula humana, por exemplo, a célula é (ou população de células inclui) uma HSPC, por exemplo, a HSPC é CD34+, por exemplo, a HSPC é CD34+CD90+. Em modalidades, a célula é autóloga com respeito a um paciente a ser administrado com a referida célula. Em outras modalidades, a célula é alogeneica com respeito a um paciente a ser administrado com a referida célula.

[0065] Em um aspecto, as moléculas de gRNA, sistemas de edição de genomas (por exemplo, sistemas CRISPR) e/ou métodos descritos aqui referem-se a células, por exemplo, como aqui descrito, que incluem ou resultam em uma ou mais das seguintes propriedades:

(a) pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% das células de uma população de células aqui descritas, compreendem um indel em ou perto de uma sequência de DNA genômico complementar ao domínio-alvo da molécula de gRNA descrita aqui, opcionalmente em que o indel é selecionado de um indel listado na Tabela 2-7, opcionalmente em que nenhuma célula da população compreende uma deleção de um nucleotídeo disposto entre 5,250,092 e 5,249,833, - cadeia (hg38);

(b) uma célula (por exemplo, população de células) aqui descrita é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada de uma linhagem

eritroide (por exemplo, um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada exibe um nível aumentado de hemoglobina fetal, por exemplo, em relação a uma célula (por exemplo, população de células) inalterada;

(c) uma população de células aqui descrita é capaz de se diferenciar em uma população de células diferenciadas, por exemplo, uma população de células de uma linhagem eritroide (por exemplo, uma população de glóbulos vermelhos) e em que a referida população de células diferenciadas tem uma percentagem aumentada de células F (por exemplo, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30% ou pelo menos cerca de 40% de células F mais elevada), por exemplo, em relação a uma população de células inalteradas;

(d) uma célula (por exemplo, uma população de células) aqui descrita é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada, por exemplo, uma célula de uma linhagem eritroide (por exemplo, um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada (por exemplo, uma população de células diferenciadas) produz pelo menos cerca de 6 picogramas (por exemplo, pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal por célula;

(e) não se formam indels fora do alvo em uma célula aqui descrita, por exemplo, não se formam indels fora do alvo fora das regiões promotoras de HBG1 e/ou HBG2 (por exemplo, um gene, por exemplo, uma região codificadora de um gene), por exemplo, como detectáveis por sequenciamento de próxima geração e/ou ensaio de inserção de nucleotídeos;

(f) não é detectado indel fora do alvo, por exemplo, não é detectado indel fora do alvo fora das regiões promotoras HBG1 e/ou HBG2 (por

exemplo, dentro de um gene, por exemplo, uma região codificadora de um gene) em mais do que cerca de 5%, por exemplo, mais do que cerca de 1%, por exemplo, mais do que cerca de 0,1 %, por exemplo, mais do que cerca de 0,01% das células de uma população de células aqui descritas, por exemplo, como detectável por sequenciamento de próxima geração e/ou um ensaio de inserção de nucleotídeos;

(g) uma célula aqui descrita ou a sua descendência é detectável, por exemplo, detectável na medula óssea ou detectável no sangue periférico, em um paciente ao qual é transplantada a mais de 16 semanas, a mais de 20 semanas ou a mais de 24 semanas após o transplante, opcionalmente detectado por detecção de um indel em uma ou perto de uma sequência de DNA genômico complementar ao domínio-alvo de uma molécula de gRNA, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1-22, opcionalmente em que o indel é selecionado a partir de um indel listado na Tabela 2-7, opcionalmente em que o indel é um indel de deleção grande.

(h) uma população de células aqui descrita é capaz de se diferenciar em uma população de células diferenciadas, por exemplo, uma população de células de uma linhagem eritroide (por exemplo, uma população de glóbulos vermelhos) e em que a referida população de células diferenciadas inclui uma percentagem reduzida de células falciformes (por exemplo, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 90% menor percentagem de células falciformes), por exemplo, em relação a uma população de células inalteradas; e/ou

(i) uma célula ou população de células aqui descrita é capaz de se diferenciar em uma população de células diferenciadas, por exemplo, uma população de células de uma linhagem eritroide (por exemplo, uma

população de glóbulos vermelhos) e em que a referida população de células diferenciadas inclui células que produzem um nível reduzido (por exemplo, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 90% do nível mais baixo) de hemoglobina falciforme (HbS), por exemplo, em relação a uma população de células inalteradas.

[0066] Em um aspecto, a invenção proporciona uma composição incluindo:

- 1) uma ou mais moléculas de gRNA (incluindo uma primeira molécula de gRNA) aqui descrito, por exemplo, de qualquer um dos aspectos e modalidades da molécula de gRNA mencionada acima, e uma molécula Cas9, por exemplo, aqui descrita;
- 2) uma ou mais moléculas de gRNA (incluindo uma primeira molécula de gRNA) aqui descrito, por exemplo, de qualquer um dos aspectos e modalidades da molécula de gRNA mencionada acima, e ácido nucleico codificando uma molécula Cas9, por exemplo, aqui descrita;
- 3) ácido nucleico codificando uma ou mais moléculas de gRNA (incluindo uma primeira molécula de gRNA) aqui descrito, por exemplo, de qualquer um dos aspectos e modalidades da molécula de gRNA mencionada acima, e uma molécula Cas9, por exemplo, aqui descrita;
- 4) ácido nucleico codificando uma ou mais moléculas de gRNA (incluindo uma primeira molécula de gRNA) aqui descrito, por exemplo, de qualquer um dos aspectos e modalidades da molécula de gRNA mencionada acima, e ácido nucleico codificando uma molécula Cas9, por exemplo, aqui descrita; ou
- 5) qualquer um de 1) a 4), acima, e um ácido nucleico molde; ou
- 6) qualquer um de 1) a 4) acima, e ácido nucleico incluindo sequência codificando um ácido nucleico molde.

[0067] Em um aspecto, a invenção proporciona uma composição incluindo uma primeira molécula de gRNA aqui descrita, por exemplo, de qualquer um dos aspectos e modalidades de gRNA acima mencionados, incluindo ainda uma molécula Cas9, por exemplo, aqui descrita, por exemplo, em que a molécula Cas9 é Cas9 ativa ou inativa de *s. pyogenes*, por exemplo, em que a molécula Cas9 inclui SEQ ID NO: 205. Em aspectos, a molécula Cas9 inclui, por exemplo, consiste em: (a) SEQ ID NO: 233; (b) SEQ ID NO: 234; (c) SEQ ID NO: 235; (d) SEQ ID NO: 236; (e) SEQ ID NO: 237; (f) SEQ ID NO: 238; (g) SEQ ID NO: 239; (h) SEQ ID NO: 240; (i) SEQ ID NO: 241; (j) SEQ ID NO: 242; (k) SEQ ID NO: 243 ou (l) SEQ ID NO: 244.

[0068] Em um aspecto, incluindo qualquer um dos aspectos e modalidades da composição acima mencionados, a primeira molécula de gRNA e a molécula Cas9 estão presentes em um complexo de proteína ribonuclear (RNP).

[0069] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição, a invenção proporciona uma composição incluindo ainda uma segunda molécula de gRNA; uma segunda molécula de gRNA e uma terceira molécula de gRNA; ou uma segunda molécula de gRNA, opcionalmente, uma terceira molécula de gRNA e, opcionalmente, uma quarta molécula de gRNA, em que a segunda molécula de gRNA, a terceira molécula de gRNA opcional e a quarta molécula de gRNA opcional são uma molécula de gRNA aqui descrita, por exemplo, são uma molécula de gRNA de qualquer um dos aspectos e modalidades acima descritos da molécula de gRNA e em que cada molécula de gRNA da composição é complementar a uma sequência-alvo diferente. Em modalidades, duas ou mais da primeira molécula de gRNA, da segunda molécula de gRNA, da terceira molécula de gRNA opcional e da quarta molécula de gRNA opcional são complementares com sequências-alvo dentro do mesmo

gene ou região. Em modalidades, a primeira molécula de gRNA, a segunda molécula de gRNA, a terceira molécula de gRNA opcional e a quarta molécula de gRNA opcional são complementares com sequências-alvo separadas por não mais do que 6000 nucleotídeos, não mais do que 5000 nucleotídeos, não mais do que 500, não mais do que 400 nucleotídeos, não mais do que 300 nucleotídeos, não mais do que 200 nucleotídeos, não mais do que 100 nucleotídeos, não mais do que 90 nucleotídeos, não mais do que 80 nucleotídeos, não mais do que 70 nucleotídeos, não mais do que 60 nucleotídeos, não mais do que 50 nucleotídeos, não mais do que 40 nucleotídeos, não mais do que 30 nucleotídeos, não mais do que 20 nucleotídeos ou não mais do que 10 nucleotídeos. Em modalidades, duas ou mais da primeira molécula de gRNA, a segunda molécula de gRNA, a terceira molécula gRNA opcional e a quarta molécula de gRNA opcional, incluem, pelo menos, uma molécula de gRNA que inclui um domínio-alvo complementar a uma sequência-alvo de uma região promotora de HBG1 e pelo menos uma molécula de gRNA que inclui um domínio-alvo complementar a uma sequência-alvo de uma região promotora de HBG2. Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição, a composição inclui (por exemplo, consiste em) uma primeira molécula de gRNA e uma segunda molécula de gRNA, em que a primeira molécula de gRNA e segunda molécula de gRNA são: (a) independentemente selecionadas e direcionadas para uma região HPFH não deleção, por exemplo, aqui descrito, e são complementares a diferentes sequências-alvo; (b) independentemente selecionadas a partir das moléculas de gRNA da Tabela 1, e são complementares a diferentes sequências-alvo; (c) independentemente selecionadas das moléculas de gRNA da Tabela 2, e são complementares a diferentes sequências-alvo; ou (d) independentemente selecionadas das moléculas de gRNA da Tabela 3a

e são complementares às diferentes sequências-alvo, (e) independentemente selecionadas das moléculas de gRNA da Tabela 3b e são complementares às diferentes sequências-alvo; ou (f) independentemente selecionadas das moléculas de gRNA de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados, e são complementares às diferentes sequências-alvo.

[0070] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição, a composição inclui uma primeira molécula de gRNA e uma segunda molécula de gRNA, em que:

a) a primeira molécula de gRNA é complementar a uma sequência-alvo incluindo pelo menos 1 nucleotídeo (por exemplo, incluindo 20 nucleotídeos consecutivos) em:

- i) Chr11:5,249,833 a Chr11:5,250,237 (hg38);
- ii) Chr11:5,250,094-5,250,237 (hg38);
- iii) Chr11: 5,249,833-5,249,927 (hg38); ou
- iv) Chr11:5,250,139-5,250,237 (hg38);

b) a segunda molécula de gRNA é complementar a uma sequência-alvo incluindo pelo menos 1 nucleotídeo (por exemplo, compreendendo 20 nucleotídeos consecutivos) em:

- i) Chr11:5,254,738 a Chr11:5,255,164 (hg38);
- ii) Chr11:5,255,022-5,255,164 (hg38); ou
- iii) Chr11: 5,254,738-5,254,851 (hg38).

[0071] Em um aspecto, no que diz respeito aos componentes da molécula de gRNA da composição, a composição consiste em uma primeira molécula de gRNA e uma segunda molécula de gRNA.

[0072] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição, cada uma das referidas moléculas de gRNA encontra-se em um complexo de proteína ribonuclear (RNP) com uma molécula Cas9, por exemplo, aqui descrita.

[0073] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição, a composição inclui um ácido nucleico molde, em que o ácido nucleico molde inclui um nucleotídeo que corresponde a um nucleotídeo na ou perto da sequência-alvo da primeira molécula de gRNA. Em modalidades, o ácido nucleico molde inclui ácido nucleico que codifica: (a) beta globina humana, p.ex., beta globina humana incluindo uma ou mais das mutações G16D, E22A e T87Q ou fragmento da mesma; ou (b) globina gama humana, ou seu fragmento.

[0074] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição, a composição é formulada em um meio adequado para eletroporação.

[0075] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição, cada uma das referidas moléculas de gRNA da referida composição está em um RNP com uma molécula Cas9 descrita aqui e em que cada um dos referidos RNP está a uma concentração de menos do que cerca de 10 uM, p.ex., menos do que cerca de 3 uM, p.ex., menos do que cerca de 1 uM, p.ex., menos do que cerca de 0,5 uM, p.ex., menos do que cerca de 0,3 uM, p.ex., menos do que cerca de 0,1 uM. Em modalidades o RNP está a uma concentração de cerca de 1 uM. Em modalidades o RNP está a uma concentração de cerca de 2 uM. Em modalidades, a referida concentração é a concentração de RNP em uma composição que compreende as células, por exemplo, como aqui descrito, opcionalmente, em que a composição que compreende as células e o RNP é adequada para eletroporação.

[0076] Em um aspecto, a invenção proporciona uma sequência de ácido nucleico que codifica uma ou mais moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados de moléculas de gRNA. Em modalidades, o ácido

nucleico que inclui um promotor operacionalmente ligado à sequência que codifica uma ou mais moléculas de gRNA, por exemplo, o promotor é um promotor reconhecido por uma RNA polimerase II ou RNA polimerase III ou, por exemplo, o promotor é um promotor U6 ou um promotor HI.

[0077] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspetos e modalidades acima mencionados do ácido nucleico, o ácido nucleico codifica ainda uma molécula Cas9, por exemplo, uma molécula Cas9 que inclui, por exemplo, consiste em, qualquer de SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 ou SEQ ID NO: 244. Em modalidades, o referido ácido nucleico inclui um promotor operacionalmente ligado à sequência que codifica uma molécula Cas9, por exemplo, um promotor EF-1, um promotor do gene IE de CMV, um promotor EF-1 α , um promotor de ubiquitina C, ou um promotor fosfoglicerato-quinase (PGK).

[0078] Em um aspeto, a invenção proporciona um vetor incluindo o ácido nucleico de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados de ácido nucleico. Em modalidades, o vetor é selecionado do grupo consistindo em um vetor lentiviral, um vetor adenoviral, um vetor viral adenoassociado (AAV), um vetor do vírus do herpes simples (HSV), um plasmídeo, um minicírculo, um nanoplasmídeo e um vetor de RNA.

[0079] Em um aspecto, a invenção fornece um método de alteração de uma célula (p.ex., uma população de células), (p.ex., alteração da estrutura (p.ex., sequência) de ácido nucleico) em ou próximo de uma sequência-alvo dentro da referida célula, incluindo o contato da (p.ex., introdução na) referida célula (p.ex., população de células) com:

1) uma ou mais moléculas de gRNA aqui descrito (por exemplo, de

- qualquer um dos aspectos e modalidades da molécula de gRNA mencionada acima) e uma molécula Cas9, por exemplo, aqui descrita;
- 2) uma ou mais moléculas de gRNA aqui descrito (por exemplo, de qualquer um dos aspectos e modalidades da molécula de gRNA mencionada acima) e ácido nucleico codificando uma molécula Cas9, por exemplo, aqui descrita;
- 3) ácido nucleico codificando uma ou mais moléculas de gRNA aqui descrito (por exemplo, de qualquer um dos aspectos e modalidades da molécula de gRNA mencionada acima) e uma molécula Cas9, por exemplo, aqui descrita;
- 4) ácido nucleico codificando uma ou mais moléculas de gRNA aqui descrito (por exemplo, de qualquer um dos aspectos e modalidades da molécula de gRNA mencionada acima) e ácido nucleico codificando uma molécula Cas9, por exemplo, aqui descrita;
- 5) qualquer um de 1) a 4), acima, e um ácido nucleico molde;
- 6) qualquer um de 1) a 4) acima, e ácido nucleico incluindo sequência codificando um ácido nucleico molde;
- 7) uma composição aqui descrita, por exemplo, uma composição de qualquer um dos aspectos e modalidades acima referidos da composição; ou
- 8) um vetor aqui descrito, por exemplo, um vetor de qualquer um dos aspectos e modalidades acima referidos do vetor.

[0080] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima referidos do método, a molécula de gRNA ou ácido nucleico codificado a molécula de gRNA, e a molécula Cas9 ou ácido nucleico codificando a molécula Cas9, são formuladas em uma única composição. Em outro aspecto, a molécula de gRNA ou ácido nucleico codificado a molécula de gRNA, e a molécula Cas9 ou ácido nucleico codificando a molécula Cas9, são formuladas em mais do que uma composição. Em um aspecto, a mais do que uma composição são

administradas simultanea ou sequencialmente.

[0081] Em um aspecto dos métodos aqui descritos, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, a célula é uma célula animal, por exemplo, a célula é uma célula de mamífero, primata ou humana, por exemplo, a célula é uma célula-tronco ou progenitora hematopoiética (HSPC) (por exemplo, uma população de HSPCs), por exemplo, a célula é uma célula CD34+, por exemplo, a célula é uma célula CD34+CD90+. Em modalidades dos métodos aqui descritos, a célula está disposta em uma composição incluindo uma população de células que foi enriquecida quanto a células CD34+. Em modalidades dos métodos aqui descritos, a célula (por exemplo, população de células) foi isolada a partir da medula óssea, sangue periférico mobilizado ou sangue do cordão umbilical. Em modalidades dos métodos aqui descritos a célula é autóloga ou alogênica, por exemplo, autóloga no que diz respeito a um paciente a ser administrado com a referida célula.

[0082] Em um aspecto dos métodos aqui descritos, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, a) os resultados em que alteram um indel em ou perto de uma sequência de DNA genômico complementar ao domínio-alvo de uma ou mais moléculas de gRNA; ou b) a alteração resulta em uma deleção incluindo a sequência, por exemplo, substancialmente toda a sequência, entre uma sequência complementar ao domínio-alvo de uma ou mais moléculas de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementares ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG1 e uma sequência complementar ao domínio-alvo de uma ou mais moléculas de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementares ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG2. Em aspectos do

método, o indel é uma inserção ou deleção de menos do que cerca de 40 nucleotídeos, p.ex., menos do que 30 nucleotídeos, p.ex., menos do que 20 nucleotídeos, p.ex., menos do que 10 nucleotídeos, por exemplo, é uma deleção de nucleotídeo único.

[0083] Em um aspecto dos métodos aqui descritos, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, o método resulta em uma população de células em que pelo menos cerca de 15%, por exemplo, pelo menos cerca de 17%, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, por exemplo, pelo menos cerca de 30%, por exemplo, pelo menos cerca de 40%, por exemplo, pelo menos cerca de 50%, por exemplo, pelo menos cerca de 55%, por exemplo, pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75% da população foi alterada, por exemplo, incluir um indel.

[0084] Em um aspecto dos métodos aqui descritos, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, a alteração resulta em uma célula (p.ex., população de células) que é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada de uma linhagem eritroide (p.ex., um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada exibe um nível aumentado de hemoglobina fetal, p.ex., em relação a uma célula (p.ex., população de células) inalterada.

[0085] Em um aspecto dos métodos aqui descritos, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, a alteração resulta em uma população de células que é capaz de se diferenciar em uma população de células diferenciadas, p.ex., uma população de células de uma linhagem eritroide (p.ex., uma população de glóbulos vermelhos) e em que a referida população de células diferenciadas tem uma percentagem aumentada de células F (p.ex., pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30% ou pelo menos cerca de 40% percentagem mais elevada de células F), p.ex., em relação a

uma população de células inalteradas.

[0086] Em um aspecto dos métodos aqui descritos, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, a alteração resulta em uma célula que é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada, p.ex., uma célula de uma linhagem eritroide (p.ex., um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada produz pelo menos cerca de 6 picogramas (p.ex., pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal por célula.

[0087] Em um aspecto, a invenção proporciona uma célula, alterada por um método aqui descrito, por exemplo, um método de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método.

[0088] Em um aspecto, a invenção proporciona uma célula, obténível por um método aqui descrito, por exemplo, um método de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método.

[0089] Em um aspecto, a invenção proporciona uma célula, incluindo uma primeira molécula de gRNA, aqui descrita, por exemplo, de qualquer um dos aspectos ou modalidades acima mencionados da molécula de gRNA, ou uma composição, aqui descrita, por exemplo, de qualquer um dos aspectos ou modalidades acima mencionados da composição, um ácido nucleico, aqui descrito, por exemplo, de qualquer um dos aspectos ou modalidades acima mencionados de ácido nucleico, ou um vetor, aqui descrito, por exemplo, de qualquer um dos aspectos ou modalidades acima mencionadas de vetor.

[0090] Em um aspecto da célula aqui descrita, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula, a célula inclui ainda uma molécula Cas9, por exemplo, aqui descrita, por

exemplo, uma molécula Cas9 que inclui qualquer uma das SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 ou SEQ ID NO: 244.

[0091] Em um aspecto da célula aqui descrita, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula, a célula inclui, incluiu ou incluirá, uma segunda molécula de gRNA aqui descrita, por exemplo, de qualquer um dos aspectos ou modalidades acima mencionados da molécula de gRNA, ou um ácido nucleico codificando a referida molécula de gRNA, em que a primeira molécula de gRNA e a segunda molécula de gRNA incluem domínios-alvo não idênticos.

[0092] Em um aspecto da célula aqui descrita, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula, a expressão de hemoglobina fetal é aumentada na referida célula ou sua descendência (p.ex., sua descendência eritroide, p.ex., sua descendência de glóbulos vermelhos) em relação a uma célula ou sua descendência do mesmo tipo de célula que não foi modificada para incluir uma molécula de gRNA.

[0093] Em um aspecto da célula aqui descrita, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula, a célula é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada, p.ex., uma célula de uma linhagem eritroide (p.ex., um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada exibe um nível aumentado de hemoglobina fetal, p.ex., em relação a uma célula do mesmo tipo que não foi modificada para incluir uma molécula de gRNA.

[0094] Em um aspecto da célula aqui descrita, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula, a célula diferenciada (p.ex., célula de uma linhagem eritroide, p.ex.,

glóbulo vermelho) produz pelo menos cerca de 6 picogramas (p.ex., pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal, p.ex., em relação a uma célula diferenciada do mesmo tipo que não foi modificada para incluir uma molécula de gRNA.

[0095] Em um aspecto da célula aqui descrita, incluindo em qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula, a célula foi colocada em contato, por exemplo, colocada em contato ex vivo, com um expensor de células-tronco, por exemplo, um expensor de células-tronco selecionado de: a) (1r,4r)-N¹-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina; b) metil 4-(3-piperidin-1-ilpropilamino)-9H-pirimido[4,5-b]indole-7-carboxilato; c) 4-(2-(2-(benzo[b]tiofen-3-il)-9-isopropil-9H-purin-6-ilamino)etil)fenol; d) (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol; ou e) suas combinações (por exemplo, uma combinação de (1r,4r)-N¹-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina e (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol). Em modalidades, o expensor de células-tronco é (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol.

[0096] Em um aspecto da célula aqui descrita, incluindo em qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula, a célula inclui: a) um indel em uma sequência de DNA genômico ou próximo dela, complementar do domínio-alvo de uma molécula de gRNA aqui descrita, por exemplo, de qualquer um dos aspectos ou modalidades acima mencionados da molécula de gRNA; ou b) uma deleção incluindo sequência, por exemplo, substancialmente toda a

sequência, entre uma sequência complementar ao domínio-alvo de uma molécula de gRNA aqui descrita, por exemplo, de qualquer um dos aspectos ou modalidades acima mencionados da molécula de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar para o domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG1 e uma sequência complementar ao domínio-alvo de uma molécula de gRNA aqui descrita, por exemplo, de qualquer um dos aspectos ou modalidades acima mencionados da molécula de gRNA, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG2. Em um aspecto, o indel é uma inserção ou deleção de menos do que cerca de 40 nucleotídeos, p.ex., menos do que 30 nucleotídeos, p.ex., menos do que 20 nucleotídeos, p.ex., menos do que 10 nucleotídeos, por exemplo, o indel é uma deleção de nucleotídeo único.

[0097] Em um aspecto da célula aqui descrita, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades de células acima mencionadas, a célula é uma célula animal, por exemplo, a célula é uma célula de um mamífero, de um primata ou humana. Em um aspecto, a célula é uma célula-tronco ou progenitora hematopoiética (HSPC) (por exemplo, uma população de HSPCs), por exemplo, a célula é uma célula CD34+, por exemplo, a célula é uma célula CD34+CD90+. Em modalidades, a célula (por exemplo, população de células) foi isolada a partir da medula óssea, sangue periférico mobilizado ou sangue do cordão umbilical. Em modalidades, a célula é autóloga com respeito a um paciente a ser administrado com a referida célula. Em modalidades, a célula é alogeneica com respeito a um paciente a ser administrado com a referida célula.

[0098] Em um aspecto, a invenção fornece uma população de células aqui descrita, por exemplo, uma população de células que inclui

uma célula aqui descrita, por exemplo, uma célula de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula. Em aspectos, a invenção fornece uma população de células, em que, pelo menos cerca de 50%, p.ex., pelo menos cerca de 60%, p.ex., pelo menos cerca de 70%, p.ex., pelo menos cerca de 80%, p.ex., pelo menos cerca de 90% (p.ex., pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99%) das células da população são uma célula aqui descrita, por exemplo, uma célula de acordo com qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula. Em aspectos, a população de células (por exemplo, uma célula da população de células) é capaz de se diferenciar em uma população de células diferenciadas, por exemplo, uma população de células de uma linhagem eritroide (por exemplo, uma população de glóbulos vermelhos) e em que a referida população de células diferenciadas tem uma percentagem aumentada de células F (por exemplo, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 17%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30% ou pelo menos cerca de 40% de percentagem de células F mais elevada), por exemplo, em relação a uma população de células não modificadas do mesmo tipo. Em aspectos, as células F da população de células diferenciadas produzem uma média de pelo menos cerca de 6 picogramas (p.ex., pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal por célula.

[0099] Em um aspecto, incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da população de células, a invenção fornece uma população de células, incluindo: 1) pelo menos, 1×10^6 células CD34+/kg de peso corporal do paciente a quem as células devem ser

administradas; 2) pelo menos, 2×10^6 células CD34+/kg de peso corporal do paciente a quem as células devem ser administradas; 3) pelo menos, 3×10^6 células CD34+/kg de peso corporal do paciente a quem as células devem ser administradas; 4) pelo menos, 4×10^6 células CD34+/kg de peso corporal do paciente a quem as células devem ser administradas; ou 5) de 2×10^6 a 10×10^6 células CD34+/kg de peso corporal do paciente a quem as células devem ser administradas. Em modalidades, pelo menos cerca de 40%, p.ex., pelo menos cerca de 50% (p.ex., pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 90%) das células da população são células CD34+. Em modalidades, pelo menos cerca de 5%, por exemplo, pelo menos cerca de 10%, p.ex., pelo menos cerca de 15%, p.ex., pelo menos cerca de 20%, p.ex., pelo menos cerca de 30% das células da população são células CD34+CD90+. Em modalidades, a população de células é derivada de sangue do cordão umbilical, sangue periférico (por exemplo, sangue periférico mobilizado) ou medula óssea, por exemplo, é derivada da medula óssea. Em modalidades, a população de células inclui, por exemplo, consiste em, células de mamífero, por exemplo, células humanas. Em modalidades, a população de células é autóloga em relação a um paciente ao qual é para ser administrada. Em outras modalidades, a população de células é alogeneica em relação a um paciente ao qual é para ser administrada.

[0100] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição incluindo uma célula aqui descrita, por exemplo, uma célula de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula, ou uma população de células aqui descrita, por exemplo, uma população de células de qualquer um dos aspectos de modalidades acima mencionados da população. Em um aspecto, a composição inclui um meio farmacologicamente aceitável, p.ex., um meio farmacologicamente aceitável adequado para criopreservação.

[0101] Em um aspecto, a invenção proporciona um método de tratamento de uma hemoglobinopatia, incluindo a administração a um paciente de uma célula aqui descrita, por exemplo, uma célula de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula, uma população de células aqui descrita, por exemplo, uma população de células de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da população de células, ou uma composição aqui descrita, por exemplo, uma composição de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição.

[0102] Em um aspecto, a invenção proporciona um método de aumentar a expressão de hemoglobina fetal em um mamífero, incluindo a administração a um paciente de uma célula aqui descrita, por exemplo, uma célula de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula, uma população de células aqui descrita, por exemplo, uma população de células de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da população de células, ou uma composição aqui descrita, por exemplo, uma composição de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição. Em aspectos, a hemoglobinopatia é talassemia beta. Em aspectos, a hemoglobinopatia é a doença falciforme.

[0103] Em um aspecto, a invenção fornece um método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células) incluindo:

- (a) proporcionar uma célula (por exemplo, uma população de células) (por exemplo, uma HSPC (por exemplo, uma população de HSPCs));
- (b) cultivar a referida célula (por exemplo, a referida população de células) ex vivo em um meio de cultura de células incluindo um expansor de células-tronco; e
- (c) introduzir na referida célula uma primeira molécula de gRNA, por exemplo, aqui descrita, por exemplo, uma primeira molécula de gRNA

de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da molécula de gRNA; uma molécula de ácido nucleico que codifica uma primeira molécula de gRNA; uma composição aqui descrita, por exemplo, uma composição de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição; ou um vetor aqui descrito, por exemplo, um vetor de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados. Em aspectos do método, após a referida introdução do etapa (c), a referida célula (p.ex., população de células) é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada (p.ex., população de células diferenciadas), p.ex., uma célula de uma linhagem eritroide (p.ex., população de células de uma linhagem eritroide), p.ex., um glóbulo vermelho (p.ex., uma população de glóbulos vermelhos) e em que a referida célula diferenciada (p.ex., população de células diferenciadas) produz hemoglobina fetal aumentada, p.ex., em relação à mesma célula que não foi sujeita ao etapa (c). Em aspectos do método, o expansor de células-tronco é: a) (1r,4r)-N1-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina; b) metil 4-(3-piperidin-1-ilpropilamino)-9H-pirimido[4,5-b]indole-7-carboxilato; c) 4-(2-(2-(benzo[b]tiofen-3-il)-9-isopropil-9H-purin-6-ilamino)etil)fenol; d) (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol; ou e) suas combinações (por exemplo, uma combinação de (1r,4r)-N1-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina e (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol). Em modalidades, o expansor de células-tronco é (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol. Em aspectos, o meio de cultura de células compreende trombopoietina (Tpo), ligando Flt3 (Flt-3L) e fator de células-tronco humanas (SCF). Em aspectos, o meio de cultura celular inclui ainda interleucina-6 humana (IL-6). Em aspectos, o meio de cultura celular inclui trombopoietina

(Tpo), ligante Flt3 (Flt-3L) e fator de células-tronco humanas (SCF), cada um a uma concentração que varia entre cerca de 10 ng/mL a cerca de 1000 ng/mL, por exemplo, cada um a uma concentração de cerca de 50 ng/mL, por exemplo, cada um a uma concentração de 50 ng/mL. Em aspectos, o meio de cultura celular inclui interleucina-6 (IL-6) a uma concentração que varia entre cerca de 10 ng/mL a cerca de 1000 ng/mL, por exemplo, a uma concentração de cerca de 50 ng/mL, por exemplo, a uma concentração de 50 ng/mL. Em aspectos, o meio de cultura celular inclui um expansor de células-tronco, a uma concentração variando desde cerca de 1 nM a cerca de 1 mM, por exemplo, em uma concentração variando entre cerca de 1 μ M até cerca de 100 nM, por exemplo, em uma concentração que varia entre cerca de 500 nM a cerca de 750 nM. Em aspectos, o meio de cultura de células inclui um expansor de células-tronco a uma concentração de cerca de 500 nM, p.ex., a uma concentração de 500 nM. Em aspectos, o meio de cultura de células inclui um expansor de células-tronco a uma concentração de cerca de 750 nM, p.ex., a uma concentração de 750 nM.

[0104] Em aspectos do método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células), a cultura da etapa (b) inclui um período de cultura antes da introdução da etapa (c), por exemplo, o período de cultura antes da introdução da etapa (c) é pelo menos 12 horas, por exemplo, é por um período de cerca de 1 dia a cerca de 12 dias, por exemplo, é por um período de cerca de 1 dia a cerca de 6 dias, por exemplo, é por um período de cerca de 1 dia a cerca de 3 dias, por exemplo, por um período de cerca de 1 dia a cerca de 2 dias, por exemplo, é por um período de cerca de 2 dias. Em aspectos do método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células), incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, a cultura da etapa (b) inclui um período de cultura após a introdução da etapa (c), por exemplo, o período de cultura

após a introdução da etapa (c) é, pelo menos, 12 horas, por exemplo, é durante um período de cerca de 1 dia a cerca de 12 dias, p.ex., é durante um período de cerca de 1 dia a cerca de 6 dias, p.ex., é durante um período de cerca de 2 dias a cerca de 4 dias, p.ex., é durante um período de cerca de 2 dias ou é durante um período de cerca de 3 dias ou é durante um período de cerca de 4 dias. Em aspectos do método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células), incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, a população de células é expandida pelo menos 4 vezes, por exemplo, pelo menos 5 vezes, por exemplo, pelo menos 10 vezes, por exemplo, em relação às células que não são cultivadas de acordo com a etapa (b).

[0105] Em aspectos do método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células), incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, a introdução da etapa (c) inclui uma eletroporação. Em aspectos, a eletroporação inclui 1 a 5 pulsos, p.ex., 1 pulso, e em que cada pulso é uma voltagem de pulso variando de 700 volts a 2000 volts e tem uma duração de pulso variando de 10 ms a 100 ms. Em aspectos, a eletroporação inclui, por exemplo, consiste em, 1 pulso. Em aspectos, a voltagem de pulso (ou mais do que um pulso) varia de 1500 a 1900 volts, por exemplo, é de 1700 volts. Em aspectos, a duração de pulso de um pulso ou mais de um pulso varia de 10 ms a 40 ms, por exemplo, é de 20 ms.

[0106] Em aspectos do método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células), incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, a célula (por exemplo, população de células) fornecida na etapa (a) é uma célula humana (por exemplo, uma população de células humanas). Em aspectos do método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células), incluindo em qualquer um dos aspectos e

modalidades acima mencionados do método, a célula (por exemplo, população de células) fornecida na etapa (a) é isolada da medula óssea, sangue periférico (por exemplo, sangue periférico mobilizado) ou sangue do cordão umbilical. Em aspectos do método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células), incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, a célula (por exemplo, população de células) fornecida na etapa (a) é isolada da medula óssea, por exemplo, é isolado da medula óssea de um paciente que sofre de uma hemoglobinopatia.

[0107] Em aspectos do método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células), incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, a população de células fornecida na etapa (a) é enriquecida com células CD34+.

[0108] Em aspectos do método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células), incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, subsequentemente à introdução da etapa (c), a célula (por exemplo, população de células) é criopreservada.

[0109] Em aspectos do método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células), incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, após a introdução da etapa (c), a célula (por exemplo, população de células) inclui: a) um indel em ou perto de uma sequência de DNA genômico complementar ao domínio-alvo da primeira molécula de gRNA; ou b) uma deleção incluindo sequência, por exemplo, substancialmente toda a sequência, entre uma sequência complementar ao domínio-alvo da primeira molécula de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, completamente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG1 e uma sequência complementar ao domínio-alvo da primeira molécula

de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG2.

[0110] Em aspectos do método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células), incluindo em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados do método, após a introdução da etapa (c), pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% das células da população de células incluem um indel em ou próximo em de uma sequência de DNA genômico complementar com o domínio-alvo da primeira molécula de gRNA.

[0111] Em um aspecto, a invenção proporciona uma célula (por exemplo, uma população de células), obtível por um método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células) aqui descrito, por exemplo, descrito em qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados métodos de preparação de uma célula.

[0112] Em um aspecto, a invenção fornece um método de tratamento de uma hemoglobinopatia em um paciente humano, incluindo a administração a um paciente humano de uma composição incluindo uma célula aqui descrita, por exemplo, uma célula de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula: ou uma população de células aqui descrita, por exemplo, uma população de células de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da população de células. Em aspectos, a hemoglobinopatia é talassemia beta. Em aspectos, a hemoglobinopatia é a doença falciforme.

[0113] Em um aspecto, a invenção fornece um método para aumentar a expressão da hemoglobina fetal em um paciente humano, incluindo a administração ao referido paciente humano de uma composição incluindo uma célula aqui descrita, por exemplo, uma célula de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula: ou uma população de células aqui descrita, por exemplo, uma população de células de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da população de células. Em aspectos, os pacientes humanos têm talassemia beta. Em aspectos, o paciente humano tem doença falciforme.

[0114] Em aspectos do método de tratamento de uma hemoglobinopatia ou o método de aumentar a expressão de hemoglobina fetal, o paciente humano é administrado com uma composição incluindo, pelo menos, cerca de $1e6$ células (por exemplo, células como aqui descrito) por kg de peso corporal do paciente humano, por exemplo, pelo menos cerca de $1e6$ células CD34+ (por exemplo, células como aqui descritas) por kg de peso corporal do paciente humano. Em aspectos do método de tratamento de uma hemoglobinopatia ou o método de aumentar a expressão de hemoglobina fetal, o paciente humano é administrado com uma composição incluindo, pelo menos, cerca de $2e6$ células (por exemplo, células como aqui descrito) por kg de peso corporal do paciente humano, por exemplo, pelo menos cerca de $2e6$ células CD34+ (por exemplo, células como aqui descritas) por kg de peso corporal do paciente humano. Em aspectos do método de tratamento de uma hemoglobinopatia ou o método de aumentar a expressão de hemoglobina fetal, o paciente humano é administrado com uma composição incluindo cerca de $2e6$ células (por exemplo, células como aqui descrito) por kg de peso corporal do paciente humano, por exemplo, cerca de $2e6$ células CD34+ (por exemplo, células como aqui

descritas) por kg de peso corporal do paciente humano. Em aspectos do método de tratamento de uma hemoglobinopatia ou o método de aumentar a expressão de hemoglobina fetal, o paciente humano é administrado com uma composição incluindo pelo menos cerca de 3×10^6 células (por exemplo, células como aqui descrito) por kg de peso corporal do paciente humano, por exemplo, pelo menos cerca de 3×10^6 células CD34+ (por exemplo, células como aqui descritas) por kg de peso corporal do paciente humano. Em aspectos do método de tratamento de uma hemoglobinopatia ou o método de aumentar a expressão de hemoglobina fetal, o paciente humano é administrado com uma composição incluindo cerca de 3×10^6 células (por exemplo, células como aqui descrito) por kg de peso corporal do paciente humano, por exemplo, cerca de 3×10^6 células CD34+ (por exemplo, células como aqui descritas) por kg de peso corporal do paciente humano. Em aspectos do método de tratamento de uma hemoglobinopatia ou o método de aumentar a expressão de hemoglobina fetal, o paciente humano é administrado com uma composição incluindo a partir de cerca de 2×10^6 a cerca de 10×10^6 células (por exemplo, células como aqui descrito) por kg de peso corporal do paciente humano, por exemplo, a partir de cerca de 2×10^6 a cerca de 10×10^6 células CD34+ (por exemplo, células como aqui descritas) por kg de peso corporal do paciente humano.

[0115] Em um aspecto, a invenção proporciona: uma molécula de gRNA aqui descrita, por exemplo, uma molécula de gRNA de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da molécula de gRNA; uma composição aqui descrita, por exemplo, uma composição de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição, um ácido nucleico aqui descrito, por exemplo, um ácido nucleico de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados de ácidos nucleicos; um vetor aqui descrito, por exemplo, um vetor de qualquer um dos aspectos e modalidades acima

mencionados de vetores; uma célula aqui descrita, por exemplo, uma célula de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula; ou uma população de células aqui descritas, por exemplo, uma população de células de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da população de células, para utilização como um medicamento.

[0116] Em um aspecto, a invenção proporciona: uma molécula de gRNA aqui descrita, por exemplo, uma molécula de gRNA de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da molécula de gRNA; uma composição aqui descrita, por exemplo, uma composição de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição, um ácido nucleico aqui descrito, por exemplo, um ácido nucleico de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados de ácidos nucleicos; um vetor aqui descrito, por exemplo, um vetor de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados de vetores; uma célula aqui descrita, por exemplo, uma célula de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula; ou uma população de células aqui descritas, por exemplo, uma população de células de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da população de células, para utilização na fabricação de um medicamento.

[0117] Em um aspecto, a invenção proporciona; uma molécula de gRNA aqui descrita, por exemplo, uma molécula de gRNA de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da molécula de gRNA; uma composição aqui descrita, por exemplo, uma composição de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição, um ácido nucleico aqui descrito, por exemplo, um ácido nucleico de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados de ácidos nucleicos; um vetor aqui descrito, por exemplo, um vetor de qualquer um dos aspectos e modalidades acima

mencionados de vetores; uma célula aqui descrita, por exemplo, uma célula de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula; ou uma população de células aqui descritas, por exemplo, uma população de células de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da população de células, para utilização no tratamento de uma doença.

[0118] Em um aspecto, a invenção proporciona: uma molécula de gRNA aqui descrita, por exemplo, uma molécula de gRNA de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da molécula de gRNA; uma composição aqui descrita, por exemplo, uma composição de qualquer dos aspectos e modalidades acima mencionados da composição, um ácido nucleico aqui descrito, por exemplo, um ácido nucleico de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados de ácidos nucleicos; um vetor aqui descrito, por exemplo, um vetor de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados de vetores; uma célula aqui descrita, por exemplo, uma célula de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da célula; ou uma população de células aqui descritas, por exemplo, uma população de células de qualquer um dos aspectos e modalidades acima mencionados da população de células, para utilização no tratamento de uma doença, em que a doença é uma hemoglobinopatia, por exemplo, talassemia beta ou doença falciforme.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0119] **Fig 1:** Indução de HbF 7 dias após a edição. Para cada sequência-alvo de gRNA testado a percentagem de células com expressão induzida de HbF corrigida para os níveis de base com base na transfecção simulada, é mostrada como a média com barras de erro indicando o desvio padrão. O gRNA G8 contra o éxon 2 da BCL11A serve como controle positivo. Uma linha pontilhada a 17% indica o nível de limiar escolhido para a análise. Vários sombreados cinzentos, como

indicado na legenda, relacionam o grau de indução de HbF com o grau de edição nos loci alvo HBG1 ou HBG2.

[0120] **Fig 2:** Eficiência de edição no locus alvo de HBG1. Para cada gRNA testado, a percentagem de indels detectados por NGS é mostrada como média com barra de erro indicando desvio padrão. O gRNA G8 contra o éxon 2 da BCL11A serve como controle positivo. Dois guias para os quais nenhum dado NGS foi obtido são indicados por pontas de seta.

[0121] **Fig 3:** Eficiência de edição no locus alvo de HBG2. Para cada gRNA testado, a percentagem de indels detectados por NGS é mostrada como média com barra de erro indicando desvio padrão. O gRNA G8 contra o éxon 2 da BCL11A serve como controle positivo. Dezesesseis guias para os quais nenhum dado NGS foi obtido são indicados por pontas de seta.

[0122] **Fig 4:** Resumo da localização de sequências-alvo de gRNA de alto desempenho (por exemplo, >17% regulação positiva de HbF no Dia 7), polimorfismos HPFH não deleção conhecidos e sítios de ligação de fator de transcrição na área do promotor de HBG1. A figura divulga a SEQ ID NOS 293-312, respectivamente, por ordem de aparecimento.

[0123] **Fig 5:** Resumo da localização de sequências-alvo de gRNA de alto desempenho (por exemplo, >17% regulação positiva de HbF no Dia 7), polimorfismos HPFH não deleção conhecidos e sítios de ligação de fator de transcrição na área do promotor de HBG2. A figura divulga a SEQ ID NOS 313-332, respectivamente, por ordem de aparecimento.

[0124] **Fig. 6:** Eficiência de edição em locus B2M direcionado em HSPCs CD34+ por diferentes variantes de Cas9, como avaliado por NGS e citometria de fluxo. NLS = SV40 NLS; His6 (SEQ ID NO: 247) ou His8 (SEQ ID NO: 248) refere-se a 6 (SEQ ID NO: 247) ou 8 (SEQ ID NO: 248) resíduos de histidina, respectivamente; TEV = sítio de clivagem do vírus etch do tabaco; Cas9 = Cas9 de *S. pyogenes* do tipo

selvagem - mutações ou variantes são como indicado).

[0125] **Fig. 7:** Detecção e quantificação de células positivas HbF por citometria de fluxo em 7 (barras pretas), 14 (barras cinzentas claras) ou 21 (barras cinzentas escuras) dias após a diferenciação eritroide seguindo-se eletroporação de HSPCs com RNPs contendo sgRNA do domínio-alvo indicado. A percentagem de células HbF+ para culturas de controle não tratadas com sgRNA em cada ponto de tempo foi subtraída. Média + desvio padrão é indicado (n = 2 réplicas técnicas).

[0126] **Fig. 8:** Detecção e quantificação de células positivas HbF por citometria de fluxo em 7 (barras pretas abertas), 14 (barras cinzentas claras abertas) ou 21 (barras cinzentas escuras abertas) dias após a diferenciação eritroide seguindo-se eletroporação de HSPCs com RNPs contendo sgRNA do domínio-alvo indicado. A percentagem de células HbF+ para culturas de controle não tratadas com sgRNA em cada ponto de tempo foi subtraída. A média (barra) de dois doadores de células independentes é mostrada, juntamente com o valor para cada doador (círculo = primeiro doador, triângulo = segundo doador).

[0127] **Fig. 9:** Visualização de produtos de PCR da reação indicada: P1, P2 ou P3, como descrito nos Exemplos, a partir de células após eletroporação com RNPs contendo sgRNA do domínio-alvo indicado ou células de controle não tratadas com sgRNA. Os produtos esperados são os seguintes. P1: 7,7 kb para o alelo indel de tipo selvagem/pequeno ou alelo de inversão de 4,9 kb, 2,8 kb para o alelo com deleção de 4,9 kb. P2: 3,8 kb para o alelo indel tipo selvagem/pequeno, nenhum produto para deleção de 4,9 kb ou alelo de inversão de 4,9 kb. P3: 1,8 kb para o alelo de inversão de 4,9 kb, nenhum produto para o alelo indel de tipo selvagem/pequeno ou alelo de deleção de 4,9 kb. L = escada de referência de DNA. * = DNA dessa banda foi isolado e submetido ao sequenciamento de próxima geração.

[0128] **Fig. 10:** Esquemático indicando a localização genômica dos

sítios de ligação do iniciador e sonda para o ensaio de PCR de gota digital para quantificar 4,9 kb de deleções. Os iniciadores (5,2 kb Fwd e 5,2 kb Rev) e sonda (sonda FAM) ligam-se a um local intergênico a jusante de HBG2 e a montante de HBG1. A sonda tem um segundo sítio de ligação a montante de HBG2, mas que a região não é ligada pelos iniciadores. As áreas nas quais os domínios-alvo nos promotores de HBG1 e HBG2 estão localizados são indicadas. Se a sequência interveniente com as duas regiões do domínio-alvo for eliminada, o sítio de ligação do iniciador/sonda entre HBG1 e HBG2 será perdido.

[0129] **Fig. 11:** Esquema de separação para subpopulações de HSPC para a amostra de células seguindo-se eletroporação com RNPs contendo sgRNA do domínio-alvo GCR-0067. Apresentam-se gráficos de pontos de fluorescência celular após imunocoloração direcionada para o marcador de superfície celular indicado. As seguintes populações foram separadas como mostrado: P5 = CMP (CD34+CD45RA-CD38+), P9 = MPP (CD34+CD45RA-CD38-CD90-CD49f-), P10 = ST-HSC (CD34+CD45RA-CD38-CD90-CD49f+), P11 = LT-HSC (CD34+CD45RA-CD38-CD90+CD49f+). Células CD34+ totais foram também separadas (não mostradas).

[0130] **Fig. 12:** Percentagem de edição de subpopulações de HSPC separadas seguindo-se eletroporação com RNPs contendo sgRNA do domínio-alvo GCR-0067. Indel HBG1 e indel HBG2 indicam a percentagem de pequenas inserções e deleções identificadas por sequenciamento de próxima geração de amplicons de PCR no ou perto do domínio-alvo da região promotora de HBG1 ou HBG2, respectivamente (note que os alelos com deleção ou inversão de 4.9 kb descritos anteriormente não são amplificados). Deleção HBG1-HBG2 indica a percentagem de alelos com a deleção de 4,9 kb, tal como determinado pelo ensaio de PCR de gota digital descrito nos Exemplos. A edição total é uma aproximação calculada pela percentagem de

deleção de HBG1-HBG2 adicionada à percentagem sem a deleção de HBG1-HBG2 vezes a percentagem de indel de HBG2.

[0131] **Fig. 13:** A Figura 13A mostra a soma de todos os indels observados no locus HBG1 no tipo celular indicado após introdução de sgRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0067. Indels são organizados com indels mais frequentemente observados no topo de cada barra. Não quantificado neste ensaio é a fracção de células compreendendo a grande deleção de 4,9 kb entre os loci de HBG1 e HBG2. O número dentro da barra de cada um dos indels mais prevalentes indica o número de diferenças de nucleotídeos da sequência genômica de tipo selvagem (- indica deleção; + indica inserção). A Figura 13B mostra a soma de todos os indels observados no locus HBG2 no tipo celular indicado após introdução de sgRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0067. Indels são organizados com indels mais frequentemente observados no topo de cada barra. Não quantificado neste ensaio é a fracção de células compreendendo a grande deleção de 4,9 kb entre os loci de HBG1 e HBG2. O número dentro da barra de cada um dos indels mais prevalentes indica o número de diferenças de nucleotídeos da sequência genômica de tipo selvagem (- indica deleção; + indica inserção). CMP = CD34+CD45RA-CD38+ células; MPP = CD34+CD45RA-CD38-CD90-CD49f- células; ST-HSC = CD34+CD45RA-CD38-CD90-CD49f+ células; e LT-HSC = CD34+CD45RA-CD38-CD90+CD49f+ células.

[0132] **Fig. 14:** Percentagem de colônias correspondentes ao subtipo indicado, CFU-GEMM (barras cinzentas escuras), CFU-G/M/GM (barras cinzentas médias) ou BFU-E/CFU-E (barras cinzentas claras), após eletroporação com RNPs contendo sgRNA do domínio-alvo indicado ou culturas de controle não tratadas com sgRNA. Média +/- desvio padrão é indicado (n = 2 doadores independentes).

[0133] **Fig. 15:** N° de vezes de proliferação de células totais

nucleadas (TNC), células CD34 positivas (CD34+) e células duplas positivas CD34 e CD90 (CD34+CD90+), como indicado, em meio contendo composto 4, após eletroporação com RNPs contendo sgRNA do domínio-alvo GCR-0067 ou culturas de controle não tratadas com sgRNA. Média +/- desvio padrão é indicado (n = 2 doadores independentes). A média (barra) de três doadores de células independentes é mostrada, juntamente com o valor para cada doador (quadrado = doador A, triângulo = doador B, círculo = doador C). As diferenças entre as culturas editadas e de controle não foram significativas (ns) pelo teste t não-pareado (GraphPad Prism).

[0134] **Fig. 16:** Classificações representativas de populações celulares por citometria de fluxo. Apresentam-se gráficos de pontos de fluorescência celular após imunocoloração direcionada para os marcadores de superfície celular indicados, ou isotipo de controle (isotipo). As classificações indicadas com as caixas a negrito foram usadas para quantificar a percentagem da população indicada e foram configuradas para excluir as células marcadas com o controle do isotipo. Apenas as células viáveis pré-classificadas como negativas para DAPI e dentro das classificações de dispersão direta e dispersão lateral celulares, são mostradas e são derivadas do doador C eletroporado com apenas Cas9.

[0135] **Fig. 17:** Percentagem de células com o fenótipo da superfície celular indicado, como avaliado por citometria de fluxo, após a eletroporação com RNPs contendo sgRNA do domínio-alvo GCR-0067 (barras pretas) ou culturas de controle não tratadas com sgRNA (barras cinzentas). As células foram expandidas 2 dias após eletroporação de RNP em meio compreendendo o Composto 4 e avaliadas por citometria de fluxo, tal como descrito na Figura 16. Média + desvio padrão é indicado (n = 3 doadores independentes). Não houve diferenças significativas entre células editadas e não editadas para uma

determinada população por teste t não pareado (GraphPad Prism).

[0136] **Fig. 18A.** Quantificação CE-MS de subunidades de globina em HSCs editadas simuladas derivadas de paciente com doença falciforme (SCD1) simuladas, editadas com Cas9 e sem sgRNA. Depois que as células são diferenciadas em linhagem eritroide, as células apresentaram nível normal de α -aglobina, nenhuma β -globina normal devido à homozigosidade falciforme, alto nível de subunidade β -globina falciforme e baixo nível de γ -globina fetal.

[0137] **Fig. 18B.** Quantificação CE-MS de subunidades de globina em HSPCs editadas em genoma derivadas de pacientes com doença falciforme (SCD1). Depois de editar as HSCs, as células eritroides derivadas do paciente da amostra demonstraram 40% de regulação positiva da γ -globina fetal e uma regulação negativa de 50% da subunidade da β -globina falciforme.

[0138] **Fig. 19:** Protocolo esquemático para estudar o enxerto de células editadas por genes. Transplante de HSCs editadas por gene com Cas9 e sgRNA compreendendo o domínio-alvo de CR001128 (sg1128). Quinhentas mil células CD34⁺ humanas foram ou não editadas simuladas com gRNA ou editadas por gene com sg1128, seguido de injeção em receptores NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}//2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) irradiados com 2 Gy. Os camundongos foram sangrados às 4, 8, 12, 16 semanas e as células da medula óssea foram colhidas às 16 semanas após o transplante.

[0139] **Fig. 20:** Reconstituição da medula óssea às 16 semanas pós-transplante usando o protocolo experimental mostrado na Figura 19.

[0140] **Fig. 21:** Reconstituição de células linfóides mielóides, B e T no sangue periférico e medula óssea em múltiplos momentos usando o protocolo experimental mostrado na Figura 19. N = 5/grupo, os dados mostram min a max, 4 experiências independentes.

[0141] **Fig. 22:** Diagrama esquemático do estudo de transplante para avaliar a função de células-tronco de HSCs editadas com sgRNAs da região promotora da globina gama (sg-G0008, sg-G0051, sg-G0010, sg-G0048, sg-G0067) em comparação ao gRNA da região intensificadora específica de eritroide do gene BCL11A (sg-G1128; também referido como sg1128). As células foram deixadas em cultura 24 horas após a eletroporação. As condições de cultura antes e após a eletroporação foram StemSpan SFEM+IL6, SCF, TPO, Flt3L; 750 nM do Composto 4.

[0142] **Fig. 23:** Enxerto humano e análise de linhagem ao longo de 20 semanas em camundongos NSG. **Figura 23A)** Quimerismo do sangue periférico ao longo de 18 semanas; **Figura 23B)** Distribuição da linhagem no sangue periférico às 18 semanas. Análise da medula óssea: **Figura 23C)** Análise da medula óssea de células humanas na semana 9; **Figura 23D)** Enxerto de CD45+ humanas e distribuição de linhagem de células humanas na medula óssea na semana 9; **Figura 23E)** Enxerto de CD45+ humanas na medula óssea na semana 20 após o enxerto; **Figura 23F)** Distribuição da linhagem de células enxertadas na medula óssea em 20 semanas.

[0143] **Fig 24A.** Eficiência de enxerto de HSCs editadas com sgRNAs com homologia à região promotora de globina gama (sg-G0008, sg-G0051, sg-G0010, sg-G0048, sg-G0067) em comparação ao sgRNA da região intensificadora específica do eritroide do gene BCL11A (sg1128) Mostra o enxerto de células humanas em camundongos NSG às 8 semanas após o transplante. N = 10/grupo, 3 experiências independentes. O gráfico mostra dados agrupados.

[0144] **Fig. 24B.** Eficiência de enxerto de HSCs editadas com sgRNAs com homologia à região promotora de globina gama (sg-G0008, sg-G0051, sg-G0010, sg-G0048, sg-G0067) em comparação ao sgRNA da região intensificadora específica do eritroide do gene

BCL11A (sg1128). Mostra o enxerto de células humanas em camundongos NSG às 20 semanas após o transplante. N = 10/grupo, 3 experiências independentes. O gráfico mostra dados agrupados.

[0145] **Fig. 25:** Reconstituição de linhagem múltipla de camundongos NSG transplantados com células CD34+ editadas por genes. N = 10/grupo, dados de uma experiência representativa.

[0146] **Fig. 26:** Alta eficiência de edição foi mantida pré e pós-transplante. "Pre-Xpt": eficiência de edição e padrão indel de sgRNA individual em células CD34+ humanas, como medido por NGS após edição, mas antes do transplante. "8 semanas pós-Xpt": eficiência de edição e padrão indel em células CD34+ humanas 8 semanas após o transplante de medula óssea em camundongos conforme medido por NGS. "20 semanas pós-Xpt": eficiência de edição e padrão indel em células CD34+ humanas 20 semanas após o transplante de medula óssea em camundongos conforme medido por NGS. Eletroporação realizada em triplicado por grupo, dados de uma experiência representativa. Como usado em relação a esta Figura, "indel" refere-se à soma de todos os indels de menos de 200 nt; "deleção grande" refere-se à deleção da sequência entre os sítios de ligação previstos de HBG1 e HBG2 para cada gRNA.

[0147] **Fig. 27:** Análise NGS de células CD34+ pós-edição com RNPs. O sgRNA que direciona para regiões específicas é indicado no eixo x. Figura 27A: Análise NGS de células CD34+ no dia 2 pós-eletroporação de RNPs. Figura 27B: Análise NGS de medula óssea inteira de camundongos NSG transplantados com células CD34+ de medula óssea editadas na (27B) semana 9 pós-transplante. Figura 27C: Análise NGS de medula óssea inteira de camundongos NSG transplantados com células CD34+ de medula óssea editadas na semana 20 pós-transplante. Indels de inserção são indicados em preto, indels de deleção (excluindo grandes deleções compreendendo uma

excisão da região entre HBG1 de ligação e sequências-alvo de HBG2 para cada um de gRNA sg-G51, sg-G48 e sg-G67) são indicados em cinza. % de edição total é representada pela altura das barras. N = 10, os dados são apresentados como média $\pm$ SEM de uma experiência independente.

[0148] **Fig. 28:** As HSC humanas enxertadas, de longo termo, editadas por genes foram capazes de produzir níveis aumentados de HbF após diferenciação de células eritroides. Cinquenta mil células CD34⁺ humanas foram separadas da medula óssea de camundongos NSG transplantados de 8 ou 20 semanas. Células separadas foram semeadas em meio de diferenciação eritroide durante 14 a 21 dias. Os glóbulos vermelhos maduros em cultura foram ensaiados quanto à expressão de HbF e para enumerar o número de células HbF⁺ por citometria de fluxo. O controle simulado representa células CD34⁺ editadas com Cas9 sem gRNA e transplantadas em camundongos NSG de maneira igual ao grupo controle editado por genes. N = 10/grupo, 3 experiências independentes.

[0149] **Fig 29.** A atividade fora do alvo para RNAs guia HBG1 e/ou HBG2 foi avaliada usando um método de oligo-inserção de dsDNA em células HEK-293 com sobre-expressão de Cas9. O sítio no alvo (círculo aberto) e os potenciais sítios fora do alvo (círculos fechados) detectados são indicados; o eixo y indica a frequência de detecção. Todos os gRNAs foram testados no formato dgRNA com o domínio-alvo indicado pelo identificador CRxxxxxx.

[0150] **Fig. 30:** A atividade fora do alvo para RNAs guia HBG1 e/ou HBG2 foi avaliada usando um método de oligo-inserção de dsDNA em células HEK-293 com sobre-expressão de Cas9. O sítio no alvo (círculo aberto) e os potenciais sítios fora do alvo (círculos fechados) detectados são indicados; o eixo y indica a frequência de detecção. Os gRNAs foram testados no formato dgRNA com o domínio-alvo indicado pelo

identificador CRxxxxx ou no formato sgRNA com o domínio-alvo indicado pelo identificador Gxxxxxx.

[0151] **Figura 31A.** Contagem de células CD34⁺ de células derivadas de sangue periférico mobilizado de indivíduos saudáveis após edição genética. As células foram descongeladas no dia 0, cultivadas durante 3 dias antes da eletroporação no dia 3. Enumeração do número de células CD34⁺ por ISHAGE ao longo de 10 dias após a eletroporação. Duas experiências independentes foram realizadas em duplicado. Total N = 5. Os gráficos mostram dados de 1 experiência com média±SEM.

[0152] **Figura 31B.** Expansão de células CD34⁺ de células derivadas de sangue periférico mobilizado de indivíduos saudáveis após edição genética. As células foram descongeladas no dia 0, cultivadas durante 3 dias antes da eletroporação no dia 3. Expansão do total de células mononucleares no dia 3, 7 e 10 após a edição. Duas experiências independentes foram realizadas em duplicado. Total N = 5. Os gráficos mostram dados de 1 experiência com média±SEM.

[0153] **Figura 31C.** Viabilidade de células CD34⁺ de células derivadas de sangue periférico mobilizado de indivíduos saudáveis após edição genética. As células foram descongeladas no dia 0, cultivadas durante 3 dias antes da eletroporação no dia 3. A viabilidade de células mononucleares ao mesmo tempo aponta a pós-edição. Duas experiências independentes foram realizadas em duplicado. Total N = 5. Os gráficos mostram dados de 1 experiência com média±SEM.

[0154] **Figura 32A.** Eficiência de edição de sg1128 e sg0067 em células CD34⁺ mobilizadas a partir do sangue periférico de indivíduos saudáveis. É mostrada a percentagem de INDELs capturados pelo NGS após a edição usando sg1128 (direcionando para a região BCL11A +58 de ESH) e sg0067 (direcionando para o cluster do gene HbG-1 e HbG-2). Este gráfico também indica a eficiência total de edição do sg1128, já

que somente pequenos INDELs foram gerados por este sgRNA. Mais de cinco experiências independentes foram realizadas em duplicado ou triplicado, $n = 2-3/\text{experiência}$.

[0155] **Figura 32B.** Eficiência de edição de sg1128 e sg0067 em células CD34+ mobilizadas a partir do sangue periférico de indivíduos saudáveis. A. A percentagem de INDELs capturados pelo NGS após a edição usando sg0067 (direcionando para o cluster do gene HbG-1 e HbG-2). É mostrada a eficiência total de edição e o padrão de edição do sg0067. O padrão de edição do sg0067 consiste em uma deleção grande de 5kb (denotado por barras pretas) e em INDELs menores (denotado por barras cinza). Mais de cinco experiências independentes foram realizadas em duplicado ou triplicado, $n = 2-3/\text{experiência}$.

[0156] **Figura 33.** Nº de vezes de alteração do transcrito de g-globina nas células eritroides das amostras de pacientes após a silenciamento CRISPR de BCL11A ou da formação indel/deleção na região HBG1/2. As células CD34+ derivadas do sangue periférico mobilizado de doadores saudáveis foram editadas por CRISPR e diferenciadas na linhagem eritroide *in vitro* como descrito em procedimentos anteriores. No dia 11 de diferenciação eritroide, as células foram colhidas da cultura e submetidas a qPCR para medir g-globina e transcritos da b-globina, normalizando a GAPDH. A experiência foi realizada independentemente duas vezes, cada uma em duplicado, $n = 2-3/\text{experiência}$. Os dados mostram média $\pm$ SEM dos doadores agrupados de um estudo.

[0157] **Figura 34.** Enumeração de células HbF+ de indivíduos saudáveis após edição genética. As células CD34+ derivadas do sangue periférico mobilizado de doadores saudáveis foram editadas por CRISPR e diferenciadas na linhagem eritroide *in vitro* como descrito em procedimentos anteriores. No dia 10, da diferenciação eritroide, as células foram coradas com anticorpo anti-HbF-FITC para enumerar

células HbF+ por citometria de fluxo. A experiência foi realizada independentemente duas vezes, cada uma em duplicado, $n = 2-3$ /experiência. Os dados mostram média $\pm$ SD de um estudo.

[0158] **Figura 35A.** Expansão e viabilidade de células CD34+ derivadas do sangue periférico de indivíduos com doença falciforme após edição gênica. As células foram cultivadas durante 6-10 dias antes da eletroporação. D0 refere-se ao dia da eletroporação. É mostrada a contagem absoluta de células CD34+ por ISHAGE ao longo de 10 dias após a eletroporação. $N=4$, os dados mostram média $\pm$ SEM. 4 experiências independentes foram realizadas em duplicado. As barras são, da esquerda para a direita em cada ponto de tempo, simulado, sg1128, sg0067.

[0159] **Figura 35B.** Expansão e viabilidade de células CD34+ derivadas do sangue periférico de indivíduos com doença falciforme após edição gênica. As células foram cultivadas durante 6-10 dias antes da eletroporação. D0 refere-se ao dia da eletroporação. É mostrada a percentagem de células CD34+ por ISHAGE ao longo de 10 dias após a eletroporação. $N=4$, os dados mostram média $\pm$ SEM. 4 experiências independentes foram realizadas em duplicado. As barras são, da esquerda para a direita em cada ponto de tempo, simulado, sg1128, sg0067.

[0160] **Figura 35C.** Expansão e viabilidade de células CD34+ derivadas do sangue periférico de indivíduos com doença falciforme após edição gênica. As células foram cultivadas durante 6-10 dias antes da eletroporação. D0 refere-se ao dia da eletroporação. É mostrada a expansão do total de células mononucleares no dia 3, 7 e 10 após a edição. $N=4$, os dados mostram média $\pm$ SEM. 4 experiências independentes foram realizadas em duplicado. As barras são, da esquerda para a direita em cada ponto de tempo, simulado, sg1128, sg0067.

[0161] **Figura 35D.** Expansão e viabilidade de células CD34+ derivadas do sangue periférico de indivíduos com doença falciforme após edição gênica. As células foram cultivadas durante 6-10 dias antes da eletroporação. D0 refere-se ao dia da eletroporação. É mostrada a viabilidade células mononucleares no dia 3, 7 e 10 após a edição. N=4, os dados mostram média $\pm$ SEM. 4 experiências independentes foram realizadas em duplicado. As barras são, da esquerda para a direita em cada ponto de tempo, simulado, sg1128, sg0067.

[0162] **Figura 36.** Eficiência de edição de sg1128 e sg0067 em células CD34+ de amostras de pacientes com doença falciforme. O padrão de edição do sg0067 foi denotado por grande exclusão (cinza) e soma de pequenos indels (preto). Os dados mostram média $\pm$ SEM de quatro experiências independentes de edição realizadas em duplicado com células CD34+ de quatro pacientes com doença falciforme diferentes (SCD1-4).

[0163] **Figura 37.** Capacidade de diferenciação multi-linhagem *in vitro* de HSPCs medida por ensaio unitário de formação de colônia. BFU-E = unidade formadora de ruptura, eritroide; CFU-GM = unidade formadora de colônia, granulócito, monócito; CFU-GEMM = unidade formadora de colônia, granulócito, eritroide, monócito, megacariócito. O gráfico mostra três experiências independentes de células CD34+ de três pacientes com doença falciforme diferentes (SCD1-3). As experiências foram realizadas em triplicado. Dados representam média $\pm$ SEM.

[0164] **Figura 38.** Nº de vezes de alteração do transcrito de g-globina nas células eritroides das amostras de pacientes após o silenciamento CRISPR de BCL11A ou da formação indel/deleção no gene g-globina. As células CD34+ derivadas de 3 pacientes com doença falciforme (SCD1-3) foram editadas por CRISPR e diferenciadas na linhagem eritroide *in vitro* como descrito nos Exemplos. No dia 11 de

diferenciação eritroide, as células foram colhidas da cultura e submetidas a qPCR para medir g-globina e transcritos da b-globina, normalizando a GAPDH. A experiência foi realizada em duplicado. Os dados mostram média $\pm$ SEM dos doadores agrupados.

[0165] **Figura 39.** Enumeração de células HbF+ em amostras de pacientes com doença falciforme após a edição de genes. As células CD34+ derivadas de 3 pacientes com doença falciforme (SCD1-3) foram editadas por CRISPR e diferenciadas na linhagem eritroide *in vitro* como descrito nos Exemplos. No dia 11, 14 e 21 da diferenciação eritroide, as células foram coradas com anticorpo anti-HbF-FITC para enumerar células HbF+ por citometria de fluxo. A experiência foi realizada em duplicado. Dados mostram média $\pm$ SEM. Mostrado no dia 11 são os resultados de SCD1-3; mostrado no dia 14 são os resultados de SCD-1 e SCD-2; mostrado no dia 21 são os resultados de SCD-2 e SCD-3.

[0166] **Figura 40.** Medição da expressão de hemoglobina fetal em amostras de pacientes com doença falciforme, editadas por genes, por citometria de fluxo. As células CD34+ derivadas de 3 pacientes com doença falciforme (SCD1-3) foram editadas por CRISPR e diferenciadas na linhagem eritroide *in vitro* como descrito nos Exemplos. No dia 11, 14 e 21 da diferenciação eritroide, as células foram coradas com anticorpo anti-HbF-FITC para medir a intensidade de expressão de HbF de cada célula por citometria de fluxo. A experiência foi realizada em duplicado. Dados mostram média $\pm$ SEM. MFI= intensidade fluorescente média. Mostrado no dia 11 são os resultados de SCD1-3; mostrado no dia 14 são os resultados de SCD-1 e SCD-2; mostrado no dia 21 são os resultados de SCD-2 e SCD-3.

[0167] **Figura 41.** Enumeração do número de células falciformes versus células normais após edição de amostras de pacientes por CRISPR. As células CD34+ derivadas de 3 pacientes com doença falciforme (SCD1-3) foram editadas por CRISPR e diferenciadas na

linhagem eritroide *in vitro* como descrito em procedimentos anteriores. No dia 21 da diferenciação eritroide, as células foram sujeitas a uma câmara de % hipoxia durante 4 dias, fixadas e seguido de citometria de fluxo de imagiologia de células únicas. A Figura 41A (painel da esquerda) mostra a mudança no número de células falciformes em amostras de pacientes editadas por genes, conforme enumeradas por imagiologia de células únicas. A Figura 41B (painel da direita) mostra a alteração no número de células normais após a edição por gene em amostras de pacientes, conforme enumerado por imagiologia de células únicas. Três experiências independentes foram realizadas, com cada experiência em duplicado. Quarenta mil imagens de células individuais foram enumeradas de cada paciente. Gráfico mostra média $\pm$ SEM dos dados agrupados.

DEFINIÇÕES

[0168] Os termos "sistema CRISPR", "sistema Cas" ou "sistema CRISPR/Cas" se referem a um conjunto de moléculas que compreende uma nuclease guiada por RNA ou outra molécula efetora e uma molécula de gRNA que juntas são necessárias e suficientes para direcionar e efetuar modificações de ácido nucléico em uma sequência-alvo pela nuclease guiada por RNA ou outra molécula efetora. Em uma modalidade, um sistema CRISPR compreende um gRNA e uma proteína Cas, por exemplo, uma proteína Cas9. Tais sistemas compreendendo uma Cas9 ou uma molécula Cas9 modificada são aqui referidos como "sistemas Cas9" ou "sistemas CRISPR/Cas9". Em um exemplo, a molécula de gRNA e a molécula Cas podem ser complexadas, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP).

[0169] Os termos "RNA guia", "molécula de RNA guia", "molécula de gRNA" ou "gRNA" são usados alternadamente e referem-se a um conjunto de moléculas de ácido nucleico que promovem o direcionamento específico de uma nuclease guiada por RNA ou outra

molécula efetora (tipicamente em complexo com a molécula de gRNA) para uma sequência-alvo. Em algumas modalidades, o referido direcionamento é realizado através de hibridização de uma porção do gRNA ao DNA (por exemplo, através do domínio-alvo gRNA), e por ligação de uma porção da molécula de gRNA à nuclease guiada por RNA ou outra molécula efetora (por exemplo, através de, pelo menos, tracr do gRNA). Em modalidades, uma molécula de gRNA consiste em uma única molécula de polinucleotídeo contíguo, aqui referida como uma "RNA guia único" ou "sgRNA" e semelhantes. Em outras modalidades, uma molécula de gRNA consiste em uma pluralidade, geralmente duas moléculas polinucleotídicas, que são elas próprias capazes de associação, usualmente através de hibridização, aqui referidas como um "RNA guia duplo" ou "dgRNA" e semelhantes. As moléculas de gRNA são descritas em mais detalhes abaixo, mas geralmente incluem um domínio-alvo e um tracr. Em modalidades, o domínio-alvo e tracr estão dispostos sobre um único polinucleotídeo. Em outras modalidades, o domínio-alvo e o tracr estão dispostos em polinucleotídeos separados.

[0170] O termo "domínio-alvo", como o termo é usado em conexão com um gRNA, é a porção da molécula de gRNA que reconhece, por exemplo, é complementar a uma sequência-alvo, por exemplo, uma sequência-alvo dentro do ácido nucleico de uma célula, por exemplo, dentro de um gene.

[0171] O termo "crRNA" como o termo é usado em conexão com uma molécula de gRNA, é uma porção da molécula de gRNA que compreende um domínio-alvo e uma região que interage com um tracr para formar uma região de mastro.

[0172] O termo "sequência-alvo" refere-se a uma sequência de ácidos nucleicos complementar, por exemplo, totalmente complementar, a um domínio-alvo de gRNA. Em modalidades, a

sequência-alvo é disposta sobre o DNA genômico. Em uma modalidade a sequência-alvo é adjacente a (quer na mesma cadeia ou na cadeia complementar de DNA) uma sequência do motivo adjacente protoespaçador (PAM) reconhecida por uma proteína tendo uma nuclease ou outra atividade efetora, por exemplo, uma sequência de PAM reconhecida por Cas9. Em modalidades, a sequência-alvo é uma sequência-alvo dentro de um gene ou locus que afeta a expressão de um gene de globina, por exemplo, que afeta a expressão de beta globina ou hemoglobina fetal (HbF). Em modalidades, a sequência-alvo é uma sequência-alvo dentro de uma região HPFH não deleção, por exemplo, está dentro de uma região promotora de HBG1 e/ou HBG2.

[0173] O termo "mastro" como usado aqui em conexão com uma molécula de gRNA, refere-se à porção do gRNA onde o crRNA e o tracr se ligam ou hibridizam um ao outro.

[0174] O termo "tracr" como usado aqui em conexão com uma molécula de gRNA, refere-se à porção do gRNA que se liga a uma nuclease ou outra molécula efetora. Em modalidades, o tracr compreende uma sequência de ácido nucleico que se liga especificamente a Cas9. Em modalidades, o tracr compreende a sequência de ácido nucleico que faz parte do mastro.

[0175] Os termos "Cas9" ou "molécula Cas9" referem-se a uma enzima do sistema CRISPR/Cas Tipo II bacteriano responsável pela clivagem do DNA. Cas9 também inclui a proteína de tipo selvagem, bem como seus mutantes funcionais e não funcionais destes. Em modalidades, Cas9 é uma Cas9 de *S. pyogenes*.

[0176] O termo "complementar" como usado em conexão com o ácido nucleico, refere-se ao par de bases, A com T ou U, e G com C. O termo complementar refere-se a moléculas de ácido nucléico que são completamente complementares, isto é, formam pares de bases de A com T ou U e pares G com C em toda a sequência de referência, bem

como moléculas que são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 99% complementares.

[0177] "Ácido Nucleico Molde", como usado em conexão com reparação dirigida por homologia ou recombinação homóloga, refere-se a ácido nucleico a ser inserido no sítio de modificação pela sequência doadora do sistema CRISPR para reparação de gene (inserção) no sítio de corte.

[0178] Uma "indel", como o termo é aqui usado, refere-se a um ácido nucleico compreendendo uma ou mais inserções de nucleotídeos, uma ou mais deleções de nucleotídeos, ou uma combinação de inserções e deleções de nucleotídeos, relativamente a um ácido nucleico de referência, que resultam depois de serem expostos a uma composição compreendendo uma molécula de gRNA, por exemplo, um sistema CRISPR. As indels podem ser determinadas por sequenciamento de ácido nucleico depois de serem expostas a uma composição compreendendo uma molécula de gRNA, por exemplo, por NGS. Com relação ao sítio de uma indel, uma indel é considerada "em ou próximo de" um sítio de referência (por exemplo, um sítio complementar a um domínio-alvo de uma molécula de gRNA) se compreender, pelo menos, uma inserção ou deleção dentro de aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 nucleotídeo(s) do sítio de referência, ou está sobreposta com parte ou todo o referido sítio de referência (por exemplo, compreende, pelo menos, uma inserção ou deleção sobreposta com, ou dentro de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 nucleotídeos de um sítio complementar ao domínio-alvo de uma molécula de gRNA, por exemplo, uma molécula de gRNA aqui descrita). Em modalidades, o indel é uma grande deleção, por exemplo, compreendendo mais do que cerca de 1 kb, mais do que cerca de 2 kb, mais do que cerca de 3 kb, mais do que cerca de 4 kb, mais do que cerca de 5 kb, mais do que cerca de 6 kb ou mais do que cerca de 10

kb de ácido nucleico. Em modalidades, a extremidade 5', a extremidade 3' ou ambas as extremidades 5' e 3' da grande deleção estão dispostas em ou perto de uma sequência-alvo de uma molécula de gRNA aqui descrita. Em modalidades, a grande deleção compreende cerca de 4,9 kb de DNA, disposta entre uma sequência-alvo de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descrita, disposta dentro da região do promotor de HBG1 e uma sequência-alvo de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descrita, disposta no interior da região do promotor de HBG2.

[0179] Um "padrão de indel", como o termo é aqui usado, refere-se a um conjunto de indels que resulta após exposição a uma composição compreendendo uma molécula de gRNA. Em uma modalidade, o padrão de indel consiste nas três primeiras indels, pela frequência de aparecimento. Em uma modalidade, o padrão de indel consiste nas cinco primeiras indels, pela frequência de aparecimento. Em uma modalidade, o padrão de indel consiste nas indels que estão presentes com uma frequência superior a cerca de 1% em relação a todas as leituras de sequenciamento. Em uma modalidade, o padrão de indel consiste nas indels que estão presentes com uma frequência superior a cerca de 5% em relação a todas as leituras de sequenciamento. Em uma modalidade, o padrão de indel consiste nas indels que estão presentes com uma frequência superior a cerca de 10% em relação ao número total de leituras de sequenciamento de indel (isto é, aquelas leituras que não consistem na sequência de ácido nucleico de referência não modificada). Em uma modalidade, o padrão de indel inclui qualquer das 3 cinco primeiras indels mais frequentemente observadas. O padrão de indel pode ser determinado, por exemplo, por métodos aqui descritos, por exemplo, por sequenciamento de células de uma população de células que foram expostas à molécula de gRNA.

[0180] Um "indel fora do alvo", como o termo é aqui usado, refere-

se a um indel em ou próximo de um sítio diferente da sequência-alvo do domínio-alvo da molécula de gRNA. Tais sítios podem compreender, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais nucleotídeos de desemparelhamento relativamente à sequência do domínio-alvo do gRNA. Em modalidades exemplificativas, tais sítios são detectados utilizando sequenciamento direcionado de sítios fora do alvo previstos *in silico*, ou através de um método de inserção conhecido na técnica. No que diz respeito aos gRNAs aqui descritos, os exemplos de indels fora do alvo são indels formados em sequências fora das regiões promotoras de HBG1 e/ou HBG2. Em modalidades exemplificativas o indel fora do alvo é formado em uma sequência de um gene, por exemplo, dentro de uma sequência de codificação de um gene.

[0181] Os termos "um" e "uma" se relacionam com um ou mais do que um (isto é, pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título exemplificativo, "um elemento" significa um elemento ou mais do que um elemento.

[0182] O termo "cerca de", quando se relaciona com um valor mensurável, como uma quantidade, uma duração temporal, e similares, pretende abranger variações de $\pm 20\%$ ou, em alguns casos, $\pm 10\%$, ou em alguns casos $\pm 5\%$, ou em alguns casos $\pm 1\%$, ou em alguns casos $\pm 0,1\%$ do valor especificado, pois tais variações são apropriadas para realizar os métodos revelados.

[0183] O termo "antígeno" ou "Ag" refere-se a uma molécula que provoca uma resposta imunológica. Esta resposta imunitária pode envolver a produção de anticorpos ou a ativação de células imunologicamente competentes específicas, ou ambas. O perito na técnica compreenderá que qualquer macromolécula, incluindo virtualmente todas as proteínas ou peptídeos, pode servir como um antígeno. Além disso, os antígenos podem ser derivados de DNA recombinante ou genômico. Um perito na técnica compreenderá que

qualquer DNA, que compreende sequências nucleotídicas ou uma sequência nucleotídica parcial codificando uma proteína que desencadeia uma resposta imunológica codifica, por conseguinte, um "antígeno" tal como o termo é aqui utilizado. Além disso, um perito na técnica compreenderá que um antígeno não necessita de ser codificado apenas por uma sequência nucleotídica completa de um gene. É evidente que a presente invenção inclui, mas não está limitada a, utilização de sequências nucleotídicas parciais de mais de um gene e que estas sequências nucleotídicas estão dispostas em várias combinações para codificar polipeptídeos que desencadeiam a resposta imunitária desejada. Além disso, um perito na técnica compreenderá que um antígeno não precisa ser codificado por um "gene" de modo algum. É prontamente aparente que um antígeno pode ser sintetizado ou pode ser derivado de uma amostra biológica, ou pode ser uma macromolécula além de um polipeptídeo. Uma tal amostra biológica pode incluir, mas não está limitada a uma amostra de tecido, uma célula ou um fluido com outros componentes biológicos.

[0184] O termo "autólogo" refere-se a qualquer material derivado do mesmo sujeito em quem será posteriormente reintroduzido.

[0185] O termo "alogeneico" se relaciona com qualquer material derivado de um animal diferente da mesma espécie do indivíduo no qual o material é introduzido. Dois ou mais sujeitos são considerados alogeneicos um ao outro quando os genes em um ou mais *loci* não são idênticos. Em alguns aspectos, material alogeneico de sujeitos da mesma espécie pode ser geneticamente bastante diferente para interagir antigenicamente.

[0186] O termo "xenogeneico" refere-se a um enxerto derivado de um animal de uma espécie diferente.

[0187] "Derivado de" como o termo é usado aqui, indica uma relação entre uma primeira e uma segunda molécula. Geralmente

refere-se à semelhança estrutural entre a primeira molécula e uma segunda molécula e não conota ou inclui um processo ou limitação de fonte em uma primeira molécula que é derivada de uma segunda molécula.

[0188] O termo "codificando" se relaciona com a propriedade inerente de sequências específicas de nucleotídeos em um polinucleotídeo, como um gene, um cDNA ou um mRNA, para servir como moldes para a síntese de outros polímeros e macromoléculas em processos biológicos tendo uma sequência definida de nucleotídeos (por exemplo, rRNA, tRNA e mRNA) ou uma sequência definida de aminoácidos e as propriedades biológicas daí resultantes. Assim, um gene, cDNA, ou RNA, codifica uma proteína se a transcrição e tradução do mRNA correspondente a esse gene produz a proteína em uma célula ou outro sistema biológico. Tanto a cadeia codificante, cuja sequência nucleotídica é idêntica à sequência de mRNA, como é habitualmente fornecida em listas de sequências, e a cadeia não codificante, utilizada como modelo para a transcrição de um gene ou cDNA, pode ser referida como codificando a proteína ou outro produto desse gene ou cDNA.

[0189] A menos que especificado de outro modo, uma "sequência nucleotídica codificando uma sequência de aminoácidos" inclui todas as sequências nucleotídicas que são versões degeneradas uma da outra e que codificam a mesma sequência de aminoácidos. A frase sequência nucleotídica que codifica uma proteína ou um RNA também pode incluir íntrons na medida em que a sequência nucleotídica codificando a proteína pode, em algumas versões, conter um(ns) íntron(s).

[0190] Os termos "quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" são aqui usados indistintamente, e se relacionam com uma quantidade de um composto, formulação, material ou composição, como aqui descrito, eficaz para alcançar um resultado biológico particular.

[0191] O termo "endógeno" refere-se a qualquer material de ou produzido dentro de um organismo, célula, tecido ou sistema.

[0192] O termo "exógeno" refere-se a qualquer material introduzido de ou produzido fora de um organismo, célula, tecido ou sistema.

[0193] O termo "expressão" se relaciona com a transcrição e/ou tradução de uma sequência particular de nucleotídeos dirigida por um promotor.

[0194] O termo "vetor de transferência" se relaciona com uma composição de matéria que compreende um ácido nucleico isolado e que pode ser utilizada para distribuir o ácido nucleico isolado no interior de uma célula. Numerosos vetores são conhecidos na técnica, incluindo, mas não limitados a, polinucleotídeos lineares, polinucleotídeos associados com compostos iônicos ou anfifílicos, plasmídeos e vírus. Assim, o termo "vetor de transferência" inclui um plasmídeo ou um vírus de replicação autônoma. O termo também deve ser entendido para incluir adicionalmente compostos não plasmídicos e não virais que facilitam a transferência de ácido nucleico para as células, tal como, por exemplo, um composto de polilisina, lipossoma e semelhantes. Exemplos de vetores de transferência virais incluem, mas não estão limitados a, vetores adenovirais, vetores de vírus adeno-associados, vetores retrovirais, vetores lentivirais e semelhantes.

[0195] O termo "vetor de expressão" refere-se a um vetor compreendendo um polinucleotídeo recombinante compreendendo sequências de controle de expressão operativamente ligadas a uma sequência de nucleotídeos a ser expressa. Um vetor de expressão compreende elementos de ação cis suficientes para expressão; outros elementos para expressão podem ser fornecidos pela célula hospedeira ou em um sistema de expressão *in vitro*. Os vetores de expressão incluem todos os conhecidos na técnica, incluindo cosmídeos, plasmídeos (por exemplo, nus ou contidos em lipossomas) e vírus (por

exemplo, lentivírus, retrovírus, adenovírus e vírus adenoassociados) que incorporam o polinucleotídeo recombinante.

[0196] O termo "homólogo" ou "identidade" se relaciona com a identidade da sequência de subunidades entre duas moléculas poliméricas, por exemplo, entre duas moléculas de ácido nucleico, tais como, duas moléculas de DNA ou duas moléculas de RNA, ou entre duas moléculas polipeptídicas. Quando uma subunidade em ambas as moléculas é ocupada pela mesma subunidade monomérica; por exemplo, se uma posição em cada uma das duas moléculas de DNA é ocupada por adenina, então elas são homólogas ou idênticas nessa posição. A homologia entre duas sequências é uma função direta do número de posições correspondentes ou homólogas; por exemplo, se metade (por exemplo, cinco posições em um polímero com dez subunidades de comprimento) das posições em duas sequências forem homólogas, as duas sequências são 50% homólogas; se 90% das posições (por exemplo, 9 de 10) forem correspondentes ou homólogas, as duas sequências são 90% homólogas.

[0197] O termo "isolado" significa alterado ou removido do estado natural. Por exemplo, um ácido nucleico ou um peptídeo naturalmente presente em um animal vivo não é "isolado", mas o mesmo ácido nucleico ou peptídeo parcialmente ou completamente separado dos materiais coexistentes de seu estado natural é "isolado". Um ácido nucleico isolado ou proteína pode existir em forma substancialmente purificada, ou pode existir em um ambiente não nativo tal como, por exemplo, uma célula hospedeira.

[0198] O termo "operacionalmente ligado" ou "controle de transcrição" refere-se à ligação funcional entre uma sequência reguladora e uma sequência de ácido nucleico heteróloga resultando na expressão da última. Por exemplo, uma primeira sequência de ácido nucleico está operativamente ligada a uma segunda sequência de ácido

nucleico quando a primeira sequência de ácido nucleico é colocada em uma relação funcional com a segunda sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação se o promotor afetar a transcrição ou expressão da sequência de codificação. Sequências de DNA ligadas operativamente podem ser contíguas entre si e, por exemplo, quando necessário unir duas regiões codificantes de proteínas, estão no mesmo quadro de leitura.

[0199] O termo administração "parentérica" de uma composição imunogênica inclui, por exemplo, técnicas de injeção subcutânea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) ou intraesterno, intratumoral ou de infusão.

[0200] O termo "ácido nucleico" ou "polinucleotídeo" se relaciona com ácidos desoxirribonucleicos (DNA) ou ácidos ribonucleicos (RNA) e seus polímeros na forma de fita simples ou dupla. A menos que especificamente limitado, o termo abrange ácidos nucleicos contendo análogos conhecidos de nucleotídeos naturais que têm propriedades de ligação semelhantes ao ácido nucleico de referência e são metabolizados de uma maneira semelhante aos nucleotídeos de ocorrência natural. A menos que indicado de outro modo, uma sequência de ácido nucleico particular abrange também implicitamente variantes conservativamente modificadas destes (por exemplo, substituições de códons degenerados), alelos, ortólogos, SNPs e sequências complementares, assim como a sequência indicada explicitamente. Especificamente, podem ser obtidas substituições de códons degenerados gerando sequências em que a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou todos) é substituída com resíduos de base mista e/ou desoxiinosina (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); e Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

[0201] Os termos "peptídeo", "polipeptídeo" e "proteína" são utilizados alternadamente e se relacionam com um composto constituído por resíduos de aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. Uma proteína ou peptídeo deve conter, pelo menos, dois aminoácidos, e nenhuma limitação é colocada no número máximo de aminoácidos que uma sequência de proteína ou peptídeo pode compreender. Os polipeptídeos incluem qualquer peptídeo ou proteína compreendendo dois ou mais aminoácidos ligados uns aos outros por ligações peptídicas. Como aqui utilizado, o termo refere-se a ambas as cadeias curtas, que também são vulgarmente referidas na técnica como peptídeos, oligopeptídeos e oligômeros, por exemplo, e a cadeias mais longas, que geralmente são referidas na técnica como proteínas, das quais há muitos tipos. Os "polipeptídeos" incluem, por exemplo, fragmentos biologicamente ativos, polipeptídeos, oligopeptídeos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipeptídeos, polipeptídeos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusão, entre outros, substancialmente homólogos. Um polipeptídeo inclui um peptídeo natural, um peptídeo recombinante ou uma combinação destes.

[0202] O termo "promotor" se relaciona com uma sequência de DNA reconhecida pela maquinaria sintética da célula ou maquinaria sintética introduzida, requerida para iniciar a transcrição específica de uma sequência polinucleotídica.

[0203] O termo "sequência promotora/reguladora" se relaciona com uma sequência de ácido nucleico que é necessária para expressão de um produto genético operativamente ligado à sequência promotora/reguladora. Em alguns casos, esta sequência pode ser a sequência principal do promotor e em outros casos, esta sequência pode também incluir uma sequência intensificadora e outros elementos reguladores que são necessários para a expressão do produto do gene. A sequência promotora/reguladora pode, por exemplo, ser uma que

expresse o produto do gene de um modo específico para o tecido.

[0204] O termo promotor "constitutivo" refere-se a uma sequência nucleotídica que, quando operativamente ligada a um polinucleotídeo que codifica ou especifica um produto do gene, faz com que o produto do gene seja produzido em uma célula sob a maioria ou todas as condições fisiológicas da célula.

[0205] O termo promotor "indutível" refere-se a uma sequência nucleotídica que, quando operativamente ligada a um polinucleotídeo que codifica ou especifica um produto do gene, faz com que o produto do gene seja produzido em uma célula substancialmente apenas quando um indutor que corresponde ao promotor está presente na célula.

[0206] O termo promotor "tecido específico" refere-se a uma sequência nucleotídica que, quando operativamente ligada a um polinucleotídeo codifica ou especifica um gene, faz com que o produto do gene seja produzido em uma célula substancialmente apenas se a célula for uma célula do tipo de tecido correspondente ao promotor.

[0207] Como usado aqui em conexão com um RNA mensageiro (mRNA), um cap 5' (também denominado cap de RNA, cap 7-metilguanosina de RNA ou cap m7G de RNA) é um nucleotídeo de guanina modificado que foi adicionado à "frente" ou na extremidade 5' de um RNA mensageiro eucariótico logo após o início da transcrição. O cap 5' consiste em um grupo terminal que está ligado ao primeiro nucleotídeo transcrito. Sua presença é crucial para o reconhecimento pelo ribossomo e proteção de RNases. A adição de cap é acoplada à transcrição e ocorre transcricionalmente, de tal forma que cada um influencia o outro. Logo após o início da transcrição, a extremidade 5' do mRNA que está sendo sintetizado é ligada por um complexo sintetizador de cap associado à RNA polimerase. Este complexo enzimático catalisa as reações químicas que são necessárias para o

capping de mRNA. A síntese prossegue como uma reação bioquímica de múltiplas etapas. A fração de *capping* pode ser modificada para modular a funcionalidade de mRNA, tal como a sua estabilidade ou a eficiência de tradução.

[0208] Como usado aqui, "RNA transcrito *in vitro*" se relaciona com RNA, preferencialmente mRNA, que foi sintetizado *in vitro*. Geralmente, o RNA transcrito *in vitro* é gerado a partir de um vetor de transcrição *in vitro*. O vetor de transcrição *in vitro* compreende um molde que é utilizado para gerar o RNA transcrito *in vitro*.

[0209] Como usado aqui, uma "poli(A)" é uma série de adenosinas ligadas por poliadenilação ao mRNA. Na modalidade preferida de um construto para expressão transiente, a poliA está entre 50 e 5000 (SEQ ID NO: 190), de preferência superior a 64, mais preferencialmente superior a 100, mais preferencialmente superior a 300 ou 400. As sequências poli(A) podem ser modificadas química ou enzimaticamente para modular a funcionalidade do mRNA, tais como localização, estabilidade ou eficiência da tradução.

[0210] Como usado aqui, "poliadenilação" se relaciona com a ligação covalente de uma fração poliadenilila, ou sua variante modificada, a uma molécula de RNA mensageiro. Em organismos eucarióticos, a maioria das moléculas de RNA mensageiro (mRNA) são poliadeniladas na extremidade 3'. A cauda poli(A) 3' é uma longa sequência de nucleotídeos de adenina (muitas vezes centenas) adicionados ao pré-mRNA através da ação de uma enzima polimerase de poliadenilato. Em eucariotas superiores, a cauda poli(A) é adicionada a transcritos que contêm uma sequência específica, o sinal de poliadenilação. A cauda poli(A) e a proteína ligada a ela ajudam a proteger o mRNA da degradação por exonucleases. A poliadenilação também é importante para a terminação da transcrição, exportação do mRNA do núcleo e tradução. A poliadenilação ocorre no núcleo

imediatamente após a transcrição do DNA em RNA, mas também pode ocorrer posteriormente no citoplasma. Após a terminação da transcrição, a cadeia de mRNA é clivada pela ação de um complexo de endonuclease associado à RNA polimerase. O sítio de clivagem é geralmente caracterizado pela presença da sequência de bases AAUAAA perto do sítio de clivagem. Após a clivagem do mRNA, os resíduos de adenosina são adicionados à extremidade 3' livre no sítio de clivagem.

[0211] Como usado aqui, "transiente" se relaciona com expressão de um transgene não integrado durante um período de horas, dias ou semanas, em que o período de tempo da expressão é menor do que o período de tempo para a expressão do gene se integrado no genoma ou contido dentro de um replicon de plasmídeo estável na célula hospedeira.

[0212] Como usado aqui, os termos "tratar", "tratamento" e "tratando" referem-se à redução ou melhoria da progressão, gravidade e/ou duração de um distúrbio, por exemplo, uma hemoglobinopatia, ou a melhoria de um ou mais sintomas (preferencialmente, um ou mais sintomas discerníveis) de um distúrbio, por exemplo, uma hemoglobinopatia, resultante da administração de uma ou mais terapias (por exemplo, um ou mais agentes terapêuticos, tal como uma molécula de gRNA, sistema CRISPR ou célula modificada da invenção). Em modalidades específicas, os termos "tratar", "tratamento" e "tratando" referem-se à melhoria de, pelo menos, um parâmetro físico mensurável de um distúrbio de hemoglobinopatia, não discernível pelo paciente. Em outras modalidades, os termos "tratar", "tratamento" e "tratando" referem-se à inibição da progressão de um distúrbio, seja fisicamente, por exemplo, estabilização de um sintoma discernível, fisiologicamente por, por exemplo, estabilização de um parâmetro físico, ou ambos. Noutras modalidades, os termos "tratar", "tratamento" e "tratando"

referem-se à redução ou estabilização de um sintoma de uma hemoglobinopatia, por exemplo, doença falciforme e beta-talassemia.

[0213] O termo "via de transdução de sinal" se relaciona com a relação bioquímica entre uma variedade de moléculas de transdução de sinal que desempenham um papel na transmissão de um sinal de uma porção de uma célula para outra porção de uma célula. A frase "receptor da superfície celular" inclui moléculas e complexos de moléculas capazes de receber um sinal e transmitir o sinal através da membrana de uma célula.

[0214] O termo "sujeito" pretende incluir organismos vivos nos quais uma resposta imune pode ser desencadeada (por exemplo, mamíferos, humano).

[0215] O termo uma célula "substancialmente purificada" se relaciona com uma célula que está essencialmente desprovida de outros tipos de células. Uma célula substancialmente purificada também se refere a uma célula que foi separada de outros tipos de células com os quais está normalmente associada no seu estado natural. Em alguns casos, uma população de células substancialmente purificadas refere-se a uma população homogênea de células. Em outros casos, este termo refere-se simplesmente a células que foram separadas das células com as quais estão naturalmente associadas em seu estado natural. Em alguns aspectos, as células são cultivadas *in vitro*. Em outros aspectos, as células não são cultivadas *in vitro*.

[0216] O termo "terapêutico" como usado aqui significa um tratamento. Um efeito terapêutico é obtido pela redução, supressão, remissão ou erradicação de um estado de doença.

[0217] O termo "profilaxia" como aqui utilizado significa a prevenção ou tratamento protetor para uma doença ou estado de doença.

[0218] O termo "transfectado" ou "transformado" ou "transduzido" refere-se a um processo pelo qual ácido nucleico exógeno e/ou proteína

é transferido ou introduzido na célula hospedeira. Uma célula "transfectada" ou "transformada" ou "transduzida" é aquela que foi transfectada, transformada ou transduzida com ácido nucleico exógeno e/ou proteína. A célula inclui a célula principal e sua descendência.

[0219] O termo "liga-se especificamente" refere-se a uma molécula que reconhece e se liga com um parceiro de ligação (por exemplo, uma proteína ou ácido nucleico) presente em uma amostra, mas cuja molécula não reconhece substancialmente ou se liga a outras moléculas na amostra.

[0220] O termo "bioequivalente" refere-se a uma quantidade de um agente diferente do composto de referência, necessária para produzir um efeito equivalente ao efeito produzido pela dose de referência ou quantidade de referência do composto de referência.

[0221] "Refratário", como aqui utilizado, refere-se a uma doença, por exemplo, uma hemoglobinopatia, que não responde a um tratamento. Em modalidades, uma hemoglobinopatia refratária pode ser resistente a um tratamento antes ou no início do tratamento. Em outras modalidades, a hemoglobinopatia refratária pode tornar-se resistente durante um tratamento. Uma hemoglobinopatia refratária também é designada de hemoglobinopatia resistente.

[0222] "Recidivo" como aqui utilizado refere-se ao retorno de uma doença (por exemplo, hemoglobinopatia) ou aos sinais e sintomas de uma doença, tal como uma hemoglobinopatia após um período de melhoria, por exemplo, após tratamento prévio de uma terapia, por exemplo, terapia de hemoglobinopatia.

[0223] Intervalos: ao longo desta divulgação, vários aspectos da invenção podem ser apresentados em um formato de intervalo. Deve ser entendido que a descrição em formato de intervalo é meramente por conveniência e brevidade e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível no âmbito da invenção. Por conseguinte, a descrição

de um intervalo deve ser considerada como tendo divulgado especificamente todos os possíveis subintervalos, bem como valores numéricos individuais dentro desse intervalo. Por exemplo, a descrição de um intervalo de 1 a 6 deve ser considerada como tendo subintervalos especificamente divulgados, como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., bem como números individuais dentro desse intervalo, por exemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 e 6. Como outro exemplo, um intervalo, tal como 95-99% de identidade, inclui algo com 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade e inclui subintervalos como 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% e 98-99% de identidade. Isso se aplica independentemente da amplitude do intervalo.

[0224] O termo "BCL11a" refere-se a linfoma de células B/leucemia 11A, uma proteína de ligação ao DNA específica da sequência da região proximal do promotor principal da RNA polimerase II e o gene que codifica a referida proteína, juntamente com todos os íntrons e éxons. Este gene codifica uma proteína de dedo de zinco do tipo C2H2. Descobriu-se que a BCL11A desempenha um papel na supressão da produção de hemoglobina fetal. BCL11a é também conhecida como Célula B CLL/Linfoma 11A (Proteína de Dedo de Zinco), CTIP1, EVI9, Homólogo da Proteína do Sítio 9 de Integração Viral Ecotrópico, Proteína 1 Interativa de COUP-TF, Proteína de Dedo de Zinco 856, KIAA1809, BCL-11A, ZNF856, EVI-9 e Célula B CLL/Linfoma 11A. O termo abrange todas as isoformas e variantes de emenda de BCL11a. O gene humano que codifica BCL11a é mapeado para a localização cromossômica 2p16.1 (por Ensembl). As sequências de aminoácidos e de ácidos nucleicos humanas e de murinos podem ser encontradas em uma base de dados pública, tal como GenBank, UniProt e Swiss-Prot., e a sequência genômica de BCL11a humana pode ser encontrada no GenBank em NC_000002.12. O gene BCL11a refere-se a esta localização genômica, incluindo todos os íntrons e éxons. Existem

vários isotipos conhecidos de BCL11a.

[0225] A sequência de mRNA codificando a isoforma 1 da BCL11a humana pode ser encontrada em NM_022893.

[0226] A sequência peptídica da isoforma 1 da BCL11a humana é:

10	20	30	40	50
MSRRKQGKPQ	HLSKREFSPE	PLEAILTDDE	PDHGPLGAPE	GDHDLLTCGQ
60	70	80	90	100
CQMNFPGLDI	LIFIEHKRKQ	CNGSLCLEKA	VDKPPSPSPI	EMKKASNPVE
110	120	130	140	150
VGIQVTPEDD	DCLSTSSRGI	CPKQEHIA DK	LLHWRGLSSP	RSAHGALIPT
160	170	180	190	200
PGMSAEYAPQ	GICKDEPSSY	TCTTCKQPFT	SAWFLLQHAQ	NTHGLRIYLE
210	220	230	240	250
SEHGSPLTPR	VGIPSGLGAE	CPSQPPLHGI	HIADNNPFNL	LRIPGSVSRE
260	270	280	290	300
ASGLAEGRFP	PTPPLFSPPP	RHHLDPHRIE	RLGAEEMALA	THHPSAFDRV
310	320	330	340	350
LRLNPMAMEP	PAMDFSRR LR	ELAGNTSSPP	LSPGRPSPMQ	RLLQPFQPGS
360	370	380	390	400
KPPFLATPPL	PPLQSAPPPS	QPPVKSKSCE	FCGKTFKFQS	NLVVHRRSHT
410	420	430	440	450
GEKPYKCNLC	DHACTQASKL	KRHMKTHMHK	SSPMTVKSDD	GLSTASSPEP
460	470	480	490	500
GTSDLVGSAS	SALKSVVAKF	KSENDPNLIP	ENGDEEEEEED	DEEEEEEEEEEE
510	520	530	540	550
EEEELTESER	VDYGFGLSLE	AARHHENSSR	GAVVGVGDES	RALPDVMQGM
560	570	580	590	600
VLSSMQHFSE	AFHQVLGEKH	KRGHLAEAEG	HRDTCDEDSV	AGESDRIDDG
610	620	630	640	650
TVNGRGCSPG	ESASGGLSKK	LLLGSPSSLS	PFSKRIKLEK	EFDLPPAAMP
660	670	680	690	700

```

NTENVYSQWL AGYAASRQLK DPFLSFGDSR QSPFASSEH SSENGSLRFS
      710      720      730      740      750
TPPGELDGGI SGRSGTGSGG STPHISGPGP GRPSSKEGRR SDTCEYCGKV
      760      770      780      790      800
FKNCSNLT VH RRSHTGERPY KCELCNYACA QSSKLTRHMK THGQVGKD VY
      810      820      830
KCEICKMPFS VYSTLEKHMK KWHSDRVLNN DIKTE

```

SEQ ID NO: 245 (Identificador Q9H165-1; e NM_022893.3; e acesso ADL14508.1).

[0227] As sequências de outras isoformas da proteína BCL11a são fornecidas em:

Isoforma 2: Q9H165-2

Isoforma 3: Q9H165-3

Isoforma 4: Q9H165-4

Isoforma 5: Q9H165-5

Isoforma 6: Q9H165-6

[0228] Tal como aqui utilizado, uma proteína humana BCL11a engloba também proteínas que possuem sobre o seu comprimento total, pelo menos cerca de 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com BCL11A isoforma 1-6, em que tais proteínas têm ainda, pelo menos, uma das funções de BCL11a.

[0229] O termo "locus da globina" como aqui utilizado refere-se à região do cromossomo humano 11 compreendendo genes para genes da globina embrionária (ϵ), fetal (G (γ) e A (γ)), adultos (γ e β), regiões de controle do locus e sítios de hipersensibilidade de DNase I.

[0230] O termo "complementar" como usado em conexão com o ácido nucleico, refere-se ao par de bases, A com T ou U, e G com C. O termo complementar refere-se a moléculas de ácido nucléico que são

completamente complementares, isto é, formam pares de bases de A com T ou U e pares G com C em toda a sequência de referência, bem como moléculas que são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 99% complementares.

[0231] O termo "HPFH não deleção" refere-se a uma mutação que não compreende uma inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos, que resulta em persistência hereditária da hemoglobina fetal e é caracterizada pelo aumento da hemoglobina fetal em glóbulos vermelhos adultos. Em modalidades exemplificativas, a HPFH não deleção é uma mutação descrita em Nathan e Oski Hematology and Oncology of Infancy and Childhood, 8ª Ed., 2015, Orkin SH, Fisher DE, Look T, Lux SE, Ginsburg D, Nathan DG, Eds. Elsevier Saunders, cujo conteúdo total é aqui incorporado por referência, por exemplo, as mutações HPFH não deleção descritas na Tabela 21-5. O termo "região HPFH não deleção" refere-se a um sítio genômico que compreende ou está próximo de uma HPFH não deleção. Em modalidades exemplificativas, a região HPFH não deleção é a sequência de ácido nucleico da região promotora de HBG1 (Chr11:5,249,833 a Chr11:5,250,237, hg38; - cadeia), a sequência de ácido nucleico da região promotora de HBG2 (Chr11:5,254,738 a Chr11:5,255,164, hg38; - cadeia), ou combinações das mesmas. Em modalidades exemplificativas, a região HPFH não deleção inclui uma ou mais da HPFH não deleção descrita em Nathan e Oski Hematology and Oncology of Infancy and Childhood, 8ª Ed., 2015, Orkin SH, Fisher DE, Look T, Lux SE, Ginsburg D, Nathan DG, Eds. Elsevier Saunders (por exemplo, descrito na Tabela 21-5). Em modalidades exemplificativas, a região HPFH não deleção é a sequência de ácido nucleico em chr11:5,250,094-5,250,237, - cadeia, hg38; ou a sequência de ácido nucleico em chr11:5,255,022-5,255,164, - cadeia, hg38; ou a sequência de ácido nucleico em chr11: 5,249,833-5,249,927, - cadeia, hg38; ou a

sequência de ácido nucleico em chr11: 5,254,738-5,254,851, - cadeia, hg38; ou a sequência de ácido nucleico em chr11:5,250,139-5,250,237, - cadeia, hg38; ou suas combinações.

[0232] "Intensificador BCL11a" como o termo aqui utilizado, refere-se a sequência de ácido nucleico que afeta, por exemplo, intensifica, a expressão ou função de BCL11a. Ver, por exemplo, Bauer et al., Science, vol. 342, 2013, pp. 253-257. O intensificador BCL11a pode ser, por exemplo, operativo apenas em certos tipos de células, por exemplo, células da linhagem eritroide. Um exemplo de um intensificador BCL11a é a sequência de ácido nucleico entre o éxon 2 e o éxon 3 do gene BCL11a (por exemplo, o ácido nucleico em ou correspondendo a posições +55: Chr2:60497676- 60498941; +58: Chr2:60494251- 60495546; +62: Chr2:60490409- 60491734 como registrado em hg38). Em uma modalidade, o Intensificador de BCL11a é a região +62 da sequência de ácido nucleico entre o éxon 2 e o éxon 3 do gene BCL11a. Em uma modalidade, o Intensificador de BCL11a é a região +58 da sequência de ácido nucleico entre o éxon 2 e o éxon 3 do gene BCL11a. Em uma modalidade, o Intensificador de BCL11a é a região +55 da sequência de ácido nucleico entre o éxon 2 e o éxon 3 do gene BCL11a.

[0233] Os termos "células-tronco e progenitoras hematopoiéticas" ou "HSPC" são utilizados de forma intercambiável e referem-se a uma população de células compreendendo células-tronco hematopoiéticas ("HSCs") e células progenitoras hematopoiéticas ("HPCs"). Tais células são caracterizadas, por exemplo, como CD34+. Em modalidades exemplificativas, as HSPCs são isoladas da medula óssea. Em outras modalidades exemplificativas, as HSPCs são isoladas a partir de sangue periférico. Em outras modalidades exemplificativas, as HSPCs são isoladas do sangue do cordão umbilical. Em uma modalidade, as HSPCs são caracterizadas como CD34+/CD38-/CD90+/CD45RA-. Em

modalidades, as HSPCs são caracterizadas como células CD34+/CD90+/CD49f+. Em modalidades, as HSPCs são caracterizadas como células CD34+. Em modalidades, as HSPCs são caracterizadas como células CD34+/CD90+. Em modalidades, as HSPCs são caracterizadas como células CD34+/CD90+/CD45RA-.

[0234] "Expansor de células-tronco" tal como aqui utilizado refere-se a um composto que faz com que as células, por exemplo, HSPCs, HSCs e/ou HPCs proliferem, por exemplo, aumentem em número, a uma taxa mais rápida relativamente aos mesmos tipos de células ausentes do referido agente. Em um aspecto exemplificativo, o expansor de células-tronco é um inibidor da via do receptor de hidrocarboneto de arila. Exemplos adicionais de expansores de células-tronco são fornecidos abaixo. Em modalidades, a proliferação, por exemplo, aumento em número, é realizada *ex vivo*.

[0235] "Enxerto" refere-se à incorporação de uma célula ou tecido, por exemplo, uma população de HSPCs, no corpo de um receptor, por exemplo, um mamífero ou sujeito humano. Em um exemplo, o enxerto inclui o crescimento, expansão e/ou diferenciação das células enxertadas no recipiente. Em um exemplo, o enxerto de HSPCs inclui a diferenciação e crescimento das referidas HSPCs em células eritroides dentro do corpo do receptor.

[0236] O termo "células progenitoras hematopoiéticas" (HPCs) como usado aqui refere-se a células hematopoiéticas primitivas que têm uma capacidade limitada de auto-renovação e o potencial para diferenciação de multilinhagem (por exemplo, mieloide, linfóide), diferenciação de linhagem única (por exemplo, mieloide ou linfóide) ou diferenciação restrita de tipo celular (por exemplo, progenitor eritroide) dependendo da colocação dentro da hierarquia hematopoiética (Doulatov et al., Cell Stem Cell 2012).

[0237] "Células-tronco hematopoiéticas" (HSCs) como usadas aqui

referem-se a células sanguíneas imaturas com capacidade de se auto-renovarem e se diferenciarem em células sanguíneas mais maduras compreendendo granulócitos (por exemplo, promielócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos), eritrócitos (por exemplo, reticulócitos, eritrócitos), trombócitos (por exemplo, megacarioblastos, megacariócitos produtores de plaquetas, plaquetas) e monócitos (por exemplo, monócitos, macrófagos). As HSCs são descritas de forma intercambiável como células-tronco ao longo do relatório descritivo. É conhecido na técnica que tais células podem ou não incluir células CD34+. As células CD34+ são células imaturas que expressam o marcador de superfície celular CD34. Crê-se que as células CD34+ incluem uma subpopulação de células com as propriedades das células-tronco definidas acima. É bem conhecido na técnica que as HSCs são células multipotentes que podem dar origem a células progenitoras primitivas (por exemplo, células progenitoras multipotentes) e/ou células progenitoras comprometidas com linhagens hematopoiéticas específicas (por exemplo, células progenitoras linfoides). As células-tronco comprometidas com linhagens hematopoiéticas específicas podem ser de linhagem de células T, linhagem de células B, linhagem de células dendríticas, linhagem de células de Langerhans e/ou linhagem de células de macrófagos específicos do tecido linfóide. Além disso, as HSCs também se referem a HSC de longo prazo (LT-HSC) e HSC de curto prazo (ST-HSC). As ST-HSCs são mais ativas e mais proliferativas que as LT-HSCs. No entanto, as LT-HSC têm autorrenovação ilimitada (isto é, sobrevivem ao longo da idade adulta), enquanto as ST-HSC têm autorrenovação limitada (isto é, sobrevivem apenas por um período de tempo limitado). Qualquer uma destas HSCs pode ser usada em qualquer dos métodos aqui descritos. Opcionalmente, as ST-HSCs são úteis porque são altamente proliferativas e, assim, aumentam rapidamente o número de HSCs e sua

descendência. As células-tronco hematopoiéticas são facultativamente obtidas a partir de produtos sanguíneos. Um produto sanguíneo inclui um produto obtido a partir do corpo ou de um órgão do corpo contendo células de origem hematopoiética. Tais fontes incluem medula óssea não fracionada, cordão umbilical, sangue periférico (por exemplo, sangue periférico mobilizado, por exemplo, mobilizado com um agente de mobilização, tal como G-CSF ou Plerixafor® (AMD3100)), ou uma combinação de G-CSF e Plerixafor® (AMD3100)), fígado, timo, linfa e baço. Todos os produtos sanguíneos em bruto ou não fracionados acima mencionados podem ser enriquecidos para células que possuam características de células-tronco hematopoiéticas de formas conhecidas pelos peritos na técnica. Em uma modalidade, as HSCs são caracterizadas como CD34+/CD38-/CD90+/CD45RA-. Em modalidades, as HSCs são caracterizadas como células CD34+/CD90+/CD49f+. Em modalidades, as HSCs são caracterizadas como células CD34+. Em modalidades, as HSCs são caracterizadas como células CD34+/CD90+. Em modalidades, as HSCs são caracterizadas como células CD34+/CD90+/CD45RA-.

[0238] "Expansão" ou "Expandir" no contexto de células refere-se a um aumento no número de um tipo de célula característica, ou tipos de células, de uma população de células inicial de células, que pode ou não ser idêntica. As células iniciais usadas para expansão podem não ser as mesmas que as células geradas a partir da expansão.

[0239] "População de células" refere-se a células eucarióticas de mamíferos, de preferência humanas, isoladas de fontes biológicas, por exemplo, produtos sanguíneos ou tecidos e derivados de mais de uma célula.

[0240] "Enriquecido" quando usado no contexto da população de células refere-se a uma população de células selecionada com base na presença de um ou mais marcadores, por exemplo, CD34+.

[0241] O termo "células CD34+" refere-se a células que expressam em sua superfície o marcador CD34. As células CD34+ podem ser detectadas e contadas utilizando, por exemplo, citometria de fluxo e anticorpos anti-CD34 marcados de modo fluorescente.

[0242] "Enriquecido em células CD34+" significa que uma população de células foi selecionada com base na presença do marcador CD34. Por conseguinte, a percentagem de células CD34+ na população de células após o método de seleção é superior à percentagem de células CD34+ na população celular inicial antes de selecionar o etapa com base nos marcadores CD34. Por exemplo, as células CD34+ podem representar, pelo menos, 50%, 60%, 70%, 80% ou, pelo menos, 90% das células em uma população celular enriquecida em células CD34+.

[0243] Os termos "célula F" e "célula-F" referem-se a células, usualmente eritrócitos (por exemplo, glóbulos vermelhos) que contêm e/ou produzem (por exemplo, expressam) hemoglobina fetal. Por exemplo, uma célula F é uma célula que contém ou produz níveis detectáveis de hemoglobina fetal. Por exemplo, uma célula F é uma célula que contém ou produz, pelo menos, 5 picogramas de hemoglobina fetal. Em outro exemplo, uma célula F é uma célula que contém ou produz, pelo menos, 6 picogramas de hemoglobina fetal. Em outro exemplo, uma célula F é uma célula que contém ou produz, pelo menos, 7 picogramas de hemoglobina fetal. Em outro exemplo, uma célula F é uma célula que contém ou produz, pelo menos, 8 picogramas de hemoglobina fetal. Em outro exemplo, uma célula F é uma célula que contém ou produz, pelo menos, 9 picogramas de hemoglobina fetal. Em outro exemplo, uma célula F é uma célula que contém ou produz, pelo menos, 10 picogramas de hemoglobina fetal. Os níveis de hemoglobina fetal podem ser medidos utilizando um ensaio aqui descrito ou por outro método conhecido na técnica, por exemplo, citometria de fluxo usando

um reagente anti-fetal de detecção de hemoglobina, cromatografia líquida de elevada eficiência, espectrometria de massa ou um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima.

[0244] Salvo indicação em contrário, todas as coordenadas do genoma ou cromossomo estão de acordo com hg38.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0245] As moléculas de gRNA, composições e métodos aqui descritos referem-se à edição do genoma em células eucarióticas utilizando o sistema CRISPR/Cas9. Em particular, as moléculas de gRNA, composições e métodos aqui descritos referem-se à regulação dos níveis de globina e são úteis, por exemplo, na regulação da expressão e produção de genes e proteínas da globina. As moléculas de gRNA, composições e métodos podem ser úteis no tratamento de hemoglobinopatias.

I . Moléculas de gRNA

[0246] Uma molécula de gRNA pode ter vários domínios, como descrito mais completamente abaixo, no entanto, uma molécula de gRNA compreende tipicamente, pelo menos, um domínio de crRNA (compreendendo um domínio-alvo) e um tracr. As moléculas de gRNA da invenção, utilizadas como um componente de um sistema CRISPR, são úteis para modificar o DNA (por exemplo, modificar a sequência) no sítio-alvo ou perto do mesmo. Tais modificações incluem deleções e ou inserções que resultam, por exemplo, na expressão reduzida ou eliminada de um produto funcional do gene compreendendo o sítio-alvo. Esses usos, e usos adicionais, são descritos mais detalhadamente abaixo.

[0247] Em uma modalidade, um unimolecular ou sgRNA compreende, de preferência de 5' a 3': um crRNA (que contém um domínio-alvo complementar a uma sequência-alvo e uma região que faz parte de um mastro (isto é, uma região mastro de crRNA)) ; uma alça; e

um tracr (que contém um domínio complementar à região mastro do crRNA e um domínio que adicionalmente liga uma nuclease ou outra molécula efetora, por exemplo, uma molécula Cas, por exemplo, uma molécula aCas9), e pode ter o seguinte formato (de 5' para 3'):

[domínio-alvo] - [região de mastro de crRNA] - [primeira extensão de mastro opcional] - [alça] - [primeira extensão de tracr opcional] - [região de mastro de tracr] - [domínio de ligação de nuclease de tracr].

[0248] Em modalidades, o domínio de ligação de nuclease tracr se liga a uma proteína Cas, por exemplo, uma proteína Cas9.

[0249] Em uma modalidade, um bimolecular ou sgRNA compreende dois polinucleotídeos; o primeiro, de preferência de 5' a 3': um crRNA (que contém um domínio-alvo complementar a uma sequência-alvo e uma região que faz parte de um mastro; e o segundo, de preferência de 5' a 3'; e um tracr (que contém um domínio complementar à região mastro do crRNA e um domínio que adicionalmente liga uma nuclease ou outra molécula efetora, por exemplo, uma molécula Cas, por exemplo, uma molécula Cas9), e pode ter o seguinte formato (de 5' para 3'):

[0250] Polinucleotídeo 1 (crRNA): [domínio-alvo] - [região de mastro de crRNA] - [primeira extensão de mastro opcional] - [segunda extensão opcional do mastro opcional]

[0251] Polinucleotídeo 2 (tracr): [primeira extensão de tracr opcional] - [região de mastro de tracr] - [domínio de ligação de nuclease de tracr]

[0252] Em modalidades, o domínio de ligação de nuclease de tracr se liga a uma proteína Cas, por exemplo, uma proteína Cas9.

[0253] Em alguns aspectos, o domínio-alvo compreende ou consiste em uma sequência de domínio-alvo aqui descrita, por exemplo, um domínio-alvo descrito na Tabela 1, ou um domínio-alvo compreendendo ou consistindo em 17, 18, 19 ou 20 (preferencialmente,

20) nucleotídeos consecutivos de uma sequência do domínio-alvo descrita na Tabela 1.

[0254] Em alguns aspectos, o mastro, por exemplo, a região mastro do crRNA, compreende de 5' a 3': GUUUUAGAGCUA (SEQ ID NO: 182).

[0255] Em alguns aspectos, o mastro, por exemplo, a região mastro do crRNA, compreende de 5' a 3': GUUUAAGAGCUA (SEQ ID NO: 183).

[0256] Em alguns aspectos, a alça compreende de 5' a 3': GAAA (SEQ ID NO: 186).

[0257] Em alguns aspectos, o tracr compreende de 5' a 3': UAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 187) e é preferencialmente utilizado em uma molécula de gRNA compreendendo a SEQ ID NO 182.

[0258] Em alguns aspectos, o tracr compreende de 5' a 3': UAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 188) e é preferencialmente utilizado em uma molécula de gRNA compreendendo a SEQ ID NO 183.

[0259] Em alguns aspectos, o gRNA pode também compreender, na extremidade 3', ácidos nucleicos U adicionais. Por exemplo, o gRNA pode compreender mais 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ácidos nucleicos U (SEQ ID NO: 249) na extremidade 3'. Em uma modalidade, o gRNA compreende um 4 ácidos nucleicos U adicionais extremidade 3'. No caso de dgRNA, um ou mais dos polinucleotídeos do dgRNA (por exemplo, o polinucleotídeo compreendendo o domínio-alvo e o polinucleotídeo compreendendo o tracr) pode compreender, na extremidade 3', ácidos nucleicos U adicionais. Por exemplo, o caso de dgRNA, um ou mais dos polinucleotídeos do dgRNA (por exemplo, o polinucleotídeo compreendendo o domínio-alvo e o polinucleotídeo que compreende o tracr) pode compreender um adicional de 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9 ou 10 ácidos nucleicos U (SEQ ID NO: 249) na extremidade 3'. Em uma modalidade, no caso de dgRNA, um ou mais dos polinucleotídeos do dgRNA (por exemplo, o polinucleotídeo compreendendo o domínio-alvo e o polinucleotídeo que compreende o tracr) compreendem um 4 ácidos nucleicos U adicionais na extremidade 3'. Em uma modalidade de um dgRNA, apenas o polinucleotídeo compreendendo o tracr compreende o(s) ácido(s) nucleico(s) U adicional(is), por exemplo, 4 ácidos nucleicos U. Em uma modalidade de um dgRNA, apenas o polinucleotídeo compreendendo o domínio-alvo compreende o(s) ácido(s) nucleico(s) U adicional(is). Em uma modalidade de um dgRNA, tanto o polinucleotídeo que compreende o domínio-alvo e o polinucleotídeo que compreende o tracr compreendem os ácidos nucleicos U adicionais, por exemplo, 4 ácidos nucleicos U.

[0260] Em alguns aspectos, o gRNA pode também compreender, na extremidade 3', ácidos nucleicos A adicionais. Por exemplo, o gRNA pode compreender mais 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 A ácidos nucleicos A (SEQ ID NO: 250) na extremidade 3'. Em uma modalidade, o gRNA compreende um adicional de 4 ácidos nucleicos A na extremidade 3'. No caso de dgRNA, um ou mais dos polinucleotídeos do dgRNA (por exemplo, o polinucleotídeo compreendendo o domínio-alvo e o polinucleotídeo compreendendo o tracr) podem compreender, na extremidade 3', ácidos nucleicos A adicionais. Por exemplo, o caso de dgRNA, um ou mais dos polinucleotídeos do dgRNA (por exemplo, o polinucleotídeo compreendendo o domínio-alvo e o polinucleotídeo que compreende o tracr) pode compreender um adicional de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 A ácidos nucleicos A (SEQ ID NO: 250) na extremidade 3'. Em uma modalidade, no caso de dgRNA, um ou mais dos polinucleotídeos do dgRNA (por exemplo, o polinucleotídeo compreendendo o domínio-alvo e o polinucleotídeo que compreende o tracr) compreendem um adicional de 4 ácidos nucleicos A na

extremidade 3'. Em uma modalidade de um dgRNA, apenas o polinucleotídeo compreendendo o tracr compreende o(s) ácido(s) nucleico(s) A adicional(is), por exemplo, 4 ácidos nucleicos A. Em uma modalidade de um dgRNA, apenas o polinucleotídeo compreendendo o domínio-alvo compreende o(s) ácido(s) nucleico(s) A adicional(is). Em uma modalidade de um dgRNA, tanto o polinucleotídeo que compreende o domínio-alvo e o polinucleotídeo que compreende o tracr compreendem os ácidos nucleicos U adicionais, por exemplo, 4 ácidos nucleicos A.

[0261] Em modalidades, um ou mais dos polinucleotídeos da molécula de gRNA pode compreender um cap na extremidade 5'.

[0262] Em uma modalidade, um unimolecular ou gRNA compreende, de preferência, de 5' a 3': um crRNA (que contém um domínio-alvo complementar a uma sequência-alvo; uma região de mastro de crRNA; primeira extensão de mastro; uma alça; uma primeira extensão de tracr (que contém um domínio complementar a, pelo menos, uma porção da primeira extensão de mastro) e um tracr (que contém um domínio complementar à região de mastro de crRNA, e um domínio que adicionalmente liga uma molécula Cas9). Em alguns aspectos, o domínio-alvo compreende ou consiste em uma sequência de domínio-alvo aqui descrita, por exemplo, um domínio-alvo descrito na Tabela 1, ou um domínio-alvo compreendendo ou consistindo em 17, 18, 19 ou 20 (preferencialmente 20) nucleotídeos consecutivos de uma sequência do domínio-alvo descrita na Tabela 1, por exemplo, 3' 17, 18, 19 ou 20 (preferencialmente, 20) nucleotídeos consecutivos de uma sequência do domínio-alvo descrita na Tabela 1.

[0263] Em aspectos que compreendem uma primeira extensão de mastro e/ou uma primeira extensão de tracr, as sequências de mastro, alça e tracr podem ser como descrito acima. Em geral, qualquer primeira extensão de mastro e primeira extensão de tracr podem ser

empregadas, desde que sejam complementares. Em modalidades, a primeira extensão de mastro e primeira extensão de tracr consistem em 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais nucleotídeos complementares.

[0264] Em alguns aspectos, a primeira extensão de mastro compreende de 5' a 3': UGCUG (SEQ ID NO: 184). Em alguns aspectos, a primeira extensão do mastro consiste em SEQ ID NO: 184.

[0265] Em alguns aspectos, a primeira extensão do tracr compreende de 5' a 3': CAGCA (SEQ ID NO: 189). Em alguns aspectos, a primeira extensão de tracr consiste em SEQ ID NO: 189.

[0266] Em uma modalidade, um dgRNA compreende duas moléculas de ácido nucleico. Em alguns aspectos, o dgRNA compreende um primeiro ácido nucleico que contém, preferencialmente de 5' a 3': um domínio-alvo complementar a uma sequência-alvo; uma região de mastro de crRNA; opcionalmente, uma primeira extensão de mastro; e, opcionalmente, uma segunda extensão de mastro; e um segundo ácido nucleico (que pode ser aqui referido como um tracr) e compreende, pelo menos, um domínio que se liga a uma molécula Cas, por exemplo, uma molécula Cas9) compreendendo preferencialmente de 5' a 3': opcionalmente uma primeira extensão de tracr; e um tracr (que contém um domínio complementar à região do mastro de crRNA e um domínio que liga adicionalmente uma molécula Cas, por exemplo, Cas9). O segundo ácido nucleico pode adicionalmente compreender, na extremidade 3' (por exemplo, 3' para o tracr), ácidos nucleicos U adicionais. Por exemplo, o tracr pode compreender mais 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 U ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 249) na extremidade 3' (por exemplo, 3' para o tracr). O segundo ácido nucleico pode compreender adicionalmente ou alternadamente, na extremidade 3' (por exemplo, 3' para o tracr), ácidos nucleicos A adicionais. Por exemplo, o tracr pode compreender mais 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 A ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 250) na extremidade 3' (por exemplo, 3' para o

tracr). Em alguns aspectos, o domínio-alvo compreende uma sequência de domínio-alvo aqui descrita, por exemplo, um domínio-alvo descrito na Tabela 1, ou um domínio-alvo compreendendo ou consistindo em 17, 18, 19 ou 20 (preferencialmente, 20) nucleotídeos consecutivos de uma sequência do domínio-alvo descrita na Tabela 1.

[0267] Em aspectos que envolvem um dgRNA, a região de mastro de crRNA, a primeira extensão de mastro opcional, a primeira extensão de tracr opcional e as sequências de tracr podem ser como descrito acima.

[0268] Em alguns aspectos, a segunda extensão do mastro opcional compreende de 5' a 3': UUUUG (SEQ ID NO: 185).

[0269] Em modalidades, os nucleotídeos 3' 1, 2, 3, 4 ou 5, os nucleotídeos 5' 1, 2, 3, 4 ou 5, ou ambos os nucleotídeos 3' e 5' 1, 2, 3, 4 ou 5 da molécula de gRNA (e no caso de uma molécula de dgRNA, o polinucleotídeo compreendendo o domínio-alvo e/ou o polinucleotídeo compreendendo o tracr) são ácidos nucleicos modificados, como descrito mais completamente na seção XIII, abaixo.

[0270] Os domínios são discutidos brevemente abaixo:

1) O domínio-alvo:

[0271] Orientações sobre a seleção de domínios-alvo podem ser encontradas, por exemplo, em Fu Y et al. NAT BIOTECHNOL 2014 (doi: 10.1038/nbt.2808) e Sternberg SH et al. NATURE 2014 (doi: 10.1038/nature13011).

[0272] O domínio-alvo compreende uma sequência nucleotídica que é complementar, por exemplo, pelo menos 80, 85, 90, 95, ou 99% complementar, por exemplo, totalmente complementar, com a sequência-alvo no ácido nucleico alvo. O domínio-alvo faz parte de uma molécula de RNA e compreende, portanto, o uracila de base (U), enquanto qualquer DNA que codifica a molécula de gRNA compreenderá a timina de base (T). Embora não pretendendo estar

limitado pela teoria, acredita-se que a complementaridade do domínio-alvo com a sequência-alvo contribui para a especificidade da interação do complexo de molécula de gRNA/molécula Cas9 com um ácido nucleico alvo. Entende-se que em um domínio-alvo e em um par de sequências-alvo, as bases de uracila no domínio-alvo emparelharão com as bases de adenina na sequência-alvo.

[0273] Em uma modalidade, o domínio-alvo é de 5 a 50, por exemplo, 10 a 40, por exemplo, 10 a 30, por exemplo, 15 a 30, por exemplo, 15 a 25 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, o domínio-alvo é 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, o domínio-alvo é de 16 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, o domínio-alvo é de 17 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, o domínio-alvo é de 18 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, o domínio-alvo é de 19 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, o domínio-alvo é de 20 nucleotídeos de comprimento. Em modalidades, os 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos acima mencionados compreendem os 5'- 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos de um domínio-alvo descrito na Tabela 1. Em modalidades, os 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos acima mencionados compreendem os 3'- 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos de um domínio-alvo descrito na Tabela 1.

[0274] Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que os 8, 9, 10, 11 ou 12 ácidos nucleicos do domínio-alvo dispostos na extremidade 3' do domínio-alvo são importantes para o direcionamento da sequência-alvo, e podem, assim, ser referidos como a região "central" do domínio-alvo. Em uma modalidade, o domínio central é totalmente complementar com a sequência-alvo.

[0275] A fita do ácido nucleico alvo com a qual o domínio-alvo é complementar é aqui referida como a sequência-alvo. Em alguns aspectos, a sequência-alvo está disposta em um cromossomo, por

exemplo, é um alvo dentro de um gene. Em alguns aspectos, a sequência-alvo é disposta dentro de um éxon de um gene. Em alguns aspectos, a sequência-alvo é disposta dentro de um íntron de um gene. Em alguns aspectos, a sequência-alvo compreende, ou é proximal (por exemplo, dentro de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ou 1000 ácidos nucleicos) a um sítio de ligação de um elemento regulador, por exemplo, um promotor ou sítio de ligação do fator de transcrição, de um gene de interesse. Alguns ou todos os nucleotídeos do domínio podem ter uma modificação, por exemplo, modificação encontrada aqui na Seção XIII.

2) Região de mastro de crRNA:

[0276] O mastro contém partes do crRNA e do tracr. A região de mastro de crRNA é complementar com uma porção do tracr e, em uma modalidade, tem complementaridade suficiente com uma porção do tracr para formar uma região de duplex sob, pelo menos, algumas condições fisiológicas, por exemplo, condições fisiológicas normais. Em uma modalidade, a região de mastro de crRNA tem 5 a 30 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, a região de mastro do crRNA tem 5 a 25 nucleotídeos de comprimento. A região de mastro de crRNA pode partilhar homologia com, ou ser derivada de, uma porção de ocorrência natural da sequência de repetição a partir de um arranjo de CRISPR bacteriano. Em uma modalidade, tem pelo menos 50% de homologia com uma região de mastro de crRNA aqui divulgada, por exemplo, uma região de mastro de crRNA de *S. pyogenes* ou *S. thermophilus*.

[0277] Em uma modalidade, o mastro, por exemplo, a região de mastro de crRNA, compreende a SEQ ID NO: 182. Em uma modalidade, o mastro, por exemplo, a região mastro de crRNA, compreende uma sequência com, pelo menos, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% de homologia com SEQ ID NO: 182. Em uma modalidade, o

mastro, por exemplo, a região mastro de crRNA, compreende, pelo menos, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 nucleotídeos de SEQ ID NO: 182. Em uma modalidade, o mastro, por exemplo, a região mastro de crRNA, compreende a SEQ ID NO: 183. Em uma modalidade, o mastro compreende uma sequência com, pelo menos, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% de homologia com SEQ ID NO: 183. Em uma modalidade, o mastro, por exemplo, a região mastro de crRNA, compreende, pelo menos, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 nucleotídeos de SEQ ID NO: 183.

[0278] Alguns ou todos os nucleotídeos do domínio podem ter uma modificação, por exemplo, modificação descrita aqui na Seção XIII.

3) Primeira extensão de mastro

[0279] Quando é utilizado um tracr compreendendo uma primeira extensão de tracr, o crRNA pode compreender uma primeira extensão de mastro. Em geral, qualquer primeira extensão de mastro e primeira extensão de tracr podem ser empregadas, desde que sejam complementares. Em modalidades, a primeira extensão de mastro e primeira extensão de tracr consistem em 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais nucleotídeos complementares.

[0280] A primeira extensão de mastro pode compreender nucleotídeos que são complementares, por exemplo, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99%, por exemplo, totalmente complementares, com nucleotídeos da primeira extensão de tracr. Em alguns aspectos, os primeiros nucleotídeos da extensão de mastro que hibridizam com nucleotídeos complementares da primeira extensão de tracr são contíguos. Em alguns aspectos, os primeiros nucleotídeos da extensão de mastro que hibridizam com nucleotídeos complementares da primeira extensão de tracr são descontínuos, por exemplo, compreendem duas ou mais regiões de hibridização separadas por nucleotídeos que não formam pares de bases com nucleotídeos da

primeira extensão de tracr. Em alguns aspectos, a primeira extensão de mastro compreende pelo menos, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais nucleotídeos. Em alguns aspectos, a primeira extensão de mastro compreende de 5' a 3': UGCUG (SEQ ID NO: 184). Em alguns aspectos, a primeira extensão do mastro consiste em SEQ ID NO: 184. Em alguns aspectos, a primeira extensão de mastro compreende ácido nucleico que tem, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% de homologia com a SEQ ID NO: 184.

[0281] Alguns ou todos os nucleotídeos da primeira extensão de tracr podem ter uma modificação, por exemplo, modificação encontrada aqui na Secção XIII.

3) A alça

[0282] Uma alça serve para ligar a região de mastro de crRNA (ou, opcionalmente, a primeira extensão de mastro, quando presente) com o tracr (ou opcionalmente a primeira extensão de tracr, quando presente) de um sgRNA. A alça pode ligar a região de mastro de crRNA e tracr covalentemente ou não covalentemente. Em uma modalidade, a ligação é covalente. Em uma modalidade, a alça covalentemente acopla a região de mastro de crRNA e tracr. Em uma modalidade, a alça covalentemente acopla a primeira extensão do mastro e a primeira extensão tracr. Em uma modalidade, a alça é, ou compreende, uma ligação covalente interposta entre a região de mastro crRNA e o domínio de tracr que hibridiza com a região de mastro de crRNA. Tipicamente, a alça compreende um ou mais, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 nucleotídeos.

[0283] Em moléculas de dgRNA, as duas moléculas podem ser associadas em virtude da hibridização entre, pelo menos, uma porção do crRNA (por exemplo, a região de mastro de crRNA) e, pelo menos, uma porção do tracr (por exemplo, o domínio do tracr que é complementar à região de mastro de crRNA).

[0284] Uma ampla variedade de alças é adequada para uso em sgRNAs. As alças podem consistir em uma ligação covalente, ou ser tão curtas quanto um ou alguns nucleotídeos, por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, uma alça tem 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, ou 25 ou mais nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, uma alça tem 2 a 50, 2 a 40, 2 a 30, 2 a 20, 2 a 10, ou de 2 a 5 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, uma alça compartilha homologia com, ou é derivada de, uma sequência de ocorrência natural. Em uma modalidade, a alça possui, pelo menos, 50% de homologia com uma alça aqui revelada. Em uma modalidade, a alça compreende a SEQ ID NO: 186.

[0285] Alguns ou todos os nucleotídeos do domínio podem ter uma modificação, por exemplo, modificação descrita aqui na Seção XIII.

4) A segunda extensão do mastro

[0286] Em uma modalidade, um dgRNA pode compreender uma sequência adicional, 3' relativamente à região de mastro de crRNA ou, quando presente, a primeira extensão de mastro, aqui referida como a segunda extensão de mastro. Em uma modalidade, a segunda extensão do mastro é de 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, ou 2-4 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, a segunda extensão do mastro é de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ou mais nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, a segunda extensão do mastro compreende a SEQ ID NO: 185.

5) O Tracr:

[0287] O tracr é a sequência de ácido nucleico necessária para a ligação da nuclease, por exemplo, Cas9. Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que cada espécie de Cas9 está associada a uma sequência tracr particular. As sequências de tracr são utilizadas nos sistemas sgRNA e dgRNA. Em uma modalidade, o tracr compreende uma sequência de, ou derivada de, um tracr de *S. pyogenes*. Em alguns

aspectos, o tracr tem uma porção que hibridiza com a porção de mastro, por exemplo, tem complementaridade suficiente à região de mastro de crRNA para formar uma região duplex sob, pelo menos, algumas condições fisiológicas (por vezes referido aqui como a região de mastro de tracr ou um domínio de tracr complementar à região de mastro de crRNA). Em modalidades, o domínio do tracr que hibridiza com a região mastro de crRNA compreende, pelo menos, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 nucleotídeos que hibridizam com nucleotídeos complementares da região mastro de crRNA. Em alguns aspectos, os nucleotídeos tracr que hibridizam com nucleotídeos complementares da região de mastro de crRNA são contíguos. Em alguns aspectos, os nucleotídeos tracr que hibridizam com nucleotídeos complementares da região de mastro de crRNA são descontínuos, por exemplo, compreendem duas ou mais regiões de hibridização separadas por nucleotídeos que não formam pares de bases com nucleotídeos da região de mastro de crRNA. Em alguns aspectos, a porção de tracr que hibridiza com a região mastro do crRNA, compreende de 5' a 3': UAGCAAGUUAAAA (SEQ ID NO: 191). Em alguns aspectos, a porção de tracr que hibridiza com a região mastro do crRNA, compreende de 5' a 3': UAGCAAGUUUAAA (SEQ ID NO: 192). Em modalidades, a sequência que hibridiza com a região mastro de crRNA está disposta em tracr 5'- para a sequência do tracr que liga adicionalmente uma nuclease, por exemplo, uma molécula Cas, por exemplo, uma molécula Cas9.

[0288] O tracr compreende ainda um domínio que adicionalmente se liga a uma nuclease, por exemplo, uma molécula Cas, por exemplo, uma molécula Cas9. Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que Cas9 de diferentes espécies se ligam a diferentes sequências tracr. Em alguns aspectos, o tracr compreende a sequência que se liga a uma molécula Cas9 de *S. pyogenes*. Em alguns aspectos, o tracr

compreende a sequência que se liga a uma molécula Cas9 aqui divulgada. Em alguns aspectos, o domínio que adicionalmente se liga a uma molécula Cas9 compreende de 5' a 3': UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGC (SEQ ID NO: 193). Em alguns aspectos, o domínio que adicionalmente se liga a uma molécula de Cas9 compreende de 5' a 3': UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUU (SEQ ID NO: 194).

[0289] Em algumas modalidades, o tracr compreende a SEQ ID NO: 187. Em algumas modalidades, o tracr compreende a SEQ ID NO: 188.

[0290] Alguns ou todos os nucleotídeos do tracr podem ter uma modificação, por exemplo, modificação encontrada aqui na Secção XIII. Em modalidades, o gRNA (por exemplo, o sgRNA ou o tracr e/ou crRNA de um dgRNA), por exemplo, qualquer um dos componentes gRNA ou gRNA descritos acima, compreende um resíduo abásico invertido na extremidade 5', na extremidade 3' ou em ambas as extremidades 5' e 3' do gRNA. Em modalidades, o gRNA (por exemplo, o sgRNA ou o tracr e/ou crRNA de um dgRNA), por exemplo, qualquer um dos componentes gRNA ou gRNA descritos acima, compreende uma ou mais ligações fosforotioato entre os resíduos na extremidade 5' do polinucleotídeo, por exemplo, uma ligação de fosforotioato entre os dois primeiros resíduos 5', entre cada um dos primeiros três resíduos 5', entre cada um dos primeiros quatro resíduos 5', ou entre cada um dos primeiros cinco resíduos 5'. Em modalidades, o componente gRNA ou gRNA pode alternativamente ou adicionalmente compreender uma ou mais ligações fosforotioato entre os resíduos na extremidade 3' do polinucleotídeo, por exemplo, uma ligação de fosforotioato entre os dois primeiros resíduos 3', entre cada um dos primeiros três resíduos 3', entre cada um dos primeiros quatro resíduos 3', ou entre cada um dos primeiros cinco resíduos 3'. Em uma modalidade, o gRNA (por exemplo,

o sgRNA ou o tracr e/ou crRNA de um dgRNA), por exemplo, qualquer um dos componentes gRNA ou gRNA descritos acima, compreende uma ligação fosforotioato entre cada um dos primeiros quatro resíduos 5' (por exemplo, compreende, por exemplo, consiste em três ligações fosforotioato na(s) extremidade(s) 5') e uma ligação fosforotioato entre cada um dos primeiros quatro resíduos 3' (por exemplo, compreende, por exemplo, consiste em três ligações fosforotioato nas extremidades 3'). Em uma modalidade, qualquer das modificações fosforotioato descritas acima são combinadas com um resíduo abásico invertido na extremidade 5', na extremidade 3', ou em ambas as extremidades 5' e 3' do polinucleotídeo. Em tais modalidades, o nucleotídeo abásico invertido pode ser ligado ao nucleotídeo em 5' e/ou 3' por uma ligação fosfato ou uma ligação fosforotioato. Em modalidades, o gRNA (por exemplo, o sgRNA ou o tracr e/ou crRNA de um dgRNA), por exemplo, qualquer um dos componentes gRNA ou gRNA descritos acima, compreende um ou mais nucleotídeos que incluem uma modificação 2' O-metila. Em modalidades, cada um dos primeiros 1, 2, 3, ou mais resíduos em 5' compreendem uma modificação 2' O-metila. Em modalidades, cada um dos primeiros 1, 2, 3, ou mais resíduos em 3' compreendem uma modificação 2' O-metila. Em modalidades, os resíduos 4º ao terminal, 3º ao terminal e 2º ao terminal em 3' compreendem uma modificação 2' O-metila. Em modalidades, cada um dos primeiros 1, 2, 3 ou mais dos resíduos em 5' compreende uma modificação 2' O-metila, e cada um dos primeiros 1, 2, 3 ou mais dos resíduos em 3' compreende uma modificação 2' O-metila. Em uma modalidade, cada um dos primeiros 3 resíduos em 5' compreende uma modificação 2' O-metila, e cada um dos 3 resíduos em 3' compreende uma modificação 2' O-metila. Em modalidades, cada um dos primeiros 3 resíduos em 5' compreende uma modificação 2' O-metila e os resíduos 4º ao terminal, 3º ao terminal e 2º ao terminal em 3'

compreendem uma modificação 2' O-metila. Em modalidades, qualquer uma das modificações 2' O-metila, por exemplo, como descrito acima, podem ser combinadas com uma ou mais modificações de fosforotioato, por exemplo, como descrito acima, e/ou um ou mais modificações abásicas invertidas, por exemplo, como acima descrito. Em uma modalidade, o gRNA (por exemplo, o sgRNA ou o tracr e/ou crRNA de um dgRNA), por exemplo, qualquer um dos componentes gRNA ou gRNA descritos acima, compreende, por exemplo, consiste em, uma ligação fosforotioato entre cada um dos primeiros quatro resíduos 5' (por exemplo, compreende, por exemplo, consiste em três ligações fosforotioato na(s) extremidade(s) 5' do(s) polinucleotídeo(s)) e uma ligação fosforotioato entre cada um dos primeiros quatro resíduos 3' (por exemplo, compreende, por exemplo, consiste em, três ligações fosforotioato nas extremidades 5' do(s) polinucleotídeo(s)), modificação 2' O-metila em cada um dos primeiros três resíduos em 5' e modificação 2' O-metila em cada um dos primeiros três resíduos em 3'. Em uma modalidade, o gRNA (por exemplo, o sgRNA ou o tracr e/ou crRNA de um dgRNA), por exemplo, qualquer um dos componentes gRNA ou gRNA descritos acima, compreende, por exemplo, consiste em, uma ligação fosforotioato entre cada um dos primeiros quatro resíduos 5' (por exemplo, compreende, por exemplo, consiste em três ligações fosforotioato na(s) extremidade(s) 5' do(s) polinucleotídeo(s)) e uma ligação fosforotioato entre cada um dos primeiros quatro resíduos 3' (por exemplo, compreende, por exemplo, consiste em, três ligações fosforotioato nas extremidades 5' do(s) polinucleotídeo(s)), uma modificação 2' O-metila em cada um dos primeiros três resíduos 5', e uma modificação 2' O-metila em cada um dos resíduos 4º ao terminal, 3º ao terminal e 2º ao terminal em 3'.

[0291] Em uma modalidade, o gRNA (por exemplo, o sgRNA ou o tracr e/ou crRNA de um dgRNA), por exemplo, qualquer um dos

componentes gRNA ou gRNA descritos acima, compreende, por exemplo, consiste em, uma ligação fosforotioato entre cada um dos primeiros quatro resíduos em 5' (por exemplo, compreende, por exemplo, consiste em três, ligações fosforotioato na(s) extremidade(s) 5' do(s) polinucleotídeo(s)) e uma ligação fosforotioato entre cada um dos primeiros quatro resíduos 3' (por exemplo, compreende, por exemplo, consiste em, três ligações fosforotioato nas extremidades 5' do(s) polinucleotídeo(s)), modificação 2' O-metila em cada um dos primeiros três resíduos em 5', modificação 2' O-metila em cada um dos primeiros três resíduos em 3' e um resíduo abásico invertido adicional em cada uma das extremidades 5' e 3'.

[0292] Em uma modalidade, o gRNA (por exemplo, o sgRNA ou o tracr e/ou crRNA de um dgRNA), por exemplo, qualquer um dos componentes gRNA ou gRNA descritos acima, compreende, por exemplo, consiste em, uma ligação fosforotioato entre cada um dos primeiros quatro resíduos 5' (por exemplo, compreende, por exemplo, consiste em três ligações fosforotioato na(s) extremidade(s) 5' do(s) polinucleotídeo(s)) e uma ligação fosforotioato entre cada um dos primeiros quatro resíduos 3' (por exemplo, compreende, por exemplo, consiste em, três ligações fosforotioato nas extremidades 5' do(s) polinucleotídeo(s)), uma modificação 2' O-metila em cada um dos primeiros três resíduos 5' modificação, e uma 2' O-metila em cada um dos resíduos 4º ao terminal, 3º ao terminal e 2º ao terminal em 3' e um resíduo abásico invertido adicional em cada uma das extremidades 5' e 3'.

[0293] Em uma modalidade, o gRNA é um dgRNA e compreende, por exemplo, consiste em:

crRNA:

mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAU*mG*mC
*mU (SEQ ID NO: 251), onde m indica uma base com modificação 2'-O-

metila, * indica uma ligação fosforotioato, e N's indicam os resíduos do domínio-alvo, por exemplo, como aqui descrito, (opcionalmente com um resíduo abásico invertido no terminal 5' e/ou 3'); e

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)
(opcionalmente com um resíduo abásico invertido no terminal 5' e/ou 3').

[0294] Em uma modalidade, o gRNA é um dgRNA e compreende, por exemplo, consiste em:

crRNA:

mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAU*mG*mC
*mU (SEQ ID NO: 251), onde m indica uma base com modificação 2'-O-
metila, * indica uma ligação fosforotioato, e N's indicam os resíduos do
domínio-alvo, por exemplo, como aqui descrito, (opcionalmente com um
resíduo abásico invertido no terminal 5' e/ou 3'); e

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 246), onde m indica uma base com modificação 2'-O-
metila, * indica uma ligação fosforotioato, e N's indicam os resíduos do
domínio-alvo, por exemplo, como aqui descrito, (opcionalmente com um
resíduo abásico invertido no terminal 5' e/ou 3').

[0295] Em uma modalidade, o gRNA é um dgRNA e compreende, por exemplo, consiste em:

crRNA:

mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 252), onde m indica uma base com
modificação 2'-O-metila, * indica uma ligação fosforotioato, e N's
indicam os resíduos do domínio-alvo, por exemplo, como aqui descrito,

(opcionalmente com um resíduo abásico invertido no terminal 5' e/ou 3');
e

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

(opcionalmente com um resíduo básico invertido no terminal 5' e/ou 3').

[0296] Em uma modalidade, o gRNA é um dgRNA e compreende, por exemplo, consiste em:

crRNA:

mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 252), onde m indica uma base com
modificação 2'-O-metila, * indica uma ligação fosforotioato, e N's
indicam os resíduos do domínio-alvo, por exemplo, como aqui descrito,
(opcionalmente com um resíduo abásico invertido no terminal 5' e/ou 3');

e

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 246),, onde m indica uma base com modificação 2'-O-
metila e * indica uma ligação fosforotioato (opcionalmente com um
resíduo abásico invertido no terminal 5' e/ou 3').

[0297] Em uma modalidade, o gRNA é um dgRNA e compreende, por exemplo, consiste em:

crRNA:

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
(SEQ ID NO: 253), onde N's indicam os resíduos do domínio-alvo, por
exemplo, como aqui descrito, (opcionalmente com um resíduo abásico
invertido no terminal 5' e/ou 3'); e

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA

ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU

(SEQ ID NO: 246),, onde m indica uma base com modificação 2'-O-metila e * indica uma ligação fosforotioato (opcionalmente com um resíduo abásico invertido no terminal 5' e/ou 3').

[0298] Em uma modalidade, o gRNA é um sgRNA e compreende, por exemplo, consiste em:

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 254), onde m indica uma base com

modificação 2'-O-metila, * indica uma ligação fosforotioato, e N's indicam os resíduos do domínio-alvo, por exemplo, como aqui descrito, (opcionalmente com um resíduo abásico invertido no terminal 5' e/ou 3').

[0299] Em uma modalidade, o gRNA é um sgRNA e compreende, por exemplo, consiste em:

mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAUA
GCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
CACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 255) , onde m

indica uma base com modificação 2'-O-metila, * indica uma ligação fosforotioato, e N's indicam os resíduos do domínio-alvo, por exemplo, como aqui descrito, (opcionalmente com um resíduo abásico invertido no terminal 5' e/ou 3').

[0300] Em uma modalidade, o gRNA é um sgRNA e compreende, por exemplo, consiste em:

mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAUA
GCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
CACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 256) , onde m

indica uma base com modificação 2'-O-metila, * indica uma ligação fosforotioato, e N's indicam os resíduos do domínio-alvo, por exemplo, como aqui descrito, (opcionalmente com um resíduo abásico invertido no terminal 5' e/ou 3').

6) Primeira extensão de Tracr

[0301] Quando o gRNA compreende uma primeira extensão de mastro, o tracr pode compreender uma primeira extensão tracr. A primeira extensão de tracr pode compreender nucleotídeos que são complementares, por exemplo, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99%, por exemplo, totalmente complementares, com nucleotídeos da primeira extensão de mastro. Em alguns aspectos, os primeiros nucleotídeos da extensão de tracr que hibridam com nucleotídeos complementares da primeira extensão mastro são contíguos. Em alguns aspectos, os primeiros nucleotídeos da extensão de tracr que hibridam com nucleotídeos complementares da primeira extensão de mastro são descontínuos, por exemplo, compreendem duas ou mais regiões de hibridação separadas por nucleotídeos que não formam pares de bases com nucleotídeos da primeira extensão mastro. Em alguns aspectos, a primeira extensão de tracr compreende pelo menos, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais nucleotídeos. Em alguns aspectos, a primeira extensão de tracr compreende a SEQ ID NO: 189. Em alguns aspectos, a primeira extensão de tracr compreende ácido nucleico que tem, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% de homologia com a SEQ ID NO: 189.

[0302] Alguns ou todos os nucleotídeos da primeira extensão de tracr podem ter uma modificação, por exemplo, modificação encontrada aqui na Secção XIII.

[0303] Em algumas modalidades, o sgRNA pode compreender, de 5' a 3', disposto em 3' ao domínio-alvo:

a)

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUU
AUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 195);

b)

GUUUAAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUU

AUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 196);

c)

GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGG
CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
(SEQ ID NO: 197);

d)

GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGG
CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
(SEQ ID NO: 198);

e) qualquer um de a) a d), acima, compreendendo adicionalmente, na extremidade 3', pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U), p.ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U);

f) qualquer um de a) a d), acima, compreendendo adicionalmente, na extremidade 3', pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A), p.ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A); ou

g) qualquer um de a) a f), acima, compreendendo adicionalmente, na extremidade 5' (p.ex., no terminal 5', por exemplo, 5' ao domínio-alvo), pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A), p.ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A). Em modalidades, qualquer de a) a g) acima é disposta diretamente em 3' do domínio-alvo.

[0304] Em uma modalidade, um sgRNA da invenção compreende, por exemplo, consiste em, de 5' a 3': [domínio-alvo]-GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 231).

[0305] Em uma modalidade, um sgRNA da invenção compreende, por exemplo, consiste em, de 5' a 3': [domínio-alvo]-GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 227).

[0306] Em algumas modalidades, o dgRNA pode compreender:

[0307] Um crRNA compreendendo, de 5' a 3', de preferência disposto diretamente em 3' para o domínio-alvo:

- a) GUUUUAGAGCUA (SEQ ID NO: 182);
- b) GUUUAAGAGCUA (SEQ ID NO: 183);
- c) GUUUUAGAGCUAUGCUG (SEQ ID NO: 199);
- d) GUUUAAGAGCUAUGCUG (SEQ ID NO: 200);
- e) GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 201);
- f) GUUUAAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 202); ou
- g) GUUUUAGAGCUAUGCU (SEQ ID NO: 226):

e um tracr compreendendo de 5' a 3':

a)
UAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU
GGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 187);

b)
UAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU
GGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 188);

c)
CAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA
AAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 203);

d)
CAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA
AAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 204);

e)
AACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224);

f)
AACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 225);

g)

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 232)

h)

GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAAUAAGG
CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU
UUU (SEQ ID NO: 227);

i)

AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA
AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU (SEQ ID NO: 228);

j)

GUUGGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU
(SEQ ID NO: 229);

k) qualquer um de a) a j), acima, compreendendo adicionalmente, na extremidade 3', pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U), p.ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U);

l) qualquer um de a) a j), acima, compreendendo adicionalmente, na extremidade 3', pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A), p.ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A); ou

m) qualquer um de a) a l), acima, compreendendo adicionalmente, na extremidade 5' (p.ex., no terminal 5'), pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A), p.ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A).

[0308] Em uma modalidade, a sequência de k), acima compreende a sequência UUUUUU em 3', por exemplo, se um promotor U6 é utilizado para a transcrição. Em uma modalidade, a sequência de k), acima compreende a sequência UUUU em 3', por exemplo, se um promotor HI é utilizado para a transcrição. Em uma modalidade, a sequência de k), acima, compreende números variáveis de U's em 3', dependendo, por exemplo, no sinal de terminação do promotor de pol-

III utilizado. Em uma modalidade, a sequência de k), acima, compreende a sequência variável em 3' derivada a partir do molde de DNA, se um promotor de T7 é usado. Em uma modalidade, a sequência de k), acima, compreende a sequência variável em 3' derivada a partir do molde de DNA, por exemplo, se a transcrição *in vitro* é utilizada para gerar a molécula de RNA. Em uma modalidade, a sequência de k), acima, compreende a sequência variável em 3' derivada a partir do molde de DNA, por exemplo, se um promotor pol-II for usado para dirigir a transcrição.

[0309] Em uma modalidade, o crRNA compreende, por exemplo, consiste em um domínio-alvo e, disposto em 3' em relação ao domínio-alvo (por exemplo, disposto diretamente em 3' em relação ao domínio-alvo), uma sequência compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 201, e o tracr compreende, por exemplo, consiste em AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0310] Em uma modalidade, o crRNA compreende, por exemplo, consiste em um domínio-alvo e, disposto em 3' em relação ao domínio-alvo (por exemplo, disposto diretamente em 3' em relação ao domínio-alvo), uma sequência compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 202, e o tracr compreende, por exemplo, consiste em AACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 225).

[0311] Em uma modalidade, o crRNA compreende, por exemplo, consiste em um domínio-alvo e, disposto em 3' em relação ao domínio-alvo (por exemplo, disposto diretamente em 3' em relação ao domínio-alvo), uma sequência compreendendo, por exemplo, consistindo em, GUUUUAGAGCUAUGCU (SEQ ID NO: 226, e o tracr compreende, por exemplo, consiste em GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGG

CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU
UUU (SEQ ID NO: 227).

[0312] Em uma modalidade, o crRNA compreende, por exemplo, consiste em um domínio-alvo e, disposto em 3' em relação ao domínio-alvo (por exemplo, disposto diretamente em 3' em relação ao domínio-alvo), uma sequência compreendendo, por exemplo, consistindo em, GUUUUAGAGCUAUGCU (SEQ ID NO: 226, e o tracr compreende, por exemplo, consiste em AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU (SEQ ID NO: 228).

[0313] Em uma modalidade, o crRNA compreende, por exemplo, consiste em um domínio-alvo e, disposto em 3' em relação ao domínio-alvo (por exemplo, disposto diretamente em 3' em relação ao domínio-alvo), uma sequência compreendendo, por exemplo, consistindo em, GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 201, e o tracr compreende, por exemplo, consiste em GUUGGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU (SEQ ID NO: 229).

II. Domínios-alvo de gRNA Direcionados para Regiões Não deleção de HPFH

[0314] Na tabela abaixo são fornecidos domínios-alvo direcionados para regiões de HPFH não deleção, moléculas de gRNA da presente invenção, e para uso nos vários aspectos da presente invenção, por exemplo, na alteração da expressão de genes de globina, por exemplo, um gene de hemoglobina fetal ou um gene de hemoglobina beta.

Tabela 1: Domínios-alvo de gRNA direcionados para regiões de HPFH não deleção. SEQ ID NO:s refere-se a sequência do domínio-alvo de gRNA.

ID do Domínio-alvo	Região Promotora Alvo	Sequência do domínio-alvo de gRNA	localização genômica (hg38) 1	Ca-deia	localização genômica (hg38) 2 (se presente)	Ca-deia	SEQ ID NO:
Domínios-alvo de gRNA com sequências-alvo apenas na região promotora de HBG1							
GCR-0001	HBG1	AGUCCUGGUAU CCUCUAUGA	chr11:525016 9-5250189	-			1
GCR-0002	HBG1	AAUUAGCAGUA UCCUCUUGG	chr11:525006 3-5250083	-			2
GCR-0003	HBG1	AGAAUAAAUUA GAGAAAAAC	chr11:525012 3-5250143	-			3
GCR-0004	HBG1	AAAAUUAGCA GUAUCCUCU	chr11:525006 6-5250086	-			4
GCR-0005	HBG1	AAAAUUAGCAG UAUCCUCUU	chr11:525006 5-5250085	-			5
GCR-0006	HBG1	AAAAACUGGAA UGACUGAAU	chr11:525010 9-5250129	-			6
GCR-0007	HBG1	CUCCCAUCAUA GAGGAUACC	chr11:525016 3-5250183	+			7
GCR-0008	HBG1	GGAGAAGGAAA CUAGCUAAA	chr11:525014 7-5250167	-			8
GCR-0009	HBG1	GUUUCUUCUC CCAUCAUAG	chr11:525015 5-5250175	+			9
GCR-0010	HBG1	GGGAGAAGGAA ACUAGCUAA	chr11:525014 8-5250168	-			10
GCR-0011	HBG1	CACUGGAGCUA GAGACAAGA	chr11:525021 3-5250233	-			11
GCR-0012	HBG1	AGAGACAAGAA GGUAAAAAA	chr11:525020 3-5250223	-			12
GCR-0013	HBG1	AAAUUAGCAGU AUCCUCUUG	chr11:525006 4-5250084	-			13
GCR-0014	HBG1	GUCCUGGUAUC CUCUAUGAU	chr11:525016 8-5250188	-			14
GCR-0015	HBG1	GUAUCCUCUAU GAUGGGAGA	chr11:525016 2-5250182	-			15
Domínios-alvo de gRNA com sequências-alvo apenas na região promotora de HBG2							
GCR-0017	HBG2	AUUAAGCAGCA GUAUCCUCU	chr11:525499 0-5255010	-			17
GCR-0022	HBG2	AGAAUAAAUUA GAGAAAAAU	chr11:525505 1-5255071	-			22
GCR-0029	HBG2	AGAAGUCCUGG UAUCUUCUA	chr11:525510 0-5255120	-			29
GCR-0032	HBG2	UUAAGCAGCAG UAUCCUCUU	chr11:525498 9-5255009	-			32

GCR-0034	HBG2	AAAAAUUGGAA UGACUGAAU	chr11:525503 7-5255057	-			34
GCR-0046	HBG2	GGGAGAAGAAA ACUAGCUAA	chr11:525507 6-5255096	-			46
GCR-0051	HBG2	GGAGAAGAAAA CUAGCUAAA	chr11:525507 5-5255095	-			51
GCR-0052	HBG2	CUCCCACCAUA GAAGAUACC	chr11:525509 1-5255111	+			52
GCR-0054	HBG2	AGUCCUGGUUAU CUUCUAUGG	chr11:525509 7-5255117	-			54
GCR-0058	HBG2	GUCCUGGUUAUC UUCUAUGGU	chr11:525509 6-5255116	-			58
GCR-0060	HBG2	UAAGCAGCAGU AUCCUCUUG	chr11:525498 8-5255008	-			60
GCR-0069	HBG2	AAGCAGCAGUA UCCUCUUGG	chr11:525498 7-5255007	-			69
gRNA com domínios-alvo dentro das regiões promotoras de HBG1 e HBG2							
GCR-0016	HBG1/HB G2	CCUAGCCAGCC GCCGGCCCC	chr11:524989 5-5249915	+	chr11:5254 819- 5254839	+	16
GCR-0018	HBG1/HB G2	UAUCCAGUGAG GCCAGGGGC	chr11:524991 0-5249930	-	chr11:5254 834- 5254854	-	18
GCR-0019	HBG1/HB G2	CAUUGAGAUAG UGUGGGGAA	chr11:525003 6-5250056	+	chr11:5254 960- 5254980	+	19
GCR-0020	HBG1/HB G2	CCAGUGAGGCC AGGGGCCCG	chr11:524990 7-5249927	-	chr11:5254 831- 5254851	-	20
GCR-0021	HBG1/HB G2	GUGGGGAAGG GGCCCCAAG	chr11:525004 8-5250068	+	chr11:5254 972- 5254992	+	21
GCR-0023	HBG1/HB G2	CCAGGGGCCGG CGGCUGGCU	chr11:524989 8-5249918	-	chr11:5254 822- 5254842	-	23
GCR-0024	HBG1/HB G2	UGAGGCCAGGG GCCGGCGGC	chr11:524990 3-5249923	-	chr11:5254 827- 5254847	-	24
GCR-0025	HBG1/HB G2	CAGUCCACAC ACUCGCUUC	chr11:524984 6-5249866	-	chr11:5254 770- 5254790	-	25
GCR-0026	HBG1/HB G2	CCGCCGGCCCC UGGCCUCAC	chr11:524990 4-5249924	+	chr11:5254 828- 5254848	+	26
GCR-0027	HBG1/HB G2	GUUUGCCUUGU CAAGGCUAU	chr11:524994 9-5249969	+	chr11:5254 873- 5254893	+	27

GCR-0028	HBG1/HB G2	GGCUAGGGAUG AAGAAUAAA	chr11:524988 2-5249902	-	chr11:5254 806- 5254826	-	28
GCR-0030	HBG1/HB G2	CAGGGGCCCGGC GGCUGGCUA	chr11:524989 7-5249917	-	chr11:5254 821- 5254841	-	30
GCR-0031	HBG1/HB G2	ACUGGAUACUC UAAGACUAU	chr11:524992 2-5249942	+	chr11:5254 846- 5254866	+	31
GCR-0033	HBG1/HB G2	CCCUGGCUAAA CUCCACCCA	chr11:524999 5-5250015	-	chr11:5254 919- 5254939	-	33
GCR-0035	HBG1/HB G2	UUAGAGUAUCC AGUGAGGCC	chr11:524991 6-5249936	-	chr11:5254 840- 5254860	-	35
GCR-0036	HBG1/HB G2	CCCAUGGGUGG AGUUUAGCC	chr11:524999 1-5250011	+	chr11:5254 915- 5254935	+	36
GCR-0037	HBG1/HB G2	AGGCAAGGCUG GCCAACCCA	chr11:524997 5-5249995	+	chr11:5254 899- 5254919	+	37
GCR-0038	HBG1/HB G2	UAGAGUAUCCA GUGAGGCCA	chr11:524991 5-5249935	-	chr11:5254 839- 5254859	-	38
GCR-0039	HBG1/HB G2	UAUCUGUCUGA AACGGUCCC	chr11:525001 2-5250032	-	chr11:5254 936- 5254956	-	39
GCR-0040	HBG1/HB G2	AUUGAGAUAGU GUGGGGAAG	chr11:525003 7-5250057	+	chr11:5254 961- 5254981	+	40
GCR-0041	HBG1/HB G2	CUUCAUCCCUA GCCAGCCGC	chr11:524988 8-5249908	+	chr11:5254 812- 5254832	+	41
GCR-0042	HBG1/HB G2	GCUAUUGGUCA AGGCAAGGC	chr11:524996 4-5249984	+	chr11:5254 888- 5254908	+	42
GCR-0043	HBG1/HB G2	AUGCAAAUAUC UGUCUGAAA	chr11:525001 9-5250039	-	chr11:5254 943- 5254963	-	43
GCR-0044	HBG1/HB G2	GCAUUGAGAU GUGUGGGGA	chr11:525003 5-5250055	+	chr11:5254 959- 5254979	+	44
GCR-0045	HBG1/HB G2	UGGUCAAGUUU GCCUUGUCA	chr11:524994 2-5249962	+	chr11:5254 866- 5254886	+	45
GCR-0047	HBG1/HB G2	GGCAAGGCUGG CCAACCAU	chr11:524997 6-5249996	+	chr11:5254 900- 5254920	+	47

GCR-0048	HBG1/HB G2	ACGGCUGACAA AAGAAGUCC	chr11:525018 4-5250204	-	chr11:5255 112- 5255132	-	48
GCR-0049	HBG1/HB G2	CGAGUGUGUGG AACUGCUGA	chr11:524985 0-5249870	+	chr11:5254 774- 5254794	+	49
GCR-0050	HBG1/HB G2	CCUGGCUAAAC UCCACCCA	chr11:524999 4-5250014	-	chr11:5254 918- 5254938	-	50
GCR-0053	HBG1/HB G2	CUUGUCAAGGC UAUUGGUCA	chr11:524995 5-5249975	+	chr11:5254 879- 5254899	+	53
GCR-0055	HBG1/HB G2	AUAUUUGCAUU GAGAUAGUG	chr11:525002 9-5250049	+	chr11:5254 953- 5254973	+	55
GCR-0056	HBG1/HB G2	GCUAAACUCCA CCCAUGGGU	chr11:524999 0-5250010	-	chr11:5254 914- 5254934	-	56
GCR-0057	HBG1/HB G2	ACGUUCCAGAA GCGAGUGUG	chr11:524983 8-5249858	+	chr11:5254 762- 5254782	+	57
GCR-0059	HBG1/HB G2	UAUUUGCAUUG AGAUAGUGU	chr11:525003 0-5250050	+	chr11:5254 954- 5254974	+	59
GCR-0061	HBG1/HB G2	GGAAUGACUGA AUCGGAACA	chr11:525010 2-5250122	-	chr11:5255 030- 5255050	-	61
GCR-0062	HBG1/HB G2	CUUGACCAUA GCCUUGACA	chr11:524995 7-5249977	-	chr11:5254 881- 5254901	-	62
GCR-0063	HBG1/HB G2	CAAGGCUAUUG GUCAAGGCA	chr11:524996 0-5249980	+	chr11:5254 884- 5254904	+	63
GCR-0064	HBG1/HB G2	AAGGCUGGCCA ACCCAUGGG	chr11:524997 9-5249999	+	chr11:5254 903- 5254923	+	64
GCR-0065	HBG1/HB G2	ACUCGCUUCUG GAACGUCUG	chr11:524983 5-5249855	-	chr11:5254 759- 5254779	-	65
GCR-0066	HBG1/HB G2	AUUUGCAUUGA GAUAGUGUG	chr11:525003 1-5250051	+	chr11:5254 955- 5254975	+	66
GCR-0067	HBG1/HB G2	ACUGAAUCGGA ACAAGGCAA	chr11:525009 6-5250116	-	chr11:5255 024- 5255044	-	67
GCR-0068	HBG1/HB G2	CCAUGGGUGGA GUUUAGCCA	chr11:524999 2-5250012	+	chr11:5254 916- 5254936	+	68

GCR-0070	HBG1/HB G2	AGAGUAUCCAG UGAGGCCAG	chr11:524991 4-5249934	-	chr11:5254 838- 5254858	-	70
GCR-0071	HBG1/HB G2	GAGUGUGUGGA ACUGCUGAA	chr11:524985 1-5249871	+	chr11:5254 775- 5254795	+	71
GCR-0072	HBG1/HB G2	UAGUCUUAGAG UAUCCAGUG	chr11:524992 1-5249941	-	chr11:5254 845- 5254865	-	72

[0315] A Tabela 2, abaixo, mostra aqueles domínios-alvo que, quando incluídos em uma molécula de gRNA, resultam em pelo menos 17% de aumento na hemoglobina fetal (por exemplo, em células eritroides diferenciadas de HSPCs modificadas) em 7 dias de acordo com os métodos descritos no Exemplos. As moléculas de gRNA compreendendo qualquer destes domínios-alvo são colectivamente referidas aqui como moléculas de gRNA de Nível 2.

Tabela 2 - Domínios-alvo para moléculas de gRNA de Nível 2

ID do Domínio-alvo
GCR-0001
GCR-0006
GCR-0008
GCR-0009
GCR-0010
GCR-0011
GCR-0012
GCR-0028
GCR-0034
GCR-0045
GCR-0046
GCR-0047
GCR-0048
GCR-0050
GCR-0051

GCR-0053
GCR-0054
GCR-0058
GCR-0062
GCR-0063
GCR-0067

[0316] A Tabela 3a e Tabela 3b, abaixo, mostram aqueles domínios-alvo que, quando incluídos em uma molécula de gRNA, resultam no maior aumento na hemoglobina fetal (por exemplo, em células eritroides diferenciadas de HSPCs modificadas) em 7 dias de acordo com os métodos descritos no Exemplos. As moléculas de gRNA compreendendo estes domínios-alvo são colectivamente referidas aqui como moléculas de gRNA de Nível 1 (por exemplo, Nível 1a ou Nível 1b).

Tabela 3a - Domínios-alvo para moléculas de gRNA de Nível 1a

ID do Domínio-alvo
GCR-0006
GCR-0008
GCR-0028
GCR-0034
GCR-0048
GCR-0067

Tabela 3b. - Domínios-alvo para moléculas de gRNA de Nível 1b

ID do Domínio-alvo
GCR-0001
GCR-0008
GCR-0009
GCR-0010
GCR-0012
GCR-0054

III. Métodos para criar gRNAs

[0317] Métodos para criar os gRNAs são aqui descritos, incluindo métodos para selecionar, criar e validar sequências-alvo. Domínios-alvo exemplificativos também são aqui fornecidos. Domínios-alvo aqui discutidos podem ser incorporados nos gRNAs aqui descritos.

[0318] Métodos para seleção e validação de sequências-alvo, bem como análises fora do alvo são descritos, por exemplo, em Mali et al. , 2013 SCIENCE 339(6121): 823-826; Hsu et al, 2013 NAT BIOTECHNOL, 31 (9): 827-32; Fu et al, 2014 NAT BIOTECHNOL, doi: 10.1038/nbt.2808. PubMed PM ID: 24463574; Heigwer et al, 2014 NAT METHODS II (2): 122-3. doi: 10.1038/nmeth.2812. PubMed PMID: 24481216; Bae et al, 2014 BIOINFORMATICS PubMed PMID: 24463181; Xiao A et al, 2014 BIOINFORMATICS PubMed PMID: 24389662.

[0319] Por exemplo, uma ferramenta de software pode ser usada para otimizar a escolha do gRNA dentro da sequência-alvo de um usuário, por exemplo, para minimizar a atividade total fora do alvo em todo o genoma. A atividade fora do alvo pode ser diferente da clivagem. Para cada possível escolha de gRNA, por exemplo, usando Cas9 de *S. pyogenes*, a ferramenta pode identificar todas as sequências fora do alvo (por exemplo, precedendo NAG ou NGG PAMs) em todo o genoma que contém até certo número (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10) de pares de bases desemparelhados. A eficiência de clivagem em cada sequência fora do alvo pode ser prevista, por exemplo, utilizando um esquema de ponderação derivado experimentalmente. Cada gRNA possível é então classificado de acordo com a sua clivagem fora do alvo total prevista; os gRNAs mais bem classificados representam aqueles que provavelmente terão a maior clivagem no alvo e a menos fora do alvo. Outras funções, por exemplo, criação de reagente automatizado para construção de CRISPR, criação de iniciadores para o ensaio

Surveyor no alvo e criação de iniciadores para detecção de elevado rendimento e quantificação de clivagem fora do alvo via sequenciamento next-gen, também podem ser incluídas na ferramenta. As moléculas de gRNA candidatas podem ser avaliadas por métodos conhecidos na técnica ou como aqui descrito.

[0320] Embora os algoritmos de software possam ser usados para gerar uma lista inicial de potenciais moléculas de gRNA, a eficiência e especificidade de corte não refletirão necessariamente os valores previstos, e as moléculas de gRNA normalmente requerem triagem em linhas celulares específicas, por exemplo, linhas celulares humanas primárias, por exemplo, HSPCs humanas, por exemplo, células CD34+ humanas, para determinar, por exemplo, eficiência de corte, formação de indel, especificidade de corte e alteração no fenótipo desejado. Estas propriedades podem ser testadas pelos métodos aqui descritos.

[0321] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0001 (SEQ ID NO: 1, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0001 #1:

AGUCCUGGUAUCCUCUAUGAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
 UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
 GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 74)

sgRNA GCR-0001 #2:

mA*mG*mU*CCUGGUAUCCUCUAUGAGUUUUAGAGCUAGAAUA
 GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
 CACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 75)

sgRNA GCR-0001 #3:

mA*mG*mU*CCUGGUAUCCUCUAUGAGUUUUAGAGCUAGAAUA

GCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
CACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 76)

dgRNA GCR-0001 #1:

crRNA:

AGUCCUGGUAUCCUCUAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
(SEQ ID NO: 77)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0001 #2:

crRNA:

mA*mG*mU*CCUGGUAUCCUCUAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 78)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0001 #3:

crRNA:

mA*mG*mU*CCUGGUAUCCUCUAUGAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 78)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0322] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um
"*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes,
e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em
2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui
descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma
molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um

complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0323] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0006 (SEQ ID NO: 6, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0006 #1:

AAAAACUGGAAUGACUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
 UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
 GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 79)

sgRNA GCR-0006 #2:

mA*mA*mA*AACUGGAAUGACUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 80)

sgRNA GCR-0006 #3:

mA*mA*mA*AACUGGAAUGACUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 81)

dgRNA GCR-0006 #1:

crRNA:

AAAAACUGGAAUGACUGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
 (SEQ ID NO: 82)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
 AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0006 #2:

crRNA:

mA*mA*mA*AACUGGAAUGACUGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUU

*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 83)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA

ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU

(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0006 #3:

crRNA:

mA*mA*mA*AACUGGAAUGACUGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUU

*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 83)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG

AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0324] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0325] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0008 (SEQ ID NO: 8, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0008 #1:

GGAGAAGGAAACUAGCUAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU

UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 84)

sgRNA GCR-0008 #2:

mG*mG*mA*GAAGGAAACUAGCUAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 85)

sgRNA GCR-0008 #3:

mG*mG*mA*GAAGGAAACUAGCUAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 86)

dgRNA GCR-0008 #1:

crRNA:

GGAGAAGGAAACUAGCUAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
(SEQ ID NO: 87)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0008 #2:

crRNA:

mG*mG*mA*GAAGGAAACUAGCUAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 88)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0008 #3:

crRNA:

mG*mG*mA*GAAGGAAACUAGCUAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 88)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0326] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0327] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-009 (SEQ ID NO: 9, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0009 #1:

GUUUCUUCUCCCAUCAUAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 89)

sgRNA GCR-0009 #2:

mG*mU*mU*UCCUUCUCCCAUCAUAGGUUUUAGAGCUAGAAUA
GCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
CACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 90)

sgRNA GCR-0009 #3:

mG*mU*mU*UCCUUCUCCCAUCAUAGGUUUUAGAGCUAGAAUA
GCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
CACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 91)

dgRNA GCR-0009 #1:

crRNA:

GUUUCUUCUCCCAUCAUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG

(SEQ ID NO: 92)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG

AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0009 #2:

crRNA:

mG*mU*mU*UCCUUCUCCCAUCAUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGU

U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 93)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA

ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU

(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0009 #3:

crRNA:

mG*mU*mU*UCCUUCUCCCAUCAUAGGUUUUAGAGCUAUGCUGU

U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 93)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG

AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0328] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0329] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0010 (SEQ ID NO: 10, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0010 #1:

GGGAGAAGGAAACUAGCUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 94)

sgRNA GCR-0010 #2:

mG*mG*mG*AGAAGGAAACUAGCUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 95)

sgRNA GCR-0010 #3:

mG*mG*mG*AGAAGGAAACUAGCUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 96)

dgRNA GCR-0010 #1:

crRNA:

GGGAGAAGGAAACUAGCUAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
(SEQ ID NO: 97)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0010 #2:

crRNA:

mG*mG*mG*AGAAGGAAACUAGCUAAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 98)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU

(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0010 #3:

crRNA:

mG*mG*mG*AGAAGGAAACUAGCUAAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 98)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0330] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um
"" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes,
e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em
2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui
descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma
molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um
complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são
particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e
modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0331] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o
domínio-alvo de GCR-0011 (SEQ ID NO: 11, sequência não modificada
sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas
abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos
e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais
de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0011 #1:

CACUGGAGCUAGAGACAAGAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 99)

sgRNA GCR-0011 #2:

mC*mA*mC*UGGAGCUAGAGACAAGAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 100)

sgRNA GCR-0011 #3:

mC*mA*mC*UGGAGCUAGAGACAAGAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 101)

dgRNA GCR-0011 #1:

crRNA:

CACUGGAGCUAGAGACAAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
 (SEQ ID NO: 102)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
 AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0011 #2:

crRNA:

mC*mA*mC*UGGAGCUAGAGACAAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
 U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 103)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
 ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
 (SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0011 #3:

crRNA:

mC*mA*mC*UGGAGCUAGAGACAAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
 U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 103)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
 AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0332] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um

"*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0333] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0012 (SEQ ID NO: 12, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0012 #1:

AGAGACAAGAAGGUAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
 UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
 GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 104)

sgRNA GCR-0012 #2:

mA*mG*mA*GACAAGAAGGUAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 105)

sgRNA GCR-0012 #3:

mA*mG*mA*GACAAGAAGGUAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 106)

dgRNA GCR-0012 #1:

crRNA:

AGAGACAAGAAGGUAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
 (SEQ ID NO: 107)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0012 #2:

crRNA:

mA*mG*mA*GACAAGAAGGUAAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUU
*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 108)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0012 #3:

crRNA:

mA*mG*mA*GACAAGAAGGUAAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUU
*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 108)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0334] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0335] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0028 (SEQ ID NO: 28, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas

abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0028 #1:

GGCUAGGGAUGAAGAAUAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 109)

sgRNA GCR-0028 #2:

mG*mG*mC*UAGGGAUGAAGAAUAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 110)

sgRNA GCR-0028 #3:

mG*mG*mC*UAGGGAUGAAGAAUAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 111)

dgRNA GCR-0028 #1:

crRNA:

GGCUAGGGAUGAAGAAUAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
(SEQ ID NO: 112)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0028 #2:

crRNA:

mG*mG*mC*UAGGGAUGAAGAAUAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 113)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0028 #3:

crRNA:

mG*mG*mC*UAGGGAUGAAGAAUAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 113)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0336] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0337] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0034 (SEQ ID NO: 34, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0034 #1:

AAAAAUUGGAAUGACUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 114)

sgRNA GCR-0034 #2:

mA*mA*mA*AAUUGGAAUGACUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 115)

sgRNA GCR-0034 #3:

mA*mA*mA*AAUUGGAAUGACUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 116)

dgRNA GCR-0034 #1:

crRNA:

AAAAAUUGGAAUGACUGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
 (SEQ ID NO: 117)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
 AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0034 #2:

crRNA:

mA*mA*mA*AAUUGGAAUGACUGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUU
 *mU*mU*mG (SEQ ID NO: 118)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
 ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
 (SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0034 #3:

crRNA:

mA*mA*mA*AAUUGGAAUGACUGAAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUU
 *mU*mU*mG (SEQ ID NO: 118)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
 AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0338] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui

descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0339] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0045 (SEQ ID NO: 45, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0045 #1:

UGGUCAAGUUUGCCUUGUCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG
 UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG
 AGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 119)

sgRNA GCR-0045 #2:

mU*mG*mG*UCAAGUUUGCCUUGUCAGUUUUAGAGCUAGAAUA
 GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
 CACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 120)

sgRNA GCR-0045 #3:

mU*mG*mG*UCAAGUUUGCCUUGUCAGUUUUAGAGCUAGAAUA
 GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
 CACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 121)

dgRNA GCR-0045 #1:

crRNA:

UGGUCAAGUUUGCCUUGUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
 (SEQ ID NO: 122)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
 AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0045 #2:

crRNA:

mU*mG*mG*UCAAGUUUGCCUUGUCAGUUUUUAGAGCUAUGCUGU
 U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 123)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
 ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
 (SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0045 #3:

crRNA:

mU*mG*mG*UCAAGUUUGCCUUGUCAGUUUUUAGAGCUAUGCUGU
 U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 123)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
 AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0340] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0341] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0046 (SEQ ID NO: 46, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0046 #1:

GGGAGAAGAAAACUAGCUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 124)

sgRNA GCR-0046 #2:

mG*mG*mG*AGAAGAAAACUAGCUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 125)

sgRNA GCR-0046 #3:

mG*mG*mG*AGAAGAAAACUAGCUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 126)

dgRNA GCR-0046 #1:

crRNA:

GGGAGAAGAAAACUAGCUAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
(SEQ ID NO: 127)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0046 #2:

crRNA:

mG*mG*mG*AGAAGAAAACUAGCUAAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 128)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0046 #3:

crRNA:

mG*mG*mG*AGAAGAAAACUAGCUAAGUUUUAGAGCUAUGCUGU

U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 128)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0342] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0343] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0047 (SEQ ID NO: 47, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0047 #1:

GGCAAGGCUGGCCAACCCAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG
UUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG
AGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 129)

sgRNA GCR-0047 #2:

mG*mG*mC*AAGGCUGGCCAACCCAUGUUUUAGAGCUAGAAUA
GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
CACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 130)

sgRNA GCR-0047 #3:

mG*mG*mC*AAGGCUGGCCAACCCAUGUUUUAGAGCUAGAAUA
GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG

CACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 131)

dgRNA GCR-0047 #1:

crRNA:

GGCAAGGCUGGCCAACCCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
(SEQ ID NO: 132)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0047 #2:

crRNA:

mG*mG*mC*AAGGCUGGCCAACCCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 133)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0047 #3:

crRNA:

mG*mG*mC*AAGGCUGGCCAACCCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 133)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0344] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são

particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0345] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0048 (SEQ ID NO: 48, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0048 #1:

ACGGCUGACAAAAGAAGUCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
 UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
 GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 134)

sgRNA GCR-0048 #2:

mA*mC*mG*GCUGACAAAAGAAGUCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 135)

sgRNA GCR-0048 #3:

mA*mC*mG*GCUGACAAAAGAAGUCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 136)

dgRNA GCR-0048 #1:

crRNA:

ACGGCUGACAAAAGAAGUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
 (SEQ ID NO: 137)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
 AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0048 #2:

crRNA:

mA*mC*mG*GCUGACAAAAGAAGUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGU

U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 138)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0048 #3:

crRNA:

mA*mC*mG*GCUGACAAAAGAAGUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 138)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0346] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0347] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0050 (SEQ ID NO: 50, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0050 #1:

CCUGGCUAAACUCCACCCAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA

GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 139)

sgRNA GCR-0050 #2:

mC*mC*mU*GGCUAAACUCCACCCAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 140)

sgRNA GCR-0050 #3:

mC*mC*mU*GGCUAAACUCCACCCAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 141)

dgRNA GCR-0050 #1:

crRNA:

CCUGGCUAAACUCCACCCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
(SEQ ID NO: 142)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0050 #2:

crRNA:

mC*mC*mU*GGCUAAACUCCACCCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 143)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0050 #3:

crRNA:

mC*mC*mU*GGCUAAACUCCACCCAUGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 143)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG

AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0348] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0349] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0051 (SEQ ID NO: 51, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0051 #1:

GGAGAAGAAAACUAGCUAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
 UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
 GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 144)

sgRNA GCR-0051 #2:

mG*mG*mA*GAAGAAAACUAGCUAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 145)

sgRNA GCR-0051 #3:

mG*mG*mA*GAAGAAAACUAGCUAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 146)

dgRNA GCR-0051 #1:

crRNA:

GGAGAAGAAAACUAGCUAAAGUUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG

(SEQ ID NO: 147)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG

AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0051 #2:

crRNA:

mG*mG*mA*GAAGAAAACUAGCUAAAGUUUUUAGAGCUAUGCUGUU

*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 148)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA

ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU

(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0051 #3:

crRNA:

mG*mG*mA*GAAGAAAACUAGCUAAAGUUUUUAGAGCUAUGCUGUU

*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 148)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG

AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0350] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0351] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o

domínio-alvo de GCR-0053 (SEQ ID NO: 53, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0053 #1:

CUUGUCAAGGCUAUUGGUCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG
 UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG
 AGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 149)

sgRNA GCR-0053 #2:

mC*mU*mU*GUCAAGGCUAUUGGUCAGUUUUAGAGCUAGAAAUA
 GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
 CACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 150)

sgRNA GCR-0053 #3:

mC*mU*mU*GUCAAGGCUAUUGGUCAGUUUUAGAGCUAGAAAUA
 GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
 CACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 151)

dgRNA GCR-0053 #1:

crRNA:

CUUGUCAAGGCUAUUGGUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
 (SEQ ID NO: 152)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
 AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0053 #2:

crRNA:

mC*mU*mU*GUCAAGGCUAUUGGUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
 U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 153)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA

ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU

(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0053 #3:

crRNA:

mC*mU*mU*GUCAAGGCUAUUGGUCAGUUUUAGAGCUAUGCUGU

U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 153)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAUUAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0352] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0353] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0054 (SEQ ID NO: 54, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0054 #1:

AGUCCUGGUAUCUUCUAUGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG
UUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG
AGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 154)

sgRNA GCR-0054 #2:

mA*mG*mU*CCUGGUAUCUUCUAUGGGUUUUAGAGCUAGAAUA

GCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
CACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 155)

sgRNA GCR-0054 #3:

mA*mG*mU*CCUGGUAUCUUCUAUGGGUUUUUAGAGCUAGAAUA
GCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
CACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 156)

dgRNA GCR-0054 #1:

crRNA:

AGUCCUGGUAUCUUCUAUGGGUUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
(SEQ ID NO: 157)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0054 #2:

crRNA:

mA*mG*mU*CCUGGUAUCUUCUAUGGGUUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 158)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0054 #3:

crRNA:

mA*mG*mU*CCUGGUAUCUUCUAUGGGUUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 158)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0354] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um
"*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes,

e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0355] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0058 (SEQ ID NO: 58, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0058 #1:

GUCCUGGUAUCUUCUAUGGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG
 UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG
 AGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 159)

sgRNA GCR-0058 #2:

mG*mU*mC*CUGGUAUCUUCUAUGGUGUUUUAGAGCUAGAAUA
 GCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
 CACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 160)

sgRNA GCR-0058 #3:

mG*mU*mC*CUGGUAUCUUCUAUGGUGUUUUAGAGCUAGAAUA
 GCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
 CACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 161)

dgRNA GCR-0058 #1:

crRNA:

GUCCUGGUAUCUUCUAUGGUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
 (SEQ ID NO: 162)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0058 #2:

crRNA:

mG*mU*mC*CUGGUAUCUUCUAUGGUGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 163)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0058 #3:

crRNA:

mG*mU*mC*CUGGUAUCUUCUAUGGUGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 163)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0356] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0357] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0062 (SEQ ID NO: 62, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos

e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0062 #1:

CUUGACCAAUAGCCUUGACAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
 UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
 GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 164)

sgRNA GCR-0062 #2:

mC*mU*mU*GACCAAUAGCCUUGACAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 165)

sgRNA GCR-0062 #3:

mC*mU*mU*GACCAAUAGCCUUGACAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
 CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
 ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 166)

dgRNA GCR-0062 #1:

crRNA:

CUUGACCAAUAGCCUUGACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
 (SEQ ID NO: 167)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
 AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0062 #2:

crRNA:

mC*mU*mU*GACCAAUAGCCUUGACAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
 U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 168)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
 ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
 (SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0062 #3:

crRNA:

mC*mU*mU*GACCAUAGCCUUGACAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 168)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0358] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0359] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0063 (SEQ ID NO: 63, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0063 #1:

CAAGGCUAUUGGUCAAGGCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 169)

sgRNA GCR-0063 #2:

mC*mA*mA*GGCUAUUGGUCAAGGCAGUUUUAGAGCUAGAAAUA
GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
CACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 170)

sgRNA GCR-0063 #3:

mC*mA*mA*GGCUAUUGGUCAAGGCAGUUUUAGAGCUAGAAAUA
 GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
 CACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 171)

dgRNA GCR-0063 #1:

crRNA:

CAAGGCUAUUGGUCAAGGCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
 (SEQ ID NO: 172)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
 AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0063 #2:

crRNA:

mC*mA*mA*GGCUAUUGGUCAAGGCAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
 U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 173)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
 ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
 (SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0063 #3:

crRNA:

mC*mA*mA*GGCUAUUGGUCAAGGCAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
 U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 173)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
 AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0360] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um
 "*" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes,
 e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em
 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui
 descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma

molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

[0361] Em aspectos da invenção, um gRNA compreendendo o domínio-alvo de GCR-0067 (SEQ ID NO: 67, sequência não modificada sublinhada abaixo), por exemplo, uma das moléculas de gRNA descritas abaixo, é útil nos sistemas CRISPR, métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, incluindo em aspectos que envolvem mais de uma molécula de gRNA, por exemplo, aqui descritas:

sgRNA GCR-0067 #1:

ACUGAAUCGGAACAAGGCAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU
UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA
GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 174)

sgRNA GCR-0067 #2:

mA*mC*mU*GAAUCGGAACAAGGCAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 175)

sgRNA GCR-0067 #3:

mA*mC*mU*GAAUCGGAACAAGGCAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG
CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U (SEQ ID NO: 176)

dgRNA GCR-0067 #1:

crRNA:

ACUGAAUCGGAACAAGGCAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
(SEQ ID NO: 177)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224)

dgRNA GCR-0067 #2:

crRNA:

mA*mC*mU*GAAUCGGAACAAGGCAAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 178)

tracr:

mA*mA*mC*AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA
ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*mU*mU*mU
(SEQ ID NO: 73)

dgRNA GCR-0067 #3:

crRNA:

mA*mC*mU*GAAUCGGAACAAGGCAAGUUUUAGAGCUAUGCUGU
U*mU*mU*mG (SEQ ID NO: 178)

tracr:

AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG
AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU (SEQ ID NO: 224).

[0362] Em cada uma das moléculas de gRNA descritas acima, um "" denota uma ligação fosforotioato entre os nucleotídeos adjacentes, e "mN" (onde N = A, G, C ou U) denota um nucleotídeo modificado em 2'-OMe. Em modalidades, qualquer uma das moléculas de gRNA aqui descritas, por exemplo, descritas acima, é complexada com uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, para formar um complexo de proteína ribonuclear (RNP). Tais RNPs são particularmente úteis nos métodos, células e outros aspectos e modalidades da invenção, por exemplo, aqui descritos.

IV. Moléculas Cas

Moléculas Cas9

[0363] Em modalidades preferidas, a molécula Cas é uma molécula Cas9. As moléculas Cas9 de uma variedade de espécies podem ser utilizadas nos métodos e composições aqui descritos. Embora a molécula Cas9 de *S. pyogenes* seja objecto de muitas das divulgações aqui apresentadas, também podem ser utilizadas moléculas Cas9 de,

derivadas de ou baseadas nas proteínas Cas9 de outras espécies aqui listadas. Por outras palavras, outras moléculas Cas9, por exemplo, moléculas Cas9 de *S. thermophilus*, *Staphylococcus aureus* e/ou *Neisseria meningitidis*, podem ser utilizadas nos sistemas, métodos e composições aqui descritos. Espécies adicionais de Cas9 incluem: *Acidovorax avenae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus suis*, *Actinomyces* sp., *cycliphilus denitrificans*, *Aminomonas paucivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacteroides* sp., *Blastopirellula marina*, *Bradyrhizobium* sp., *Brevibacillus latensporus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lad*, *Candidatus Puniceispirillum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium diphtheria*, *Corynebacterium matruchotii*, *Dinoroseobacter sliibae*, *Eubacterium dolichum*, *gamma proteobacterium*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus sputorum*, *Helicobacter canadensis*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter mustelae*, *Ilyobacter polytropus*, *Kingella kingae*, *Lactobacillus crispatus*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeriaceae bacterium*, *Methylocystis* sp., *Methylosinus trichosporium*, *Mobiluncus mulieris*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria* sp., *Neisseria wadsworthii*, *Nitrosomonas* sp., *Parvibaculum lavamentivorans*, *Pasteurella multocida*, *Phascolarctobacterium succinatutens*, *Ralstonia syzygii*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodovulum* sp., *Simonsiella muelleri*, *Sphingomonas* sp., *Sporolactobacillus vineae*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus* sp., *Subdoligranulum* sp., *Tislerella mobilis*, *Treponema* sp., ou *Verminephrobacter eiseniae*.

[0364] Uma molécula Cas9, como o termo é usado aqui, refere-se a uma molécula que pode interagir com uma molécula de gRNA (por

exemplo, sequência de um domínio de um tracr) e, em conjunto com a molécula de gRNA, localizar (por exemplo, alvo ou casa) para um sítio que compreende uma sequência-alvo e uma sequência PAM.

[0365] Em uma modalidade, a molécula cas9 é capaz de clivar uma molécula de ácido nucleico alvo, que pode ser aqui referida como uma molécula Cas9 ativa. Em uma modalidade, uma molécula Cas9 ativa, compreende uma ou mais das seguintes atividades: atividade de *nickase*, isto é, a capacidade para clivar uma cadeia simples, por exemplo, a cadeia não complementar ou a cadeia complementar de uma molécula de ácido nucleico; uma atividade de nuclease de cadeia dupla, ou seja, a capacidade de clivar ambas as cadeias de um ácido nucleico de cadeia dupla e criar uma quebra de cadeia dupla, que em uma modalidade é a presença de duas atividades da *nickase*; uma atividade de endonuclease; uma atividade de exonuclease; e uma atividade de helicase, ou seja, a capacidade para desenrolar a estrutura helicoidal de um ácido nucleico de cadeia dupla.

[0366] Em uma modalidade, uma molécula Cas9 enzimaticamente ativa cliva ambas as cadeias de DNA e resulta em uma quebra de cadeia dupla. Em uma modalidade, uma molécula Cas9 cliva apenas uma cadeia, por exemplo, a cadeia à qual o gRNA hibridiza, ou a cadeia complementar à cadeia com a qual gRNA hibridiza. Em uma modalidade, uma molécula Cas9 ativa compreende atividade de clivagem associada com um domínio semelhante a HNH. Em uma modalidade, uma molécula Cas9 ativa compreende atividade de clivagem associada com um domínio semelhante a RuvC em N-terminal. Em uma modalidade, uma molécula Cas9 ativa compreende atividade de clivagem associada com um domínio semelhante a HNH e atividade de clivagem associada com um domínio semelhante a RuvC em N-terminal. Em uma modalidade, uma molécula Cas9 ativa compreende um domínio semelhante a HNH ativo ou competente para

clivagem e um domínio semelhante a RuvC em N-terminal inativo ou incompetente para clivagem. Em uma modalidade, uma molécula Cas9 ativa compreende um domínio semelhante a HNH inativo ou incompetente para clivagem e um domínio semelhante a RuvC em N-terminal ativo ou competente para clivagem.

[0367] Em uma modalidade, a capacidade de uma molécula Cas9 ativa para interagir com e clivar um ácido nucleico alvo é dependente da sequência PAM. Uma sequência PAM é uma sequência no ácido nucleico alvo. Em uma modalidade, a clivagem do ácido nucleico alvo ocorre a montante da sequência PAM. Moléculas Cas9 ativas de diferentes espécies bacterianas podem reconhecer diferentes motivos de sequência (por exemplo, sequências PAM). Em uma modalidade, uma molécula Cas9 ativa de *S. pyogenes* reconhece o motivo de sequência NGG e dirige a clivagem de uma sequência de ácido nucleico alvo de 1 a 10, por exemplo, 3 a 5, pares de bases a montante dessa sequência. Ver, por exemplo, Mali et al, SCIENCE 2013; 339(6121): 823- 826. Em uma modalidade, uma molécula Cas9 ativa de *S. thermophilus* reconhece o motivo de sequência NGGNG e NNAG AAW (W = A ou T) e dirige a clivagem de uma sequência de ácido nucleico alvo principal de 1 a 10, por exemplo, 3 a 5, pares de bases a montante dessas sequências. Ver, por exemplo, Horvath et al., SCIENCE 2010; 327(5962): 167- 170 e Deveau et al, J BACTERIOL 2008; 190(4): 1390-1400. Em uma modalidade, uma molécula Cas9 ativa de *S. mulans* reconhece o motivo de sequência NGG ou NAAR (R - A ou G) e dirige a clivagem de uma sequência de ácido nucleico alvo principal de 1 a 10, por exemplo, 3 a 5, pares de bases a montante dessa sequência. Ver, por exemplo, Deveau et al., J BACTERIOL 2008; 190(4): 1 390- 1400.

[0368] Em uma modalidade, uma molécula Cas9 ativa de *S. aureus* reconhece o motivo de sequência NNGRR (R = A ou G) e dirige a clivagem de uma sequência de ácido nucleico alvo de 1 a 10, por

exemplo, 3 a 5, pares de bases a montante dessa sequência. Ver, por exemplo, Ran F. et al., NATURE, vol. 520, 2015, pp. 186-191. Em uma modalidade, uma molécula Cas9 ativa de *N. meningitidis* reconhece o motivo de sequência NNNNGATT e dirige a clivagem de uma sequência de ácido nucleico alvo de 1 a 10, por exemplo, 3 a 5, pares de bases a montante dessa sequência. Ver, por exemplo, Hou et al., PNAS EARLY EDITION 2013, 1 -6. A capacidade de uma molécula Cas9 para reconhecer uma sequência PAM pode ser determinada, por exemplo, utilizando um ensaio de transformação descrito em Jinek et al, SCIENCE 2012, 337:816.

[0369] Algumas moléculas Cas9 têm a capacidade de interagir com uma molécula de gRNA e em conjunto com a molécula de gRNA são endereçadas (por exemplo, direcionadas ou localizadas) para um domínio alvo principal, mas são incapazes de clivar o ácido nucleico alvo, ou incapazes de clivar a taxas eficientes. As moléculas Cas9 que não possuem atividade de clivagem ou possuem atividade de clivagem não substancial podem ser referidas aqui como Cas9 inativa (uma Cas9 enzimaticamente inativa), uma Cas9 morta ou uma molécula dCas9. Por exemplo, uma molécula Cas9 inativa pode ter falta de atividade de clivagem ou ter substancialmente menos, por exemplo, menos de 20, 10, 5, 1 ou 0,1% da atividade de clivagem de uma molécula Cas9 de referência, como medida por um ensaio aqui descrito.

[0370] Exemplos de moléculas Cas9 que ocorrem naturalmente são descritas em Chylinski et al, RNA Biology 2013; 10:5, 727-737. Tais moléculas Cas9 incluem as moléculas Cas9 de uma família bacteriana cluster 1, família bacteriana cluster 2, família bacteriana cluster 3, família bacteriana cluster 4, família bacteriana cluster 5, família bacteriana cluster 6, família bacteriana cluster 7, família bacteriana cluster 8, família bacteriana cluster 9, família bacteriana cluster 10, família bacteriana cluster 11, família bacteriana cluster 12, família bacteriana cluster 13,

família bacteriana cluster 14, família bacteriana cluster 1, família bacteriana cluster 16, família bacteriana cluster 17, família bacteriana cluster 18, família bacteriana cluster 19, família bacteriana cluster 20, família bacteriana cluster 21, família bacteriana cluster 22, família bacteriana cluster 23, família bacteriana cluster 24, família bacteriana cluster 25, família bacteriana cluster 26, família bacteriana cluster 27, família bacteriana cluster 28, família bacteriana cluster 29, família bacteriana cluster 30, família bacteriana cluster 31, família bacteriana cluster 32, família bacteriana cluster 33, família bacteriana cluster 34, família bacteriana cluster 35, família bacteriana cluster 36, família bacteriana cluster 37, família bacteriana cluster 38, família bacteriana cluster 39, família bacteriana cluster 40, família bacteriana cluster 41, família bacteriana cluster 42, família bacteriana cluster 43, família bacteriana cluster 44, família bacteriana cluster 45, família bacteriana cluster 46, família bacteriana cluster 47, família bacteriana cluster 48, família bacteriana cluster 49, família bacteriana cluster 50, família bacteriana cluster 51, família bacteriana cluster 52, família bacteriana cluster 53, família bacteriana cluster 54, família bacteriana cluster 55, família bacteriana cluster 56, família bacteriana cluster 57, família bacteriana cluster 58, família bacteriana cluster 59, família bacteriana cluster 60, família bacteriana cluster 61, família bacteriana cluster 62, família bacteriana cluster 63, família bacteriana cluster 64, família bacteriana cluster 65, família bacteriana cluster 66, família bacteriana cluster 67, família bacteriana cluster 68, família bacteriana cluster 69, família bacteriana cluster 70, família bacteriana cluster 71, família bacteriana cluster 72, família bacteriana cluster 73, família bacteriana cluster 74, família bacteriana cluster 75, família bacteriana cluster 76, família bacteriana cluster 77 ou família bacteriana cluster 78.

[0371] Exemplos de moléculas Cas9 que ocorrem naturalmente incluem uma molécula Cas9 de uma família bacteriana cluster 1.

Exemplos incluem uma molécula Cas9 de: *S. pyogenes* (por exemplo, estirpe SF370, MGAS 10270, MGAS 10750, MGAS2096, MGAS315, MGAS5005, MGAS6180, MGAS9429, NZ131 e SSI-1), *S. thermophilus* (por exemplo, estirpe LMD-9), *S. pseudoporcinus* (por exemplo, estirpe SPIN 20026), *S. mutans* (por exemplo, estirpe UA 159, NN2025), *S. macacae* (por exemplo, estirpe NCTC1 1558), *S. gallolyticus* (por exemplo, estirpe UCN34, ATCC BAA-2069), *S. equines* (por exemplo, estirpe ATCC 9812, MGCS 124), *S. dysdalactiae* (por exemplo, estirpe GGS 124), *S. bovis* (por exemplo, estirpe ATCC 700338), *S. cmginosus* (por exemplo; estirpe F021 1), *S. agalactia** (por exemplo, estirpe NEM316, A909), *Listeria monocytogenes* (por exemplo, estirpe F6854), *Listeria innocua* (*L. innocua*, por exemplo, estirpe Clip I 1262), *Enterococcus italicus* (por exemplo, estirpe DSM 15952) ou *Enterococcus faecium* (por exemplo, estirpe 1,231,408). Moléculas Cas9 exemplificativas adicionais são uma molécula Cas9 de *Neisseria meningitidis* (Hou et al. PNAS Early Edition 2013, 1-6) e uma molécula Cas9 de *S. aureus*.

[0372] Em uma modalidade, uma molécula Cas9, por exemplo, uma molécula Cas9 ativa ou uma molécula Cas9 inativa, compreende uma sequência de aminoácidos: tendo 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de homologia com; difere a não mais que 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, ou 40% dos resíduos de aminoácidos quando comparado com; difere em, pelo menos, 1, 2, 5, 10 ou 20 aminoácidos, mas não mais do que 100, 80, 70, 60, 50, 40 ou 30 aminoácidos a partir de; ou é idêntico a; qualquer sequência de molécula Cas9 aqui descrita ou uma sequência de uma molécula Cas9 que ocorre naturalmente, por exemplo, uma molécula Cas9 das espécies listadas aqui ou descritas em Chylinski et al., RNA Biology 2013, 10:5, 121-T, 1 Hou et al. PNAS Early Edition 2013, 1-6.

[0373] Em uma modalidade, uma molécula Cas9 compreende uma

sequência de aminoácidos tendo 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de homologia com; difere a não mais que 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, ou 40% dos resíduos de aminoácidos quando comparado com; difere em, pelo menos, 1, 2, 5, 10 ou 20 aminoácidos, mas não mais do que 100, 80, 70, 60, 50, 40 ou 30 aminoácidos a partir de; ou é idêntico a; Cas9 de *S. pyogenes*:

```

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val
1           5           10           15
Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
           20           25           30
Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
           35           40           45
Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
           50           55           60
Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65           70           75           80
Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
           85           90           95
Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
           100          105          110
His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
           115          120          125
His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
           130          135          140
Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145           150          155          160
Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
           165          170          175
Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
           180          185          190
Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
           195          200          205
Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn

```

210	215	220
Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn		
225	230	235
Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe		240
	245	250
Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp		255
	260	265
Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp		270
275	280	285
Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp		
290	295	300
Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser		
305	310	315
Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys		320
	325	330
Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe		335
	340	345
Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser		350
355	360	365
Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp		
370	375	380
Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg		
385	390	395
Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu		400
	405	410
Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe		415
	420	425
Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile		430
435	440	445
Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp		
450	455	460
Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu		
465	470	475
Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr		480
	485	490
Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser		495
	500	505
		510

Leu	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Phe	Thr	Val	Tyr	Asn	Glu	Leu	Thr	Lys	Val	Lys
		515						520					525		
Tyr	Val	Thr	Glu	Gly	Met	Arg	Lys	Pro	Ala	Phe	Leu	Ser	Gly	Glu	Gln
		530					535					540			
Lys	Lys	Ala	Ile	Val	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys	Thr	Asn	Arg	Lys	Val	Thr
545					550					555				560	
Val	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Asp	Tyr	Phe	Lys	Lys	Ile	Glu	Cys	Phe	Asp
				565					570					575	
Ser	Val	Glu	Ile	Ser	Gly	Val	Glu	Asp	Arg	Phe	Asn	Ala	Ser	Leu	Gly
		580						585					590		
Thr	Tyr	His	Asp	Leu	Leu	Lys	Ile	Ile	Lys	Asp	Lys	Asp	Phe	Leu	Asp
		595					600						605		
Asn	Glu	Glu	Asn	Glu	Asp	Ile	Leu	Glu	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Leu	Thr
		610				615					620				
Leu	Phe	Glu	Asp	Arg	Glu	Met	Ile	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Thr	Tyr	Ala
625				630						635				640	
His	Leu	Phe	Asp	Asp	Lys	Val	Met	Lys	Gln	Leu	Lys	Arg	Arg	Arg	Tyr
				645					650					655	
Thr	Gly	Trp	Gly	Arg	Leu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ile	Asn	Gly	Ile	Arg	Asp
		660						665					670		
Lys	Gln	Ser	Gly	Lys	Thr	Ile	Leu	Asp	Phe	Leu	Lys	Ser	Asp	Gly	Phe
		675					680						685		
Ala	Asn	Arg	Asn	Phe	Met	Gln	Leu	Ile	His	Asp	Asp	Ser	Leu	Thr	Phe
		690				695						700			
Lys	Glu	Asp	Ile	Gln	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Gly	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu
705				710						715				720	
His	Glu	His	Ile	Ala	Asn	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Lys	Lys	Gly
				725					730					735	
Ile	Leu	Gln	Thr	Val	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Leu	Val	Lys	Val	Met	Gly
		740						745					750		
Arg	His	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Val	Ile	Glu	Met	Ala	Arg	Glu	Asn	Gln
		755				760							765		
Thr	Thr	Gln	Lys	Gly	Gln	Lys	Asn	Ser	Arg	Glu	Arg	Met	Lys	Arg	Ile
		770				775						780			
Glu	Glu	Gly	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Lys	Glu	His	Pro
785				790					795					800	
Val	Glu	Asn	Thr	Gln	Leu	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu

	805		810		815
Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg					
	820		825		830
Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys					
	835		840		845
Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg					
	850		855		860
Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys					
	865		870		875
Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys					
	885		890		895
Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp					
	900		905		910
Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr					
	915		920		925
Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp					
	930		935		940
Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser					
	945		950		955
Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg					
	965		970		975
Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val					
	980		985		990
Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe					
	995		1000		1005
Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys					
	1010		1015		1020
Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser					
	1025		1030		1035
Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu					
	1045		1050		1055
Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile					
	1060		1065		1070
Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser					
	1075		1080		1085
Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly					
	1090		1095		1100

```

Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile
1105                1110                1115                1120
Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser
                1125                1130                1135
Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly
                1140                1145                1150
Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile
                1155                1160                1165
Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala
1170                1175                1180
Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys
1185                1190                1195                1200
Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser
                1205                1210                1215
Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr
                1220                1225                1230
Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
                1235                1240                1245
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His
1250                1255                1260
Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val
1265                1270                1275                1280
Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys
                1285                1290                1295
His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu
                1300                1305                1310
Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp
                1315                1320                1325
Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp
1330                1335                1340
Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile
1345                1350                1355                1360
Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
                1365

```

(SEQ ID NO: 205)

[0374] Em modalidades, a molécula Cas9 é uma variante de Cas9 de *S. pyogenes* de SEQ ID NO: 205 que inclui uma ou mais mutações para aminoácidos carregados positivamente (por exemplo, lisina, arginina ou histidina) que introduzem um aminoácido não polar ou não

carregado, por exemplo, alanina, na referida posição. Em modalidades, a mutação é para um ou mais aminoácidos carregados positivamente no sulco-nt de Cas9. Em modalidades, a molécula Cas9 é uma variante de Cas9 de *S. pyogenes* de SEQ ID NO: 205 que inclui uma mutação na posição 855 de SEQ ID NO: 205, por exemplo, uma mutação para um aminoácido não carregado, por exemplo, alanina, na posição 855 da SEQ ID NO: 205. Em modalidades, a molécula Cas9 tem uma mutação apenas na posição 855 de SEQ ID NO: 205, em relação à SEQ ID NO: 205, por exemplo, para um aminoácido não carregado, por exemplo, alanina. Em modalidades, a molécula Cas9 é uma variante de Cas9 de *S. pyogenes* de SEQ ID NO: 205 que inclui uma mutação na posição 810, uma mutação na posição 1003 e/ou uma mutação na posição 1060 da SEQ ID NO: 205, por exemplo uma mutação para a alanina na posição 810, posição 1003 e/ou posição 1060 da SEQ ID NO: 205. Em modalidades, a molécula Cas9 tem uma mutação apenas na posição 810, posição 1003 e posição 1060 de SEQ ID NO: 205, em relação à SEQ ID NO: 205, por exemplo, em que cada mutação é para um aminoácido não carregado, por exemplo, alanina. Em modalidades, a molécula Cas9 é uma variante de Cas9 de *S. pyogenes* de SEQ ID NO: 205 que inclui uma mutação na posição 848, uma mutação na posição 1003 e/ou uma mutação na posição 1060 da SEQ ID NO: 205, por exemplo uma mutação para a alanina na posição 848, posição 1003 e/ou posição 1060 da SEQ ID NO: 205. Em modalidades, a molécula Cas9 tem uma mutação apenas na posição 848, posição 1003 e posição 1060 de SEQ ID NO: 205, em relação à SEQ ID NO: 205, por exemplo, em que cada mutação é para um aminoácido não carregado, por exemplo, alanina. Em modalidades, a molécula Cas9 é uma molécula Cas9 como descrito em Slaymaker et al., *Science Express*, disponível online, 1 de dezembro de 2015 em Ciência DOI.: 10.1126/science.aad5227.

[0375] Em modalidades, a molécula Cas9 é uma variante de Cas9 de *S. pyogenes* de SEQ ID NO: 205 inclui uma ou mais mutações. Em modalidades, a variante de Cas9 compreende uma mutação na posição 80 de SEQ ID NO: 205, por exemplo, inclui uma leucina na posição 80 da SEQ ID NO: 205 (ou seja, compreende, por exemplo, consiste em SEQ ID NO: 205 com uma mutação C80L). Em modalidades, a variante de Cas9 compreende uma mutação na posição 574 de SEQ ID NO: 205, por exemplo, inclui um ácido glutâmico na posição 574 da SEQ ID NO: 205 (ou seja, compreende, por exemplo, consiste em SEQ ID NO: 205 com uma mutação C574E). Em modalidades, a variante de Cas9 compreende uma mutação na posição 80 e uma mutação na posição 574 de SEQ ID NO: 205, por exemplo, inclui uma leucina na posição 80 da SEQ ID NO: 205, e um ácido glutâmico na posição 574 da SEQ ID NO: 205 (ou seja, compreende, por exemplo, consiste em SEQ ID NO: 205 com uma mutação C80L e uma mutação C574E). Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que tais mutações melhoram as propriedades em solução da molécula Cas9.

[0376] Em modalidades, a molécula Cas9 é uma variante de Cas9 de *S. pyogenes* de SEQ ID NO: 205 inclui uma ou mais mutações. Em modalidades, a variante de Cas9 compreende uma mutação na posição 147 de SEQ ID NO: 205, por exemplo, inclui uma tirosina na posição 147 da SEQ ID NO: 205 (ou seja, compreende, por exemplo, consiste em SEQ ID NO: 205 com uma mutação D147Y). Em modalidades, a variante de Cas9 compreende uma mutação na posição 411 de SEQ ID NO: 205, por exemplo, que inclui uma treonina na posição 411 da SEQ ID NO: 205 (ou seja, compreende, por exemplo, consiste em SEQ ID NO: 205 com uma mutação P411T). Em modalidades, a variante de Cas9 compreende uma mutação na posição 147 e uma mutação na posição 411 de SEQ ID NO: 205, por exemplo, inclui uma tirosina na posição 147 da SEQ ID NO: 205, e uma treonina na posição 411 da

SEQ ID NO: 205 (ou seja, compreende, por exemplo, consiste em SEQ ID NO: 205 com uma mutação D147Y e uma mutação P411T). Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que tais mutações melhoram a eficiência de direcionamento da molécula Cas9, por exemplo em levedura.

[0377] Em modalidades, a molécula Cas9 é uma variante de Cas9 de *S. pyogenes* de SEQ ID NO: 205 inclui uma ou mais mutações. Em modalidades, a variante de Cas9 compreende uma mutação na posição 1135 de SEQ ID NO: 205, por exemplo, inclui um ácido glutâmico na posição 1135 da SEQ ID NO: 205 (ou seja, compreende, por exemplo, consiste em SEQ ID NO: 205 com uma mutação D1135E). Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que tais mutações melhoram a seletividade da molécula Cas9 para a sequência NGG PAM versus a sequência NAG PAM.

[0378] Em modalidades, a molécula Cas9 é uma variante de Cas9 de *S. pyogenes* de SEQ ID NO: 205 que inclui uma ou mais mutações que introduzem um aminoácido não polar ou não carregado, por exemplo, alanina, em certas posições. Em modalidades, a molécula Cas9 é uma variante de Cas9 de *S. pyogenes* de SEQ ID NO: 205 que inclui uma mutação na posição 497, uma mutação na posição 661, uma mutação na posição 695 e/ou uma mutação na posição 926 da SEQ ID NO: 205, por exemplo uma mutação para a alanina na posição 497, posição 661, posição 695 e/ou posição 926 da SEQ ID NO: 205. Em modalidades, a molécula Cas9 tem uma mutação apenas na posição 497, posição 661, posição 695 e posição 926 de SEQ ID NO: 205, em relação à SEQ ID NO: 205, por exemplo, em que cada mutação é para um aminoácido não carregado, por exemplo, alanina. Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que tais mutações reduzam o corte pela molécula Cas9 em sítios fora do alvo.

[0379] Deve entender-se que as mutações aqui descritas para a

molécula Cas9 podem ser combinadas e podem ser combinadas com qualquer das fusões ou outras modificações aqui descritas, e a molécula Cas9 testada nos ensaios aqui descritos.

[0380] Vários tipos de moléculas Cas podem ser utilizados para a prática das invenções aqui divulgadas. Em algumas modalidades, são utilizadas moléculas Cas de sistemas Cas do Tipo II. Em outras modalidades, são utilizadas moléculas Cas de outros sistemas Cas. Por exemplo, podem ser usadas moléculas Cas do Tipo I ou do Tipo III. Exemplos de moléculas Cas (e sistemas Cas) são descritos, por exemplo, em Haft et al, PLoS COMPUTATIONAL BIOLOGY 2005, 1(6): e60 e Makarova et al, NATURE REVIEW MICROBIOLOGY 201 1, 9:467-477, o conteúdo de ambas as referências são aqui incorporadas por referência na sua totalidade.

[0381] Em uma modalidade, a molécula Cas9 compreende uma ou mais das seguintes atividades: uma atividade de *nickase*; uma atividade de clivagem de cadeia dupla (por exemplo, uma atividade de endonuclease e/ou exonuclease); uma atividade de helicase; ou a capacidade, juntamente com uma molécula de gRNA, para localizar um ácido nucleico alvo.

Moléculas Cas9 Alteradas

[0382] As moléculas Cas9 de ocorrência natural possuem um certo número de propriedades, incluindo: atividade de *nickase*, atividade de nuclease (por exemplo, atividade de endonuclease e/ou exonuclease); atividade de helicase; a capacidade de se associar funcionalmente com uma molécula de gRNA; e a capacidade de direcionar (ou localizar) um sítio em um ácido nucleico (por exemplo, reconhecimento e especificidade de PAM). Em uma modalidade, as moléculas Cas9 podem incluir todo ou um subconjunto destas propriedades. Em modalidades típicas, as moléculas Cas9 têm a capacidade de interagir com uma molécula de gRNA e, em conjunto com a molécula de gRNA,

localizar um sítio em um ácido nucleico. Outras atividades, por exemplo, especificidade de PAM, atividade de clivagem ou atividade de helicase podem variar mais amplamente nas moléculas Cas9.

[0383] As moléculas Cas9 com propriedades desejadas podem ser feitas em um número de formas, por exemplo, por alteração de uma das moléculas Cas9 parentais, por exemplo, de ocorrência natural, para proporcionar uma molécula Cas9 alterada possuindo uma propriedade desejada. Por exemplo, uma ou mais mutações ou diferenças relativas a uma molécula Cas9 parental podem ser introduzidas. Tais mutações e diferenças compreendem: substituições (por exemplo, substituições conservativas ou substituições de aminoácidos não essenciais); inserções; ou exclusões. Em uma modalidade, uma molécula de Cas9 pode compreender uma ou mais mutações ou diferenças, por exemplo, pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 ou 50 mutações, mas inferior a 200, 100 ou 80 mutações em relação a uma molécula Cas9 de referência.

[0384] Em uma modalidade, uma mutação ou mutações não têm um efeito substancial sobre uma atividade de Cas9, por exemplo, uma atividade de Cas9 descrita aqui. Em uma modalidade, uma mutação ou mutações têm um efeito substancial sobre uma atividade de Cas9, por exemplo, uma atividade de Cas9 descrita aqui. Em uma modalidade, as atividades exemplificativas compreendem uma ou mais de especificidade de PAM, atividade de clivagem e atividade da helicase. Uma mutação(ões) pode estar presente, por exemplo, em: um ou mais domínio semelhante a RuvC, por exemplo, um domínio semelhante a RuvC em N-terminal; um domínio semelhante a HNH; uma região fora dos domínios semelhante a RuvC e do domínio semelhante a HNH. Em algumas modalidades, uma mutação(ões) está presente em um domínio semelhante a RuvC em N-terminal. Em algumas modalidades, uma mutação(ões) está presente em um domínio semelhante a HNH. Em

algumas modalidades, as mutações estão presentes tanto em um domínio semelhante a RuvC em N-terminal como em um domínio semelhante a HNH.

[0385] Se uma sequência específica, por exemplo, uma substituição, pode afetar uma ou mais atividades, tal como atividade de direcionamento, atividade de clivagem, etc., pode ser avaliado ou previsto, por exemplo, avaliando se a mutação é conservativa ou pelo método descrito em Seção ΠI. Em uma modalidade, um resíduo de aminoácido "não essencial", tal como utilizado no contexto de uma molécula Cas9, é um resíduo que pode ser alterado a partir da sequência de tipo selvagem de uma molécula Cas9, por exemplo, uma molécula Cas9 que ocorre naturalmente, por exemplo, uma molécula Cas9 ativa, sem abolir ou mais preferencialmente, sem alterar substancialmente uma atividade de Cas9 (por exemplo, atividade de clivagem), enquanto a alteração de um resíduo de aminoácido "essencial" resulta em uma perda substancial de atividade (por exemplo, atividade de clivagem).

Moléculas Cas9 com reconhecimento PAM alterado ou sem reconhecimento PAM

[0386] As moléculas Cas9 de ocorrência natural podem reconhecer sequências PAM específicas, por exemplo as sequências de reconhecimento de PAM descritas acima para *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans*, *S. aureus* e *N. meningitidis*.

[0387] Em uma modalidade, uma molécula Cas9 tem as mesmas especificidades de PAM que uma molécula Cas9 de ocorrência natural. Noutras modalidades, uma molécula Cas9 tem uma especificidade de PAM não associada a uma molécula Cas9 de ocorrência natural, ou uma especificidade de PAM não associada à molécula Cas9 de ocorrência natural à qual tem a homologia de sequência mais próxima. Por exemplo, uma molécula Cas9 de ocorrência natural pode ser

alterada, por exemplo, para alterar o reconhecimento PAM, por exemplo, para alterar a sequência PAM que a molécula Cas9 reconhece, para diminuir os sítios fora do alvo e/ou melhorar a especificidade; ou eliminar um requisito de reconhecimento de PAM. Em uma modalidade, uma molécula Cas9 pode ser alterada, por exemplo, para aumentar o comprimento da sequência de reconhecimento de PAM e/ou melhorar a especificidade de Cas9 para um nível elevado de identidade para diminuir os sítios fora do alvo e aumentar a especificidade. Em uma modalidade, o comprimento da sequência de reconhecimento de PAM tem, pelo menos, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 15 aminoácidos de comprimento. Moléculas Cas9 que reconhecem diferentes sequências de PAM e/ou que reduziram a atividade fora do alvo podem ser geradas usando evolução dirigida. Métodos e sistemas exemplificativos que podem ser utilizados para a evolução dirigida de moléculas Cas9 são descritos, por exemplo, em Esvelt et al, Nature 2011, 472 (7344): 499-503. As moléculas Cas9 candidatas podem ser avaliadas, por exemplo, pelos métodos aqui descritos.

Moléculas Cas9 Não-Clivantes e com Clivagem Modificada

[0388] Em uma modalidade, uma molécula Cas9 compreende uma propriedade de clivagem que difere de moléculas Cas9 de ocorrência natural, por exemplo, que difere da molécula Cas9 de ocorrência natural que tem a homologia mais próxima. Por exemplo, uma molécula Cas9 pode diferir das moléculas Cas9 que ocorrem naturalmente, por exemplo, uma molécula Cas9 de *S. pyogenes*, como se segue: sua capacidade de modular a clivagem, por exemplo, diminuição ou aumento, de uma quebra de cadeia dupla (atividade de endonuclease e/ou exonuclease), por exemplo, em comparação com uma molécula Cas9 de ocorrência natural (por exemplo, uma molécula Cas9 de *S. pyogenes*); a sua capacidade de modular a clivagem, por exemplo, diminuição ou aumento, de uma cadeia simples de um ácido nucleico,

por exemplo, uma cadeia não complementar de uma molécula de ácido nucleico ou uma cadeia complementar de uma molécula de ácido nucleico (atividade *nickase*), por exemplo, em comparação com uma molécula Cas9 de ocorrência natural (por exemplo, uma molécula Cas9 de *S. pyogenes*); ou a capacidade de clivar uma molécula de ácido nucleico, por exemplo, uma molécula de ácido nucleico de cadeia dupla ou de cadeia simples, pode ser eliminada.

Moléculas Cas9 ativas de Clivagem Modificada

[0389] Em uma modalidade, uma molécula Cas9 ativa compreende uma ou mais das seguintes atividades: atividade de clivagem associada com um domínio semelhante a RuvC em N-terminal; atividade de clivagem associada a um domínio HNH; atividade de clivagem associada a um domínio semelhante a HNH e atividade de clivagem associada a um domínio semelhante a RuvC em N-terminal.

[0390] Em uma modalidade, a molécula Cas9 é uma *nickase* Cas9, por exemplo, cliva apenas uma cadeia simples de DNA. Em uma modalidade, a *nickase* Cas9 inclui uma mutação na posição 10 e/ou uma mutação na posição 840 de SEQ ID NO: 205, por exemplo, compreende uma mutação D10A e/ou H840A para SEQ ID NO: 205.

Moléculas Cas9 inativas Não-Clivantes

[0391] Em uma modalidade, a molécula Cas9 alterada é uma molécula Cas9 inativa que não cliva uma molécula de ácido nucleico (moléculas de ácido nucleico de cadeia dupla ou de cadeia simples) ou cliva uma molécula de ácido nucleico com significativamente menos eficiência, por exemplo, menos do que 20, 10, 5, 1 ou 0,1% da atividade de clivagem de uma molécula Cas9 de referência, por exemplo, conforme medido por um ensaio aqui descrito. A molécula Cas9 de referência pode ser por uma molécula Cas9 não modificada que ocorre naturalmente, por exemplo, uma molécula Cas9 de ocorrência natural, tal como uma molécula Cas9 de *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S.*

aureus ou *N. meningitidis*. Em uma modalidade, a molécula Cas9 de referência é a molécula Cas9 de ocorrência natural que possui a identidade ou homologia de sequência mais próxima. Em uma modalidade, a molécula Cas9 inativa não tem atividade de clivagem substancial associada com um domínio semelhante a RuvC em N-terminal e atividade de clivagem associada com um domínio semelhante a HNH.

[0392] Em uma modalidade, a molécula Cas9 é dCas9. Tsai et al. (2014), *Nat. Biotech.* 32:569-577.

[0393] Uma molécula Cas9 cataliticamente inativa pode ser fundida com um repressor de transcrição. Uma proteína de fusão Cas9 inativa complexa com um gRNA e localiza em uma sequência de DNA especificada pelo domínio-alvo do gRNA, mas, ao contrário de uma Cas9 ativa, não clivará o DNA alvo. A fusão de um domínio efetivo, como um domínio de repressão transcricional, a uma Cas9 inativa permite o recrutamento do efetor para qualquer sítio de DNA especificado pelo gRNA. O direcionamento específico de sítio de uma proteína de fusão Cas9 a uma região promotora de um gene pode bloquear ou afetar a ligação da polimerase à região promotora, por exemplo, uma fusão Cas9 com um fator de transcrição (por exemplo, um ativador de transcrição) e/ou um intensificador transcricional que se liga ao ácido nucleico para aumentar ou inibir a ativação da transcrição. Alternativamente, o direcionamento específico de sítio de uma fusão de Cas9 para um repressor de transcrição para uma região promotora de um gene pode ser usado para diminuir a ativação da transcrição.

[0394] Repressores de transcrição ou domínios repressores de transcrição que podem ser fundidos com uma molécula Cas9 inativa podem incluir ruppel associated box (KRAB ou SKD), o domínio de interação Mad mSIN3 (SID) ou o domínio repressor ERF (ERD).

[0395] Em outra modalidade, uma molécula Cas9 inativa pode ser

fundida com uma proteína que modifica a cromatina. Por exemplo, uma molécula Cas9 inativa pode ser fundida à proteína 1 da heterocromatina (HP1), uma metiltransferase de histona lisina (por exemplo, SUV39H 1, SUV39H2, G9A, ESET/SETDB 1, Pr-SET7/8, SUV4-20H 1, RIZ1), uma histona lisina desmetilada (por exemplo, LSD1/BHC1 10, SpLsd1/Sw, I/Saf1 10, Su(var)3-3, JMJD2A/JHDM3A, JMJD2B, JMJD2C/GASC1, JMJD2D, Rph 1, JARID 1 A/RBP2, JARID1B/PLU-I, JARID1C/SMCX, JARID1D/SMCY, Lid, Jhn2, Jmj2), uma desacetilase de histona lisina (por exemplo, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, Rpd3, Hos 1, Cir6, HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9, Hdac, Cir3, SIRT 1, SIRT2, Sir2, Hst 1, Hst2, Hst3, Hst4, HDAC 1 1) e uma metilase de DNA (DNMT1, DNMT2a/DNMT3b, MET1). Uma proteína de fusão de molécula modificadora Cas9-cromatina inativa pode ser usada para alterar o estado da cromatina para reduzir a expressão de um gene alvo.

[0396] A sequência heteróloga (por exemplo, o domínio repressor da transcrição) pode ser fundida com o N- ou C-terminal da proteína Cas9 inativa. Em uma modalidade alternativa, a sequência heteróloga (por exemplo, o domínio repressor da transcrição) pode ser fundida com uma porção interna (isto é, uma porção que não seja o N-terminal ou C-terminal) da proteína Cas9 inativa.

[0397] A capacidade de um complexo de molécula Cas9/ molécula de gRNA para se ligar e clivar um ácido nucleico alvo pode ser avaliada, por exemplo, pelos modos aqui descritos na Secção II. A atividade de uma molécula Cas9, por exemplo, tanto uma Cas9 ativa ou Cas9 inativo, sozinha ou em um complexo com uma molécula de gRNA pode também ser avaliada por métodos bem conhecidos na técnica, incluindo ensaios de expressão genética e ensaios baseados em cromatina, por exemplo, imunoprecipitação da cromatina (ChIP) e ensaio *in vivo* de cromatina (CiA).

Outras Moléculas Cas9 de Fusões

[0398] Em modalidades, a molécula Cas9, por exemplo, uma Cas9 de *S. pyogenes*, pode compreender adicionalmente uma ou mais sequências de aminoácidos que conferem atividade adicional.

[0399] Em alguns aspectos, a molécula Cas9 pode compreender uma ou mais sequências de localização nuclear (NLSs), tais como, pelo menos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais NLSs. Em algumas modalidades, a molécula Cas9 compreende, pelo menos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais NLSs no ou próximo do terminal amino, pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais NLSs no ou próximo do terminal carbóxi, ou uma combinação destas (por exemplo, uma ou mais NLSs no terminal amino e uma ou mais NLSs no terminal carbóxi). Quando mais de uma NLS estiver presente, cada uma pode ser selecionada independentemente das outras, de forma que uma única NLS possa estar presente em mais de uma cópia e/ou em combinação com uma ou mais outras NLS presentes em uma ou mais cópias. Em algumas modalidades, uma NLS é considerada próxima do terminal N ou C quando o aminoácido mais próximo da NLS está dentro de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, ou mais aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica a partir do terminal N ou C. Tipicamente, uma NLS consiste em uma ou mais sequências curtas de lisinas ou argininas carregadas positivamente expostas na superfície da proteína, mas outros tipos de NLS são conhecidos. Exemplos não limitativos de NLS incluem uma sequência NLS compreendendo ou derivada de: a NLS do antígeno T grande do vírus SV40, tendo a sequência de aminoácidos PKKKRKV (SEQ ID NO: 206); o NLS da nucleoplasmina (por exemplo, a NLS da nucleoplasmina bipartida com a sequência KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 207); a NLS c-myc tendo a sequência de aminoácidos PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 208) ou RQRRNELKRSP (SEQ ID NO: 209); a NLS hRNPA1 M9 tendo a sequência

NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY (SEQ ID NO: 210); a sequência RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV (SEQ ID NO: 211) do domínio IBB da importina-alfa; as sequências VSRKRPRP (SEQ ID NO: 212) e PPKKARED (SEQ ID NO: 213) da proteína T do mioma; a sequência PQPKKKPL (SEQ ID NO: 214) de p53 humano; a sequência SALIKKKKKMAP (SEQ ID NO: 215) de c-ab1 IV de camundongo; as sequências DRLRR (SEQ ID NO: 216) e PKQKKRK (SEQ ID NO: 217) NS1 do vírus influenza; a sequência RKLKKKIKKL (SEQ ID NO: 218) do antígeno delta do vírus da hepatite; a sequência REKKKFLKRR (SEQ ID NO: 219) da proteína Mx1 de camundongo; a sequência KRKGDEV DGVDEVAKKKSKK (SEQ ID NO: 220) da polimerase poli(ADP-ribose) humana; e a sequência RKCLQAGMNLEARKTKK (SEQ ID NO: 221) dos receptores glucocorticóides da hormona esteróide (humano). Outras sequências NLSs adequadas são conhecidas na técnica (por exemplo, Sorokin, *Biochemistry (Moscow)* (2007) 72:13, 1439-1457; Lange *J Biol Chem.* (2007) 282:8, 5101-5).

[0400] Em uma modalidade, a molécula Cas9, por exemplo, a molécula Cas9 de *S. pyogenes*, compreende uma sequência NLS de SV40, por exemplo, disposta no terminal N da molécula Cas9. Em uma modalidade, a molécula Cas9, por exemplo, a molécula Cas9 de *S. pyogenes*, compreende uma sequência NLS de SV40 disposta no terminal N da molécula Cas9 e uma sequência NLS de SV40 disposta no terminal C da molécula Cas9. Em uma modalidade, a molécula Cas9, por exemplo, a molécula Cas9 de *S. pyogenes*, compreende uma sequência NLS de SV40 disposta no terminal N da molécula Cas9 e uma sequência NLS de nucleoplasmina disposta no terminal C da molécula Cas9. Em qualquer uma das modalidades acima mencionadas, a molécula pode compreender adicionalmente um

marcador, por exemplo, um marcador His, por exemplo, um marcador His(6) (SEQ ID NO: 247) ou marcador His(8) (SEQ ID NO : 248), por exemplo, no terminal N ou terminal C.

[0401] Em alguns aspectos, a molécula Cas9 pode compreender uma ou mais sequências de aminoácidos que permitem que a molécula Cas9 seja especificamente reconhecida, por exemplo, um marcador. Em uma modalidade, o marcador é um marcador de histidina, por exemplo, um marcador de histidina compreendendo, pelo menos, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais aminoácidos de histidina. Em modalidades, o marcador de histidina é um marcador His6 (seis histidinas)(SEQ ID NO: 247). Em outras modalidades, o marcador de histidina é um marcador His8 (oito histidinas) (SEQ ID NO: 248). Em modalidades, o marcador de histidina pode ser separado de uma ou mais outras porções da molécula Cas9 por um ligante. Em modalidades, o ligante é GGS. Um exemplo de tal fusão é a molécula Cas9 iProt106520.

[0402] Em alguns aspectos, a molécula Cas9 pode compreender uma ou mais sequências de aminoácidos que são reconhecidas por uma protease (por exemplo, compreendem um sítio de clivagem de protease). Em modalidades, o sítio de clivagem é o sítio de clivagem do vírus etch do tabaco (TEV), por exemplo, compreende a sequência ENLYFQG (SEQ ID NO: 230). Em alguns aspectos, o local de clivagem de protease, por exemplo, o local de clivagem de TEV está disposto entre um marcador, por exemplo, um marcador His, por exemplo, um marcador His6 (SEQ ID NO: 247) ou marcador His8 (SEQ ID NO: 248), e o restante da molécula de Cas9. Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que essa introdução permitirá a utilização do marcador para, por exemplo, a purificação da molécula Cas9 e, em seguida, a clivagem subsequente, para que o marcador não interfira com a função da molécula Cas9.

[0403] Em modalidades, a molécula Cas9 (por exemplo, uma

molécula Cas9 como aqui descrita) compreende uma NLS N-terminal, e uma NLS C-terminal (por exemplo, compreende, NLS-cas9-NLS a partir de N- para C-terminal), por exemplo, em que cada NLS é uma NLS de SV40 (PKKKRKV (SEQ ID NO: 206)). Em modalidades, a molécula Cas9 (por exemplo, uma molécula Cas9 como aqui descrito) compreende uma NLS em terminal N, uma NLS em terminal C, e um marcador His6 em terminal C (SEQ ID NO: 247) (por exemplo, compreende, do terminal N para C NLS-Cas9-NLS-marcaador His), por exemplo, em que cada NLS é uma NLS de SV40 (PKKKRKV (SEQ ID NO: 206)). Em modalidades, a molécula Cas9 (por exemplo, uma molécula Cas9 como aqui descrito) compreende um marcador His em terminal N (por exemplo, marcador His6 (SEQ ID NO: 247)), uma NLS N-terminal, e uma NLS C-terminal (por exemplo, compreende, do terminal N para o terminal C marcaador tag-NLS-Cas9-NLS), por exemplo, em que cada NLS é uma NLS de SV40 (PKKKRKV (SEQ ID NO: 206)). Em modalidades, a molécula Cas9 (por exemplo, uma molécula Cas9 como aqui descrito) compreende uma NLS em terminal N e um marcador His em terminal C (por exemplo, marcador His6 (SEQ ID NO: 247)) (por exemplo, compreende, do terminal N para C marcaador His-Cas9-NLS), por exemplo, em que a NLS é uma NLS de SV40 (PKKKRKV (SEQ ID NO: 206)). Em modalidades, a molécula Cas9 (por exemplo, uma molécula Cas9 como aqui descrito) compreende uma NLS em terminal N e um marcador His em terminal C (por exemplo, marcador His6 (SEQ ID NO: 247)) (por exemplo, compreende, do terminal N para C NLS-Cas9-marcaador His), por exemplo, em que a NLS é uma NLS de SV40 (PKKKRKV (SEQ ID NO: 206)). Em modalidades, a molécula Cas9 (por exemplo, uma molécula Cas9 como aqui descrito) compreende um marcador His em terminal N (por exemplo, marcador His8 (SEQ ID NO: 248)), um domínio de clivagem em terminal N (por exemplo, domínio de clivagem do vírus etch do tabaco (TEV) (por

exemplo, compreende a sequência ENLYFQG (SEQ ID NO: 230))), uma NLS em N-terminal (por exemplo, uma NLS de SV40; SEQ ID NO: 206), e uma NLS em C-terminal (por exemplo, uma NLS em SV40; SEQ ID NO: 206) (por exemplo, compreende marcador His-TEV-NLS-Cas9-NLS a partir de N- para C-terminal). Em qualquer das modalidades acima mencionadas, a Cas9 tem a sequência de SEQ ID NO: 205. Alternativamente, em qualquer das modalidades acima mencionadas, a Cas9 tem uma sequência da variante de Cas9 de SEQ ID NO: 205, por exemplo, como acima descrito. Em qualquer das modalidades acima mencionadas, a molécula Cas9 compreende um ligante entre o marcador His e uma outra porção da molécula, por exemplo, um ligante de GGS. As sequências de aminoácidos de moléculas Cas9 exemplificativas descritas acima são fornecidas abaixo. Os identificadores "iProt" correspondem aos da Figura 60.

[0404] iProt105026 (também referido como iProt106154, iProt106331, iProt106545 e PID426303, dependendo da preparação da proteína) (SEQ ID NO: 233):

MAPKKKRKVD	KKYSIGLDIG	TNSVGWAVIT	DEYKVPSKKF
KVLGNTDRHS	IKKNLIGALL	FDSGETAEAT	RLKRTARRRY
TRRKNRICYL	QEIFSNE MAK	VDDSFFHRLE	ESFLVEEDKK
HERHPIFGNI	VDEVAYHEKY	PTIYHLRKKL	VDSTDKADLR
LIYLALAHMI	KFRGHFLIEG	DLNPDNSDVD	KLFIQLVQTY
NQLFEENPIN	ASGVDAKAIL	SARLSKSRRL	ENLIAQLPGE
KKNGLFGNLI	ALSLGLTPNF	KSNFDLAEDA	KLQLSKDTYD
DDL DNLLAQI	GDQYADLFLA	AKNLSDAILL	SDILRVNTEI
TKAPLSASMI	KRYDEHHQDL	TLLKALVRQQ	LPEKYKEIFF
DQSKNGYAGY	IDGGASQEEF	YKFIKPILEK	MDGTEELLVK
LNREDLLRKQ	RTFDNGSIPH	QIHLGELHAI	LRRQEDFY PF
LKDNREKIEK	ILTFRIPYYV	GPLARGNSRF	AWMTRKSEET
ITPWNFEEVV	DKGASAQSF I	ERMTNFDKNL	PNEKVLPKHS

LLYEYFTVYN	ELTKVKYVTE	GMRKPAFLSG	EQKKAIVDLL
FKTNRKVTVK	QLKEDYFKKI	ECFDSVEISG	VEDRFNASLG
TYHDLLKIIK	DKDFLDNEEN	EDILEDIVLT	LTLFEDREMI
EERLKTYAHL	FDDKVMKQLK	RRRYTGWGRL	SRKLINGIRD
KQSGKTILDF	LKSDGFANRN	FMQLIHDDSL	TFKEDIQKAQ
VSGQGDSLHE	HIANLAGSPA	IKKGILQTVK	VVDELVKVMG
RHKPENIVIE	MARENQTTQK	GQKNSRERMK	RIEEGIKELG
SQILKEHPVE	NTQLQNEKLY	LYYLQNGRDM	YVDQEELDINR
LSDYDVDHIV	PQSFLKDDSI	DNKVLTRSDK	NRGKSDNVPS
EEVVKKMKNY	WRQLLNAKLI	TQRKFDNLTK	AERGGLSELD
KAGFIKRQLV	ETRQITKHVA	QILDSRMNTK	YDENDKLIRE
VKVITLKSKL	VSDFRKDFQF	YKVREINNYH	HAHDAYLNAV
VGTAIIKKYP	KLESEFVYGD	YKVYDVRKMI	AKSEQEIGKA
TAKYFFYSNI	MNFFKTEITL	ANGEIRKRPL	IETNGETGEI
VWDKGRDFAT	VRKVLSPMPQV	NIVKKTEVQT	GGFSKESILP
KRNSDKLIAR	KKDWDPPKKYG	GFDSPTVAYS	VLVVAKVEKG
KSKKLKSVKE	LLGITIMERS	SFEKNPIDFL	EAKGYKEVKK
DLIIKLPKYS	LFELNGRKR	MLASAGELQK	GNELALPSKY
VNPLYLASHY	EKLKGSPEDN	EQKQLFVEQH	KHYLDEIIEQ
ISEFSKRVIL	ADANLDKVLS	AYNKHRDKPI	REQAENIIHL
FTLTNLGAPA	AFKYFDTTID	RKRYTSTKEV	LDATLIHQSI
TGLYETRIDL	SQLGGDSRAD	PKKKRKVHHH	HHH

[0405] iProt106518 (SEQ ID NO: 234):

MAPKKKRKVD	KKYSIGLDIG	TNSVGWAVIT	DEYKVPSKKF
KVLGNTDRHS	IKKNLIGALL	FDSGETAEAT	RLKRTARRRY
TRRKNRILYL	QEIFSNE MAK	VDDSFFHRLE	ESFLVEEDKK
HERHPIFGNI	VDEVAYHEKY	PTIYHLRKKL	VDSTDKADLR
LIYLALAHMI	KFRGHFLIEG	DLNPDNSDVD	KLFIQLVQTY
NQLFEENPIN	ASGVDAKAIL	SARLSKSRRL	ENLIAQLPGE
KKNGLFGNLI	ALSLGLTPNF	KSNFDLAEDA	KLQLSKDTYD

DDLNDLLAQI	GDQYADLFLA	AKNLSDAILL	SDILRVNTEI
TKAPLSASMI	KRYDEHHQDL	TLLKALVRQQ	LPEKYKEIFF
DQSKNGYAGY	IDGGASQEEF	YKFIKPILEK	MDGTEELLVK
LNREDLLRKQ	RTFDNGSIPH	QIHLGELHAI	LRRQEDFYPF
LKDNREKIEK	ILTFRIPYYV	GPLARGNSRF	AWMTRKSEET
ITPWNFEEVV	DKGASAQSF	ERMTNFDKNL	PNEKVLPKHS
LLYEYFTVYN	ELTKVKYVTE	GMRKPAFLSG	EQKKAIVDLL
FKTNRKVTVK	QLKEDYFKKI	EEFDSVEISG	VEDRFNASLG
TYHDLLKIIK	DKDFLDNEEN	EDILEDIVLT	LTLFEDREMI
EERLKTYAHL	FDDKVMKQLK	RRRYTGWGRL	SRKLINGIRD
KQSGKTILDF	LKSDGFANRN	FMQLIHDDSL	TFKEDIQKAQ
VSGQGDSLHE	HIANLAGSPA	IKKGILQTVK	VVDELVKVMG
RHKPENIVIE	MARENQTTQK	GQKNSRERMK	RIEEGIKELG
SQILKEHPVE	NTQLQNEKLY	LYYLQNGRDM	YVDQEELDINR
LSDYDVDHIV	PQSFLKDDSI	DNKVLTRSDK	NRGKSDNVPS
EEVVKKMKNY	WRQLLNAKLI	TQRKFDNLTK	AERGGLSELD
KAGFIKRQLV	ETRQITKHVA	QILDSRMNTK	YDENDKLIRE
VKVITLKSKL	VSDFRKDFQF	YKVREINNYH	HAHDAYLNAV
VGTAIIKKYP	KLESEFVYGD	YKVYDVRKMI	AKSEQEIGKA
TAKYFFYSNI	MNFFKTEITL	ANGEIRKRPL	IETNGETGEI
VWDKGRDFAT	VRKVLSPQV	NIVKKTEVQT	GGFSKESILP
KRNSDKLIAR	KKDWDPPKYG	GFDSPTVAYS	VLVVAKVEKG
KSKKLKSVKE	LLGITIMERS	SFEKNPIDFL	EAKGYKEVKK
DLIIKLPKYS	LFELNGRKR	MLASAGELQK	GNELALPSKY
VNFLYLASHY	EKLKGSPEDN	EQKQLFVEQH	KHYLDEIIHQ
ISEFSKRVL	ADANLDKVLS	AYNKHRDKPI	REQAENIIHL
FTLTNLGAPA	AFKYFDTTID	RKRYTSTKEV	LDATLIHQSI
TGLYETRIDL	SQLGGDSRAD	PKKKRKVHHH	HHH
[0406] iProt106519 (SEQ ID NO: 235):			
MGSSHHHHHH	HHENLYFQGS	MDKKYSIGLD	IGTNSVGWAV

ITDEYKVPSK	KFKVLGNTDR	HSIKKNLIGA	LLFDSGETAE
ATRLKRTARR	RYTRRKNRIC	YLQEIFSNE	AKVDDSSFFHR
LEESFLVEED	KKHERHPIFG	NIVDEVAYHE	KYPTIYHLRK
KLVDSTDKAD	LRLIYLALAH	MIKFRGHFLI	EGDLNPDNSD
VDKLFIQLVQ	TYNQLFEENP	INASGVDAKA	ILSARLSKSR
RLENLIAQLP	GEKKNGLFGN	LIALSLGLTP	NFKSNFDLAE
DAKLQLSKDT	YDDDLDNLLA	QIGDQYADLF	LAAKNLSDAI
LLSDILRVNT	EITKAPLSAS	MIKRYDEHHQ	DLTLLKALVR
QQLPEKYKEI	FFDQSKNGYA	GYIDGGASQE	EFYKFIKPIL
EKMDGTEELL	VKLNREDLLR	KQRTFDNGSI	PHQIHLGELH
AILRRQEDFY	PFLKDNREKI	EKILTFRIPY	YVGPLARGNS
RFAWMTRKSE	ETITPWNFEE	VVDKGASAQ	FIERMTNFDK
NLPNEKVLPK	HSLLYEYFTV	YNELTKVKYV	TEGMRKPAFL
SGEQKKAIVD	LLFKTNRKVT	VKQLKEDYFK	KIECFDSVEI
SGVEDRFNAS	LGTYHDLLKI	IKDKDFLDNE	ENEDILEDIV
LTLTLFEDRE	MIEERLKTYA	HLFDDKVMKQ	LKRRRYTGWG
RLSRKLINGI	RDKQSGKTIL	DFLKSDGFAN	RNFMQLIHDD
SLTFKEDIQK	AQVSGQGDSL	HEHIANLAGS	PAIKKGILQT
VKVVDLVKV	MGRHKPENIV	IEMARENQTT	QKGQKNSRER
MKRIEEGIKE	LGSQILKEHP	VENTQLQNEK	LYLYYLQNGR
DMYVDQELDI	NRLSDYVDH	IVPQSFLKDD	SIDNKVLTRS
DKNRGKSDNV	PSEEVVKKMK	NYWRQLLNAK	LITQRKFDNL
TKAERGGLSE	LDKAGFIKRQ	LVETRQITKH	VAQILDSRMN
TKYDENDKLI	REVKVITLKS	KLVSDFRKDF	QFYKVVREINN
YHHAHDAYLN	AVVGTAIIKK	YPKLESEFVY	GDYKVYDVRK
MIAKSEQEIG	KATAKYFFYS	NIMNFFKTEI	TLANGEIRKR
PLIETNGETG	EIVWDKGRDF	ATVRKVL SMP	QVNIVKKTEV
QTGGFSKESI	LPKRNSDKLI	ARKKDWD PPK	YGGFDSPTVA
YSVLVVAKVE	KGKSKKLKSV	KELLGITIME	RSSF EKNPID
FLEAKGYKEV	KKDLIIKLPK	YSLFELENGR	KRMLASAGEL

QKGNELALPS KYVNFLYLAS HYEKLKGSPE DNEQKQLFVE
 QHKHYLDEII EQISEFSKRV ILADANLDKV LSAYNKHRDK
 PIREQAENII HLFTLTNLGA PAAFKYFDTT IDRKYRSTK
 EVLDATLIHQ SITGLYETRI DLSQLGGDGG GSPKKKRKV

[0407] iProt106520 (SEQ ID NO: 236):

MAHHHHHHGG SPKKKRKVDK KYSIGLDIGT NSVGWAVITD
 EYKVPSKKFK VLGNTDRHSI KKNLIGALLF DSGETAEATR
 LKRTARRRYT RRKNRICYLQ EIFSNEMAKV DDSFFHRLEE
 SFLVEEDKKH ERHPIFGNIV DEVAYHEKYP TIYHLRKKLV
 DSTDKADLRL IYLALAHMIK FRGHFLIEGD LNPDNSDVVK
 LFIQLVQTYN QLFEENPINA SGVDAKAILS ARLSKSRRLE
 NLIAQLPGEK KNGLFGNLIA LSLGLTPNFK SNFDLAEDAK
 LQLSKDTYDD DLDNLLAQIG DQYADLFLAA KNLSDAILLS
 DILRVNTEIT KAPLSASMIK RYDEHHQDLT LLKALVRQQL
 PEKYKEIFFD QSKNGYAGYI DGGASQEEFY KFIKPILEKM
 DGTEELLVKL NREDLLRKQR TFDNGSIPHQ IHLGELHAIL
 RRQEDFYFPL KDNREKIEKI LTFRIPYYVG PLARGNSRFA
 WMTRKSEETI TPWNFEEVVD KGASAQSFIE RMTNFDKNLP
 NEKVLPKHSL LYEYFTVYNE LTKVKYVTEG MRKPAFLSGE
 QKKAIVDLLF KTNRKVTVKQ LKEDYFKKIE CFDSVEISGV
 EDRFNASLGT YHDLLKIIKD KDFLDNEENE DILEDIVLTL
 TLFEDREMIE ERLKTYAHLF DDKVMKQLKR RRYTGWGRLS
 RKLINGIRDK QSGKTILDFL KSDGFANRNF MQLIHDDSLT
 FKEDIQKAQV SGQGDSLHEH IANLAGSPAI KKGILQTVKV
 VDELVKVMGR HKPENIVIEH ARENQTTQKG QKNSRERMKR
 IEEGIKELGS QILKEHPVEN TQLQNEKLYL YYLQNGRDMY
 VDQELDINRL SDYDVDHIVP QSFLKDDSID NKVLTRSDKN
 RGKSDNVPSE EVVKKMKNYW RQLLNAKLIT QRKFDNLTKA
 ERGGLSELDK AGFIKRQLVE TRQITKHVAQ ILDSRMNTKY
 DENDKLIREV KVITLKSCLV SDFRKDFQFY KVREINNYHH

AHDAYLNAV	GTALIKKYPK	LESEFVYGDY	KVYDVRKMIA
KSEQEIGKAT	AKYFFYSNIM	NFFKTEITLA	NGEIRKRPLI
ETNGETGEIV	WDKGRDFATV	RKVLSPQVN	IVKKTEVQTG
GFSKESILPK	RNSDKLIARK	KDWDPPKKYGG	FDSPTVAYSV
LVVAKVEKGK	SKKLKSVKEL	LGITIMERSS	FEKNPIDFLE
AKGYKEVKKD	LIKLPKYSL	FELENGRKRM	LASAGELQKG
NELALPSKYV	NFLYLASHYE	KLKGSPEDNE	QKQLFVEQHK
HYLDEIIEQI	SEFSKRVILA	DANLDKVLSA	YNKHRDKPIR
EQAENIIHLF	TLTNLGAPAA	FKYFDTTIDR	KRYTSTKEVL
DATLIHQSI GLYETRIDL QLGGDSRADP KKKRKV			

[0408] iProt106521 (SEQ ID NO: 237):

MAPKKKRKVD	KKYSIGLDIG	TNSVGWAVIT	DEYKVPSKKF
KVLGNTDRHS	IKKNLIGALL	FDSGETAEAT	RLKRTARRRY
TRRKNRICYL	QEIFSNEAMK	VDDSFHRL	ESFLVEEDKK
HERHPIFGNI	VDEVAYHEKY	PTIYHLRKKL	VDSTDKADLR
LIYLALAHMI	KFRGHFLIEG	DLNPDNSDVD	KLFIQLVQTY
NQLFEENPIN	ASGVDAKAIL	SARLSKSRRL	ENLIAQLPGE
KKNGLFGNLI	ALSLGLTPNF	KSNFDLAEDA	KLQLSKDTYD
DDLNDLLAQI	GDQYADFLA	AKNLSDAILL	SDILRVNTEI
TKAPLSASMI	KRYDEHHQDL	TLLKALVRQQ	LPEKYKEIFF
DQSKNGYAGY	IDGGASQEEF	YKFIKPILEK	MDGTEELLVK
LNREDLLRKQ	RTFDNGSIPH	QIHLGELHAI	LRRQEDFYFP
LKDNREKIEK	ILTFRIPYYV	GPLARGNSRF	AWMTRKSEET
ITPWNFEEVV	DKGASAQSF	ERMTNFDKNL	PNEKVLPHKS
LLYEYFTVYN	ELTKVKYVTE	GMRKPAFLSG	EQKKAIVDLL
FKTNRKVTVK	QLKEDYFKKI	ECFDSVEISG	VEDRFNASLG
TYHDLLKIIK	DKDFLDNEEN	EDILEDIVLT	LTLFEDREMI
EERLKTYAHL	FDDKVMKQLK	RRRYTGWGRL	SRKLINGIRD
KQSGKTILDF	LKSDGFANRN	FMQLIHDDSL	TFKEDIQKAQ
VSGQGDSLHE	HIANLAGSPA	IKKGILQTVK	VVDELVKVMG

RHKPENIVIE	MARENQTTQK	GQKNSRERMK	RIEEGIKELG
SQILKEHPVE	NTQLQNEKLY	LYYLQNGRDM	YVDQEELDINR
LSDYDVDHIV	PQSFLKDDSI	DNKVLTRSDK	NRGKSDNVPS
EEVVKKMKNY	WRQLLNAKLI	TQRKFDNLTK	AERGGLSELD
KAGFIKRQLV	ETRQITKHVA	QILDSRMNTK	YDENDKLIRE
VKVITLKSKL	VSDFRKDFQF	YKVREINNYH	HAHDAYLNAV
VGTAIIKKYP	KLESEFVYGD	YKVYDVRKMI	AKSEQEIGKA
TAKYFFYSNI	MNFFKTEITL	ANGEIRKRPL	IETNGETGEI
VWDKGRDFAT	VRKVLSPQV	NIVKKTEVQT	GGFSKESILP
KRNSDKLIAR	KKDWDPPKYG	GFDSPVAYS	VLVVAKVEKG
KSKKLKSVKE	LLGITIMERS	SFEKNPIDFL	EAKGYKEVKK
DLIIKLPKYS	LFELNGRKR	MLASAGELQK	GNELALPSKY
VNFLYLASHY	EKLKGSPEDN	EQKQLFVEQH	KHYLDEIIEQ
ISEFSKRVL	ADANLDKVLS	AYNKHRDKPI	REQAENIIHL
FTLTNLGAPA	AFKYFDTTID	RKRYTSTKEV	LDATLIHQSI
TGLYETRIDL	SQLGGDSRAD	HHHHHH	

[0409] iProt106522 (SEQ ID NO: 238):

MAHHHHHHGG	SDKKYSIGLD	IGTNSVGWAV	ITDEYKVPSK
KFKVLGNTDR	HSIKKNLIGA	LLFDSGETAE	ATRLKRTARR
RYTRRKNRIC	YLQEIFSNE	AKVDDSFHR	LEESFLVEED
KKHERHPIFG	NIVDEVAYHE	KYPTIYHLRK	KLVDSTDKAD
LRLIYLALAH	MIKFRGHFLI	EGDLNPDNSD	VDKLFIQLVQ
TYNQLFEENP	INASGVDAKA	ILSARLSKSR	RLENLIAQLP
GEKKNGLFGN	LIALSLGLTP	NFKSNFDLAE	DAKLQLSKDT
YDDDLNLLA	QIGDQYADLF	LAAKNLSDAI	LLSDILRVNT
EITKAPLSAS	MIKRYDEHHQ	DLTLLKALVR	QQLPEKYKEI
FFDQSKNGYA	GYIDGGASQE	EFYKFIKPIL	EKMDGTEELL
VKLNREDLLR	KQRTFDNGSI	PHQIHLGELH	AILRRQEDFY
PFLKDNREKI	EKILTFRIPY	YVGPLARGNS	RFAWMTRKSE
ETITPWNFEE	VVDKGASAQS	FIERMTNFDK	NLPNEKVLPK

HSLLEYEFTV	YNELTKVKYV	TEGMRKPAFL	SGEQKKAIVD
LLFKTNRKVT	VKQLKEDYFK	KIECFDSVEI	SGVEDRFRNAS
LGTYHDLLEKI	IKDKDFLDNE	ENEDILEDIV	LTLTLFEDRE
MIEERLKTYA	HLFDDKVMKQ	LKRRRYTGWG	RLSRKLINGI
RDKQSGKTIL	DFLKSDGFAN	RNFMQLIHDD	SLTFKEDIQK
AQVSGQGDSL	HEHIANLAGS	PAIKKGILQT	VKVVDELVKV
MGRHKPENIV	IEMARENQTT	QKGQKNSRER	MKRIEEGIKE
LGSQILKEHP	VENTQLQNEK	LYLYYLQNGR	DMYVDQELDI
NRLSDYDVDH	IVPQSFLKDD	SIDNKVLTRS	DKNRGKSDNV
PSEEVVKMK	NYWRQLLNAK	LITQRKFDNL	TKAERGGLSE
LDKAGFIKRQ	LVETRQITKH	VAQILDSRMN	TKYDENDKLI
REVKVITLKS	KLVSDFRKDF	QFYKVDREIN	YHHAHDAYLN
AVVGTAIIKK	YPKLESEFVY	GDYKVYDVRK	MIAKSEQEIG
KATAKYFFYS	NIMNFFKTEI	TLANGEIRKR	PLIETNGETG
EIVWDKGRDF	ATVRKVLSP	QVNIVKKTEV	QTGGFSKESI
LPKRNSDKLI	ARKKDWDPPK	YGGFDSPTVA	YSVLVVAKVE
KGKSKKLKSV	KELLGITIME	RSSFENPID	FLEAKGYKEV
KKDLIIKLPK	YSLFELENGR	KRMLASAGEL	QKGNELALPS
KYVNFLYLAS	HYEKLKGSPE	DNEQKQLFVE	QHKHYLDEII
EQISEFSKRV	ILADANLDKV	LSAYNKHRDK	PIREQAENII
HLFTLTNLGA	PAAFKYFDTT	IDRKRYTSTK	EVLDATLIHQ
SITGLYETRI DLSQLGGDSR ADPKKKRKV			

[0410] iProt106658 (SEQ ID NO: 239):

MGSSHHHHHH	HHENLYFQGS	MDKKYSIGLD	IGTNSVGWAV
ITDEYKVPSK	KFKVLGNTDR	HSIKKNLIGA	LLFDSGETAE
ATRLKRTARR	RYTRRKNRIC	YLQEIFSDEM	AKVDDSSFFHR
LEESFLVEED	KKHERHPIFG	NIVDEVAYHE	KYPTIYHLRK
KLVDSTDKAD	LRLIYLALAH	MIKFRGHFLI	EGDLNPDNSD
VDKLFIQLVQ	TYNQLFEENP	INASGVDAKA	ILSARLSKSR
RLENLIAQLP	GEKKNGLFGN	LIALSLGLTP	NFKSNFDLAE

DAKLQLSKDT	YDDDLNLLA	QIGDQYADLF	LAAKNLSDAI
LLSDILRVNT	EITKAPLSAS	MIKRYDEHHQ	DLTLLKALVR
QQLPEKYKEI	FFDQSKNGYA	GYIDGGASQE	EFYKFIKPIL
EKMDGTEELL	VKLNREDLLR	KQRTFDNGSI	PHQIHLGELH
AILRRQEDFY	PFLKDNREKI	EKILTFRIPY	YVGPLARGNS
RFAWMTRKSE	ETITPWNFEE	VVDKGASAQS	FIERMTNFDK
NLPNEKVLPK	HSLLYEYFTV	YNELTKVKYV	TEGMRKPAFL
SGEQKKAIVD	LLFKTNRKVT	VKQLKEDYFK	KIECFDSVEI
SGVEDRFNAS	LGTYHDLLKI	IKDKDFLDNE	ENEDILEDIV
LTTLTFEDRE	MIEERLKTYA	HLFDDKVMKQ	LKRRRYTGWG
RLSRKLINGI	RDKQSGKTIL	DFLKSDGFAN	RNFMQLIHDD
SLTFKEDIQK	AQVSGQGDSL	HEHIANLAGS	PAIKKGILQT
VKVVDDELVKV	MGRHKPENIV	IEMARENQTT	QKGQKNSRER
MKRIEEGIKE	LGSQILKEHP	VENTQLQNEK	LYLYYLQNGR
DMYVDQELDI	NRLSDYDVDH	IVPQSFLKDD	SIDNKVLTRS
DKNRGKSDNV	PSEEVVKKMK	NYWRQLLNAK	LITQRKFDNL
TKAERGGLSE	LDKAGFIKRQ	LVETRQITKH	VAQILDSRMN
TKYDENDKLI	REVKVITLKS	KLVSDFRKDF	QFYKVREINN
YHHAHDAYLN	AVVGTAIIKK	YPKLESEFVY	GDYKVYDVRK
MIAKSEQEIG	KATAKYFFYS	NIMNFFKTEI	TLANGEIRKR
PLIETNGETG	EIVWDKGRDF	ATVRKVL SMP	QVNIVKKTEV
QTGGFSKESI	LPKRNSDKLI	ARKKDWDPKK	YGGFDSPTVA
YSVLVVAKVE	KGKSKKLKSV	KELLGITIME	RSSF EKNPID
FLEAKGYKEV	KKDLIIKLPK	YSLFELENGR	KRMLASAGEL
QKGNELALPS	KYVNFLYLAS	HYEKLKGSPE	DNEQKQLFVE
QHKHYLDEII	EQISEFSKRV	ILADANLDKV	LSAYNKHRDK
PIREQAENII	HLFTLTNLGA	PAAFKYFDTT	IDRKRYTSTK
EVLDATLIHQ SITGLYETRI DLSQLGGDGG GSPKKKRKV			

[0411] iProt106745 (SEQ ID NO: 240):

MAPKKKRKVD	KKYSIGLDIG	TNSVGWAVIT	DEYKVPSKKF

KVLGNTDRHS	IKKNLIGALL	FDSGETAEAT	RLKRTARRRY
TRRKNRICYL	QEIFSNE MAK	VDDSFFHRLE	ESFLVEEDKK
HERHPIFGNI	VDEVAYHEKY	PTIYHLRKKL	VDSTDKADLR
LIYLALAHMI	KFRGHFLIEG	DLNPDNSDVD	KLFIQLVQTY
NQLFEENPIN	ASGVDAKAIL	SARLSKSRRL	ENLIAQLPGE
KKNGLFGNLI	ALSLGLTPNF	KSNFDLAEDA	KLQLSKDTYD
DDL DNLLAQI	GDQYADLFLA	AKNLSDAILL	SDILRVNTEI
TKAPLSASMI	KRYDEHHQDL	TLLKALVRQQ	LPEKYKEIFF
DQSKNGYAGY	IDGGASQEEF	YKFIKPILEK	MDGTEELLVK
LNREDLLRKQ	RTFDNGSIPH	QIHLGELHAI	LRRQEDFY PF
LKDNREKIEK	ILTFRIPYYV	GPLARGNSRF	AWMTRKSEET
ITPWNFEEVV	DKGASAQ SFI	ERMTNFDKNL	PNEKVL PKHS
LLYEYFTVYN	ELTKVKYVTE	GMRKPAFLSG	EQKKAIVDLL
FKTNRKVTVK	QLKEDYFKKI	ECFDSVEISG	VEDRFNASLG
TYHDLLKIIK	DKDFLDNEEN	EDILEDIVLT	LTLFEDREMI
EERLKTYAHL	FDDKVMKQLK	RRRYTGWGRL	SRKLINGIRD
KQSGKTILDF	LKSDGFANRN	FMQLIHDDSL	TFKEDIQKAQ
VSGQGDSLHE	HIANLAGSPA	IKKGILQTVK	VVDELVKVMG
RHKPENIVIE	MARENQTTQK	GQKNSRERMK	RIEEGIKELG
SQILKEHPVE	NTQLQNEKLY	LYYLQNGRDM	YVDQELDINR
LSDYDVDHIV	PQSFLKDDSI	DNAVLTRSDK	NRGKSDNVPS
EEVVKKMKNY	WRQLLNAKLI	TQRKFDNLTK	AERGGLSELD
KAGFIKRQLV	ETRQITKHVA	QILDSRMNTK	YDENDKLIRE
VKVITLKSKL	VSDFRKDFQF	YKVREINNYH	HAHDAYLNAV
VG TALIKKYP	KLESEFVYGD	YKVYDVRKMI	AKSEQEIGKA
TAKYFFYSNI	MNFFKTEITL	ANGEIRKRPL	IETNGETGEI
VWDKGRDFAT	VRKVL SMPQV	NIVKKTEVQT	GGFSKESILP
KRNSDKLIAR	KKDWD PKKYG	GFDSPTVAYS	VLVVAKVEKG
KSKKLKSVKE	LLGITIMERS	SFEKNPIDFL	EAKGYKEVKK
DLI IKLPKYS	LFEL ENGRKR	MLASAGELQK	GNELALPSKY

VNFLYLASHY	EKLKGSPEDN	EQKQLFVEQH	KHYLDEIIEQ
ISEFSKRVIL	ADANLDKVLS	AYNKHRDKPI	REQAENIIHL
FTLTNLGAPA	AFKYFDTTID	RKRYTSTKEV	LDATLIHQSI
TGLYETRIDL	SQLGGDSRAD	PKKKRKVHHH	HHH

[0412] iProt106746 (SEQ ID NO: 241):

MAPKKKRKVD	KKYSIGLDIG	TNSVGWAVIT	DEYKVPSKKF
KVLGNTDRHS	IKKNLIGALL	FDSGETAEAT	RLKRTARRRY
TRRKNRICYL	QEIFSNEMAK	VDDSFFHRLE	ESFLVEEDKK
HERHPIFGNI	VDEVAYHEKY	PTIYHLRKKL	VDSTDKADLR
LIYLALAHMI	KFRGHFLIEG	DLNPDNSDVD	KLFIQLVQTY
NQLFEENPIN	ASGVDAKAIL	SARLSKSRRL	ENLIAQLPGE
KKNGLFGNLI	ALSLGLTPNF	KSNFDLAEDA	KLQLSKDTYD
DDLDNLLAQI	GDQYADLFLA	AKNLSDAILL	SDILRVNTEI
TKAPLSASMI	KRYDEHHQDL	TLLKALVRQQ	LPEKYKEIFF
DQSKNGYAGY	IDGGASQEEF	YKFIKPILEK	MDGTEELLVK
LNREDLLRKQ	RTFDNGSIPH	QIHLGELHAI	LRRQEDFYPF
LKDNREKIEK	ILTFRIPYYV	GPLARGNSRF	AWMTRKSEET
ITPWNFEEVV	DKGASAQSF	ERMTNFDKNL	PNEKVLPKHS
LLYEYFTVYN	ELTKVKYVTE	GMRKPAFLSG	EQKKAIVDLL
FKTNRKVTVK	QLKEDYFKKI	ECFDSVEISG	VEDRFNASLG
TYHDLLKIIK	DKDFLDNEEN	EDILEDIVLT	LTLFEDREMI
EERLKTYAHL	FDDKVMKQLK	RRRYTGWGRL	SRKLINGIRD
KQSGKTILDF	LKSDGFANRN	FMQLIHDDSL	TFKEDIQKAQ
VSGQGDSLHE	HIANLAGSPA	IKKGILQTVK	VVDELVKVMG
RHKPENIVIE	MARENQTTQK	GQKNSRERMK	RIEEGIKELG
SQILKEHPVE	NTQLQNEALY	LYYLQNGRDM	YVDQELDINR
LSDYDVDHIV	PQSFLKDDSI	DNKVLTRSDK	NRGKSDNVPS
EEVVKKMKNY	WRQLLNAKLI	TQRKFDNLTK	AERGGLSELD
KAGFIKRQLV	ETRQITKHVA	QILDSRMNTK	YDENDKLIRE
VKVITLKSKL	VSDFRKDFQF	YKVREINNYH	HAHDAYLNAV

VGTAIIKKYP	ALESEFVYGD	YKVYDVRKMI	AKSEQEIGKA
TAKYFFYSNI	MNFFKTEITL	ANGEIRKAPL	IETNGETGEI
VWDKGRDFAT	VRKVLSPQV	NIVKKTEVQT	GGFSKESILP
KRNSDKLIAR	KKDWDPPKYG	GFDSPVAYS	VLVVAKEVG
KSKKLKSVKE	LLGITIMERS	SFEKNPIDFL	EAKGYKEVKK
DLIIKLPKYS	LFELNGRKR	MLASAGELQK	GNELALPSKY
VNFLYLASHY	EKLKGSPEDN	EQKQLFVEQH	KHYLDEIIEQ
ISEFSKRVIL	ADANLDKVLS	AYNKHDKPI	REQAENIIHL
FTLTNLGAPA	AFKYFDTTID	RKRYTSTKEV	LDATLIHQSI
TGLYETRIDL SQLGGDSRAD PKKKRKVHHH HHH			

[0413] iProt106747 (SEQ ID NO: 242):

MAPKKKRKVD	KKYSIGLDIG	TNSVGWAVIT	DEYKVPSKKF
KVLGNTDRHS	IKKNLIGALL	FDSGETAEAT	RLKRTARRRY
TRRKNRICYL	QEIFSNEAMK	VDDSFHRL	ESFLVEEDKK
HERHPIFGNI	VDEVAYHEKY	PTIYHLRKKL	VDSTDKADLR
LIYLALAHMI	KFRGHFLIEG	DLNPDNSDVD	KLFIQLVQTY
NQLFEENPIN	ASGVDAKAIL	SARLSKSRRL	ENLIAQLPGE
KKNGLFGNLI	ALSLGLTPNF	KSNFDLAEDA	KLQLSKDTYD
DDLNDLLAQI	GDQYADFLA	AKNLSDAILL	SDILRVNTEI
TKAPLSASMI	KRYDEHHQDL	TLLKALVRQQ	LPEKYKEIFF
DQSKNGYAGY	IDGGASQEEF	YKFIKPILEK	MDGTEELLVK
LNREDLLRKQ	RTFDNGSIPH	QIHLGELHAI	LRRQEDFYPF
LKDNREKIEK	ILTFRIPIYV	GPLARGNSRF	AWMTRKSEET
ITPWNFEEVV	DKGASAQSF	ERMTNFDKNL	PNEKVLPHKS
LLYEYFTVYN	ELTKVKYVTE	GMRKPAFLSG	EQKKAIVDLL
FKTNRKVTVK	QLKEDYFKKI	ECFDSVEISG	VEDRFNASLG
TYHDLLKIIK	DKDFLDNEEN	EDILEDIVLT	LTLFEDREMI
EERLKTYAHL	FDDKVMKQLK	RRRYTGWGRL	SRKLINGIRD
KQSGKTILDF	LKSDGFANRN	FMQLIHDDSL	TFKEDIQKAQ
VSGQGDSLHE	HIANLAGSPA	IKKGILQTVK	VVDELVKVMG

RHKPENIVIE	MARENQTTQK	GQKNSRERMK	RIEEGIKELG
SQILKEHPVE	NTQLQNEKLY	LYYLQNGRDM	YVDQELDINR
LSDYDVDHIV	PQSFLADDSI	DNKVLTRSDK	NRGKSDNVPS
EEVVKKMKNY	WRQLLNAKLI	TQRKFDNLTK	AERGGLSELD
KAGFIKRQLV	ETRQITKHVA	QILDSRMNTK	YDENDKLIRE
VKVITLKSKL	VSDFRKDFQF	YKVREINNYH	HAHDAYLNAV
VGTAIIKKYP	ALESEFVYGD	YKVYDVRKMI	AKSEQEIGKA
TAKYFFYSNI	MNFFKTEITL	ANGEIRKAPL	IETNGETGEI
VWDKGRDFAT	VRKVLSPQV	NIVKKTEVQT	GGFSKESILP
KRNSDKLIAR	KKDWDPPKYG	GFDSPVAYS	VLVVAKVEKG
KSKKLKSVKE	LLGITIMERS	SFEKNPIDFL	EAKGYKEVKK
DLIIKLPKYS	LFELNGRKR	MLASAGELQK	GNELALPSKY
VNFLYLASHY	EKLKGSPEDN	EQKQLFVEQH	KHYLDEIIEQ
ISEFSKRVL	ADANLDKVLS	AYNKHRDKPI	REQAENIIHL
FTLTNLGAPA	AFKYFDTTID	RKRYTSTKEV	LDATLIHQSI
TGLYETRIDL	SQLGGDSRAD	PKKKRKVHHH	HHH

[0414] iProt106884 (SEQ ID NO: 243):

MAPKKKRKVD	KKYSIGLDIG	TNSVGWAVIT	DEYKVPSKKF
KVLGNTDRHS	IKKNLIGALL	FDSGETAEAT	RLKRTARRRY
TRRKNRICYL	QEIFSNEMAK	VDDSFFHRLE	ESFLVEEDKK
HERHPIFGNI	VDEVAYHEKY	PTIYHLRKKL	VDSTDKADLR
LIYLALAHMI	KFRGHFLIEG	DLNPDNSDVD	KLFIQLVQTY
NQLFEENPIN	ASGVDAKAIL	SARLSKSRRL	ENLIAQLPGE
KKNGLFGNLI	ALSLGLTPNF	KSNFDLAEDA	KLQLSKDTYD
DDLDNLLAQI	GDQYADLFLA	AKNLSDAILL	SDILRVNTEI
TKAPLSASMI	KRYDEHHQDL	TLLKALVRQQ	LPEKYKEIFF
DQSKNGYAGY	IDGGASQEEF	YKFIKPILEK	MDGTEELLVK
LNREDLLRKQ	RTFDNGSIPH	QIHLGELHAI	LRRQEDFYPP
LKDNREKIEK	ILTFRIPIYYV	GPLARGNSRF	AWMTRKSEET
ITPWNFEEVV	DKGASAQSF	ERMTAFDKNL	PNEKVLPKHS

LLYEYFTVYN	ELTKVKYVTE	GMRKPAFLSG	EQKKAIVDLL
FKTNRKVTVK	QLKEDYFKKI	ECFDSVEISG	VEDRFNASLG
TYHDLLKIIK	DKDFLDNEEN	EDILEDIVLT	LTLFEDREMI
EERLKTYAHL	FDDKVMKQLK	RRRYTGWGAL	SRKLINGIRD
KQSGKTILDF	LKSDGFANRN	FMALIHDDSL	TFKEDIQKAQ
VSGQGDSLHE	HIANLAGSPA	IKKGILQTVK	VVDELVKVMG
RHKPENIVIE	MARENQTTQK	GQKNSRERMK	RIEEGIKELG
SQILKEHPVE	NTQLQNEKLY	LYYLQNGRDM	YVDQELDINR
LSDYDVDHIV	PQSFLKDDSI	DNKVLTRSDK	NRGKSDNVPS
EEVVKKMKNY	WRQLLNAKLI	TQRKFDNLTK	AERGGLSELD
KAGFIKRQLV	ETRAITKHVA	QILDSRMNTK	YDENDKLIRE
VKVITLKSCL	VSDFRKDFQF	YKVREINNYH	HAHDAYLNAV
VGTAIIKKYP	KLESEFVYGD	YKVYDVRKMI	AKSEQEIGKA
TAKYFFYSNI	MNFFKTEITL	ANGEIRKRPL	IETNGETGEI
VWDKGRDFAT	VRKVLSPQV	NIVKKTEVQT	GGFSKESILP
KRNSDKLIAR	KKDWDPPKYG	GFDSPVAYS	VLVVAKVEKG
KSKKLKSVKE	LLGITIMERS	SFEKNPIDFL	EAKGYKEVKK
DLIIKLPKYS	LFELNGRKR	MLASAGELQK	GNELALPSKY
VNPLYLASHY	EKLKGSPEDN	EQKQLFVEQH	KHYLDEIIEQ
ISEFSKRVIL	ADANLDKVLS	AYNKHRDKPI	REQAENIIHL
FTLTNLGAPA	AFKYFDTTID	RKRYTSTKEV	LDATLIHQSI
TGLYETRIDL	SQLGGDSRAD	PKKKRKVHHH	HHH

[0415] iProt 20109496 (SEQ ID NO: 244)

MAPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD
RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRILYLQEIFSN
EMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIY
HLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHAMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLF
IQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK
NGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQI
GDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQD

LTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL
 EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQED
 FYPFLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
 NFEEVVDKGASQAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNEL
 TKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKI
 EEFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLT
 LTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGI
 RDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQG
 DSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARE
 NQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYL
 YYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS
 DKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG
 GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVK
 VITLKSCLVSDFRKDFQFYKVDREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPK
 LESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITL
 ANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEV
 QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVA
 KVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK
 LPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLLASHYEK
 LKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLSA
 YNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV
 LDATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGDSRADHHHHHH

Ácidos Nucleicos que Codificam as Moléculas Cas9

[0416] Os ácidos nucleicos que codificam as moléculas Cas9, por exemplo, uma molécula Cas9 ativa ou uma molécula Cas9 inativa são aqui proporcionados.

[0417] Exemplos de ácidos nucleicos que codificam as moléculas Cas9 são descritos em Cong et al, SCIENCE 2013, 399(6121):819-823; Wang et al, CELL 2013, 153(4):910-918; Mali et al., SCIENCE 2013, 399(6121):823-826; Jinek et al, SCIENCE 2012, 337(6096):816-821.

[0418] Em uma modalidade, um ácido nucleico que codifica uma molécula Cas9 pode ser uma sequência de ácido nucleico sintética. Por exemplo, a molécula de ácido nucleico sintética pode ser quimicamente modificada, por exemplo, como descrito na Secção XIII. Em uma modalidade, o mRNA Cas9 tem uma ou mais de, por exemplo, todas as seguintes propriedades: é capped, poliadenilado, substituído com 5-metilcitidina e/ou pseudouridina.

[0419] Além disso ou alternativamente, a sequência de ácido nucleico sintética pode ser códons otimizados, por exemplo, pelo menos um códon não-comum ou códon menos comum que foi substituído por um códon comum. Por exemplo, o ácido nucleico sintético pode dirigir a síntese de um mRNA mensageiro otimizado, por exemplo, otimizado para expressão em um sistema de expressão de mamífero, por exemplo, aqui descrito.

[0420] Proporciona-se abaixo uma sequência exemplificativa de ácidos nucleicos codificada e otimizada codificando uma molécula Cas9 de *S. pyogenes*.

```
atggataaaa agtacagcat cgggctggac atcggtacaa actcagtggg gtgggccgtg    60
attacggacg agtacaaggt accctccaaa aaatttaaag tgctgggtaa cacggacaga    120
cactctataa agaaaaatct tattggagcc ttgctgttcg actcaggcga gacagccgaa    180
gccacaaggt tgaagcggac cgccaggagg cggtatacca ggagaaagaa ccgcatatgc
240
```

```
tacctgcaag aaatcttcag taacgagatg gcaaagggtg acgatatgctt ttccatcgc    300
ctggaagaat ccttcttgt tgaggaagac aagaagcacg aacggcaccc catctttggc    360
aatattgtcg acgaagtggc atatcacgaa aagtaccoga ctatctacca ctcaggaag    420
aagctggtgg actctaccga taaggcggac ctgagactta ttatttggc actcgcccac    480
atgattaaat ttagaggaca ttcttgatc gagggcgacc tgaaccgga caacagtgc    540
gtcgataagc tgtcatcca actgtgcag acctacaatc aactgttcga agaaaaccct    600
ataaatgctt caggagtcga cgctaaagca atcctgtccg cgcgcccttc aaaatctaga    660
agacttgaga atctgattgc tcagttgcc ggggaaaaga aaaatggatt gtttggaac    720
ctgatcgccc tcagtctcgg actgaccca aatttcaaaa gtaacttga cctggccgaa    780
gacgctaagc tccagctgtc caaggacaca tacgatgacg acctcgacaa tctgctggcc    840
```

cagattgggg atcagtacgc cgatctcttt ttggcagcaa agaacctgtc cgacgccatc 900
 ctgttgagcg atatcttgag agtgaacacc gaaattacta aagcaccctc tagcgcatct 960
 atgatcaagc ggtacgacga gcatcatcag gatctgaccc tgctgaaggc tctgtgagg 1020
 caacagctcc ccgaaaaata caaggaaatc ttcttgacc agagcaaaaa cggctacgct 1080
 ggctatatag atggtggggc cagtcaggag gaattctata aattcatcaa gccattctc 1140
 gagaaaatgg acggcacaga ggagttgctg gtcaaaacta acagggagga cctgctgcgg
 1200
 aagcagcggg cctttgacaa cgggtctatc cccaccaga ttcattctggg cgaactgcac 1260
 gcaatcctga ggaggcagga ggattttat cctttctta aagataaccg cgagaaaaata 1320
 gaaaagattc ttacattcag gatcccgta tacgtgggac ctctcgcccg gggcaattca 1380
 cggttgcct ggatgacaag gaagtcagag gagactatta caccttgaa cttcgaagaa 1440
 gtggtggaca aggggtgatc tgcccagtct ttcacgagc ggatgacaaa tttgacaag 1500
 aacctcccta atgagaaggt gctgcccata cattctctgc tctacgagta cttaccgtc 1560
 tacaatgaac tgactaaagt caagtacgtc accgagggaa tgaggaagcc ggcattcctt 1620
 agtgagaaac agaagaaggc gattgtagac ctgtgttca agaccaacag gaaggtgact 1680
 gtgaagcaac taaagaaga ctactttaag aagatcgaat gtttgacag tgtggaaatt 1740
 tcaggggttg aagaccgctt caatgcgtca ttggggactt accatgatct tctcaagatc 1800
 ataaaggaca aagacttctt ggacaacgaa gaaaatgagg atattctcga agacatcgtc 1860
 ctaccctga ccctgttga agacagggaa atgatagaag agcgcttga aacctatgcc 1920
 cacctcttcg acgataaagt tatgaagcag ctgaagcgca ggagatacac aggatgggga 1980
 agattgtcaa ggaagctgat caatggaatt agggataaac agagtggcaa gaccatactg 2040
 gatttcctca aatctgatgg ctctgccaat aggaacttca tgcaactgat tcacgatgac 2100
 tctcttacct tcaaggagga cattcaaaag gctcagggtga gcgggcaggg agactccctt 2160
 catgaacaca tcgcaaatg ggcagggtcc cccgctatta aaaagggcat cctcaaaact 2220
 gtcaagggtg tgatgaatt gtcaaggta atgggcagac ataagccaga aaatattgtg 2280
 atcgagatgg cccgcgaaaa ccagaccaca cagaagggcc agaaaaatag tagagagcgg
 2340
 atgaagagga tcgaggaggg catcaaagag ctgggatctc agattctcaa agaacacccc
 2400
 gtagaaaaca cacagctgca gaacgaaaaa ttgtacttgt actatctgca gaacggcaga 2460
 gacatgtacg tcgaccaaga acttgatatt aatagactgt ccgactatga cgtagacat 2520
 atcgtgcccc agtccttctt gaaggacgac tccattgata acaaagtctt gacaagaagc 2580
 gacaagaaca ggggtaaaag tgataatgtg cctagcgagg aggtggtgaa aaaaatgaag

2640

aactactggc gacagctgct taatgcaaag ctcatcac aacggaagtt cgataatctg 2700
 acgaaagcag agagaggtgg ctgtctgag ttggacaagg cagggtttat taagcggcag 2760
 ctggtggaaa ctaggcagat cacaagcac gtggcgcaga ttttgacag ccgatgaac 2820
 aaaaatacg acgaaatga taaactgata cgagaggta aagttatcac gctgaaaagc
 2880

aagctggtgt ccgatttctg gaaagacttc cagttctaca aagtcgcga gattaataac 2940
 taccatcatg ctacgatgc gtacctgaac gctgtgtcg ggaccgcctt gataaagaag 3000
 tacccaaagc tggaatccga gttcgtatc ggggattaca aagtgtacga tgtgaggaaa 3060
 atgatagcca agtccgagca ggagattgga aaggccacag ctaagtactt cttttattct 3120
 aacatcatga attttttaa gacggaaatt accctggcca acggagagat cagaaagcgg 3180
 ccccttatag agacaaatgg tgaaacaggt gaaatcgtct gggataaggg cagggatttc 3240
 gctactgtga ggaaggtgct gagtatgcc aaggtaaata tcgtgaaaaa aaccgaagta 3300
 cagaccggag gattttcaa ggaaagcatt ttgcctaaaa gaaactcaga caagctcatc 3360
 gccgcaaga aagattggga ccctaagaaa tacgggggat ttgactcacc caccgtagcc 3420
 tattctgtgc tgggtgtagc taaggtggaa aaaggaaagt ctaagaagct gaagtccgtg 3480
 aaggaactct tgggaatcac tatcatggaa agatcatcct ttgaaaagaa ccctatcgat 3540
 ttcttgagg ctaagggtta caaggaggtc aagaaagacc tcatcattaa actgccaaaa 3600
 tactctctct tcgagctgga aaatggcagg aagagaatgt tggccagcgc cggagagctg 3660
 caaaagggaa acgagcttgc tctgccctcc aaatatgtta atttctcta tctcgcttcc 3720
 cactatgaaa agctgaaagg gtctcccgaa gataacgagc agaagcagct gttcgtcgaa 3780
 cagcacaagc actatctgga tgaaataatc gaacaaataa gcgagttcag caaaagggtt 3840
 atcctggcgg atgctaattt ggacaaagta ctgtctgctt ataacaagca ccgggataag 3900
 cctattaggg aacaagccga gaatataatt cacctctta cactcacgaa tctcgagacc 3960
 cccgccgcct taaatactt tgatacgact atcgaccgga aacggtatc cagtaccaa 4020
 gaggtcctcg atgccaccct catccaccag tcaattactg gcctgtacga aacacggatc 4080
 gacctcttc aactgggcgg cgactag 4107

(SEQ ID NO: 222)

[0421] Proporciona-se abaixo uma sequência exemplificativa de ácidos nucleicos codificada e otimizada codificando uma molécula Cas9 incluindo SEQ ID NO: 244:

ATGGCTCCGAAGAAAAAGCGTAAAGTGGATAAAAAATACAGCATT

GGTCTGGACATTGGCACGAACTCAGTGGGTTGGGCGGTTCATCAC
GGATGAATATAAGGTCCCGTCAAAAAAGTTCAAAGTGCTGGGCAA
CACCGATCGCCATTTCGATTAAAAAGAATCTGATCGGCGCGCTGCT
GTTTGATAGCGGTGAAACCGCGGAAGCAACGCGTCTGAAACGTA
CCGCACGTCGCCGTTACACGCGCCGTAAAAATCGTATTCTGTATC
TGCAGGAAATCTTTAGCAACGAAATGGCGAAAGTTGATGACTCATT
TTTCCACCGCCTGGAAGAATCGTTTCTGGTCGAAGAAGACAAAAA
GCATGAACGTCACCCGATTTTCGGTAATATCGTTGATGAAGTCGC
GTACCATGAAAAATATCCGACGATTTACCATCTGCGTAAAAAACTG
GTGGATTCAACCGACAAAGCCGATCTGCGCCTGATTTACCTGGCA
CTGGCTCATATGATCAAATTTTCGTGGCCACTTCCTGATTGAAGGTG
ACCTGAACCCGGATAACTCTGACGTTGATAAGCTGTTTCATCCAGC
TGGTCCAAACCTATAATCAGCTGTTCTGAAGAAAACCCGATCAATG
CAAGTGGCGTTGATGCGAAGGCCATTCTGTCCGCTCGCCTGAGTA
AATCCCGCCGTCTGGAAAACCTGATTGCACAACTGCCGGGGCGAAA
AGAAAAACGGCCTGTTTGGTAATCTGATCGCTCTGTCACTGGGTC
TGACGCCGAACCTTTAAATCGAATTTTCGACCTGGCAGAAGATGCTA
AGCTGCAGCTGAGCAAAGATACCTACGATGACGATCTGGACAACC
TGCTGGCGCAAATTGGTGACCAGTATGCCGACCTGTTTCTGGCGG
CCAAAAATCTGTCAGATGCCATTCTGCTGTCTGGACATCCTGCGCG
TGAACACCGAAATCACGAAAGCGCCGCTGTCAGCCTCGATGATTA
AACGCTACGATGAACATCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCAC
TGGTTCGTCAGCAACTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATTTTCTTTGA
CCAATCTAAGAACGGCTATGCAGGTTACATCGATGGCGGTGCTAG
TCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAAATG
GATGGCACGGAAGAACTGCTGGTGAACTGAATCGTGAAGATCTG
CTGCGTAAACAACGCACCTTTGACAACGGCAGCATTCCGCATCAG
ATCCACCTGGGTGAACTGCATGCGATTCTGCGCCGTCAGGAAGAT
TTTTATCCGTTCTGAAAGACAACCGTGAAAAAATTGAAAAGATCC
TGACGTTTCGCATCCCGTATTACGTTGGCCCGCTGGCGCGTGGTA

ATAGCCGCTTCGCCTGGATGACCCGCAAATCTGAAGAAACCATTA
CGCCGTGGAACCTTTGAAGAAGTGGTTGATAAAGGTGCAAGCGCTC
AGTCTTTTATCGAACGTATGACCAATTTTCGATAAAAACCTGCCGAA
TGAAAAGGTCCTGCCGAAACATAGCCTGCTGTATGAATACTTTACC
GTGTACAACGAACTGACGAAAGTGAAGTATGTTACCGAAGGCATG
CGCAAACCGGCGTTTCTGTCTGGTGAACAGAAAAAAGCCATTGTG
GATCTGCTGTTCAAGACCAATCGTAAAGTTACGGTCAAACAGCTG
AAGGAAGATTACTTCAAAAAGATCGAAGAATTCGACAGCGTGGA
ATTTCTGGCGTTGAAGATCGTTTCAACGCCAGTCTGGGTACCTAT
CATGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGATTTTCTGGATAAC
GAAGAAAATGAAGACATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCCTGACG
CTGTTCTGAAGATCGTGAAATGATTGAAGAACGCCTGAAAACGTAC
GCACACCTGTTTGACGATAAAGTTATGAAGCAGCTGAAACGCCGT
CGCTATACCGGCTGGGGTCGTCTGTCTCGCAAACCTGATTAATGGC
ATCCGCGATAAGCAAAGTGGTAAAACGATTCTGGATTTCTGAAAT
CCGACGGCTTTGCCAACCGTAATTTTCATGCAGCTGATCCATGACG
ATAGTCTGACCTTTAAGGAAGACATTCAGAAAGCACAAGTGTCAG
GCCAGGGTGATTGCTGCATGAACACATTGCGAACCTGGCCGGC
TCCCCGGCTATTA AAAAGGGTATCCTGCAGACCGTCAAAGTCGTG
GATGAACTGGTGAAGGTTATGGGCCGTCACAAACCGGAAAACATT
GTGATCGAAATGGCGCGCGAAAATCAGACCACGCAAAAGGGTCA
GAAAAACTCACGTGAACGCATGAAGCGCATTGAAGAAGGCATCAA
AGAACTGGGTTCGCAGATTCTGAAAGAACATCCGGTTGAAAACAC
CCAGCTGCAAAATGAAAACTGTACCTGTATTACCTGCAAAATGGC
CGTGACATGTATGTCGATCAGGAACTGGACATCAACCGCCTGAGC
GACTATGATGTGACACATTGTGCCGCAGAGCTTTCTGAAGGAC
GATTCTATCGATAATAAAGTGCTGACCCGTTCTGATAAGAACCGC
GGTAAAAGCGACAATGTTCCGTCTGAAGAAGTTGTCAAAAAGATG
AAGAACTACTGGCGTCAACTGCTGAATGCGAAGCTGATTACGCAG
CGTAAATTCGATAACCTGACCAAGGCGGAACGCGGCGGTCTGAG

TGAACTGGATAAGGCCGGCTTTATCAAACGTCAACTGGTGGAAAC
CCGCCAGATTACGAAACATGTTGCCCAGATCCTGGATTCCCGCAT
GAACACGAAATATGACGAAAATGATAAGCTGATTTCGTGAAGTCAAA
GTGATCACCTGAAGAGTAAGCTGGTGTCCGATTTCCGTAAAGGAC
TTTCAGTTCTACAAAGTTCGCGAAATTAACAATTACCATCACGCAC
ACGATGCTTATCTGAATGCAGTGGTTGGCACCGCTCTGATCAAAA
AGTATCCGAAACTGGAAAGCGAATTTGTGTATGGTGATTACAAAGT
CTATGACGTGCGCAAGATGATTGCGAAAAGTGAACAGGAAATCGG
CAAGGCGACCGCCAAGTACTTTTTCTATTCCAACATCATGAACTTT
TTCAAGACCGAAATCACGCTGGCAAATGGCGAAATTCGTAAACGC
CCGCTGATCGAAACCAACGGCGAAACGGGTGAAATTGTGTGGGA
TAAAGGTCGTGACTTCGCGACCGTTCGCAAAGTCCTGTCAATGCC
GCAAGTGAATATCGTTAAAAAGACCGAAGTTCAGACGGGCGGTTT
TAGTAAAGAATCCATCCTGCCGAAGCGTAACTCGGATAAACTGATT
GCGCGCAAAAAGGATTGGGACCCGAAAAAGTACGGCGGTTTTGA
TAGTCCGACCGTTGCATATTCCGTCCTGGTCGTGGCTAAAGTTGA
AAAAGGCAAGAGTAAAAAGCTGAAGTCCGTCAAAGAACTGCTGGG
TATTACCATCATGGAACGTAGCTCTTTTGAAAAGAACCCGATTGAC
TTCCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGATCTGATT
ATCAAGCTGCCGAAATATTCGCTGTTCGAACTGGAAAACGGTCGT
AAACGCATGCTGGCAAGCGCTGGCGAACTGCAGAAGGGTAATGA
ACTGGCACTGCCGTCTAAATATGTGAACTTTCTGTACCTGGCTAG
CCATTATGAAAAACTGAAGGGTTCTCCGGAAGATAACGAACAGAA
GCAACTGTTTCGTTGAACAACATAAACACTACCTGGATGAAATCATC
GAACAGATCTCAGAATTCTCGAAACGCGTCATTCTGGCGGATGCC
AATCTGGACAAAGTGCTGAGCGCGTATAACAAGCATCGTGATAAA
CCGATTCGCGAACAGGCCGAAAATATTATCCACCTGTTTACCCTG
ACGAACCTGGGCGCACCGGCAGCTTTTAAATACTTCGATACCACG
ATCGACCGTAAGCGCTATACCAGCACGAAAGAAGTTCTGGATGCT
ACCCTGATTCATCAGTCAATCACCGGTCTGTATGAAACGCGTATTG

ACCTGAGCCAACTGGGCGGTGATAGCCGTGCCGACCATCACCAT
CACCATCACTAATAG (SEQ ID NO: 223)

[0422] Se as sequências de Cas9 acima são fundidas com um polipeptídeo ou peptídeo na extremidade C-terminal (por exemplo, uma Cas9 inativa fundida com um repressor de transcrição na extremidade C-terminal), entende-se que o códon de terminação irá ser removido.

[0423] São também aqui fornecidos ácidos nucleicos, vetores e células para a produção de uma molécula Cas9, por exemplo, uma molécula Cas9 aqui descrita. A produção recombinante de moléculas polipeptídicas pode ser realizada utilizando técnicas conhecidas de um perito na técnica. São aqui descritas moléculas e métodos para a produção recombinante de moléculas polipeptídicas, tais como moléculas Cas9, por exemplo, como aqui descritas. Tal como utilizado em ligação com isto, as moléculas de "recombinantes" e produção inclui todos os polipeptídeos (por exemplo, moléculas Cas9, por exemplo, tal como aqui descritas) que são preparadas, expressas, criadas ou isoladas por meios recombinantes, tais como polipeptídeos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcrômossômico para o ácido nucleico que codifica a molécula de interesse, um hibridoma preparado a partir dele, moléculas isoladas de uma célula hospedeira transformada para expressar a molécula, por exemplo, de um transfectoma, moléculas isoladas de uma biblioteca combinatória recombinante e moléculas preparadas, expressas, criadas ou isoladas por quaisquer outros meios que envolvem o *splicing* da totalidade ou de uma porção de um gene que codifica para a molécula (ou porção da mesma) para outras sequências de DNA. A produção recombinante pode ser a partir de uma célula hospedeira, por exemplo, uma célula hospedeira que compreende o ácido nucleico que codifica uma molécula aqui descrita, por exemplo, uma molécula Cas9, por exemplo, uma molécula Cas9 aqui descrita.

[0424] São aqui fornecidas moléculas de ácido nucleico que codificam uma molécula (por exemplo, molécula de Cas9 e/ou molécula de gRNA), por exemplo, tal como aqui descrito. São especificamente fornecidas moléculas de ácido nucleico compreendendo a sequência que codifica qualquer uma das SEQ ID NO: 233 a SEQ ID NO: 244, ou codifica um fragmento de qualquer uma de SEQ ID NO: 233 a SEQ ID NO: 244, ou codificando um polipeptídeo compreendendo pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% % ou pelo menos 99% de homologia de sequência com qualquer uma das SEQ ID NO: 233 a SEQ ID NO: 244.

[0425] São aqui fornecidos, por exemplo, como aqui descrito, compreendendo qualquer uma das moléculas de ácido nucleico acima descritas. Em modalidades, as referidas moléculas de ácido nucleico estão operativamente ligadas a um promotor, por exemplo, um promotor operável na célula hospedeira na qual o vetor é introduzido.

[0426] São aqui fornecidas células hospedeiras compreendendo uma ou mais moléculas de ácido nucleico e/ou vetores aqui descritos. Em modalidades, a célula hospedeira é uma célula hospedeira procariótica. Em modalidades, a célula hospedeira é uma célula hospedeira eucariótica. Em modalidades, a célula hospedeira é uma levedura ou célula E. coli. Em modalidades, a célula hospedeira é uma célula de mamífero, por exemplo, uma célula humana. Tais células hospedeiras podem ser utilizadas para a produção de uma molécula recombinante aqui descrita, por exemplo, uma molécula de Cas9 ou de gRNA, por exemplo, como aqui descrito.

VI. Análise Funcional de Moléculas Candidatas

[0427] As moléculas Cas9 candidatas, as moléculas candidatas de gRNA, os complexos candidatos de molécula Cas9/molécula de gRNA, podem ser avaliadas por métodos conhecidos na técnica ou como aqui

descrito. Por exemplo, os métodos exemplificativos para avaliar a atividade de endonuclease da molécula Cas9 são descritos, por exemplo, em Jinek et al, SCIENCE 2012; 337(6096):8 16-821.

VII. Ácidos Nucleicos Molde (para Introdução de Ácidos Nucleicos)

[0428] O termo "ácido nucleico molde" ou "molde dador", como aqui utilizado refere-se a um ácido nucleico a ser inserido na ou próximo da sequência-alvo que foi modificada, por exemplo, clivada, por um sistema CRISPR da presente invenção. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucleico na ou próximo da sequência-alvo é modificada para ter alguma ou toda a sequência do ácido nucleico molde, geralmente no(s) ou próximo do(s) sítio(s) de clivagem. Em uma modalidade, o ácido nucleico molde é de cadeia simples. Em uma modalidade alternativa, o ácido nucleico molde é de cadeia dupla. Em uma modalidade, o ácido nucleico molde é DNA, por exemplo, DNA de cadeia dupla. Em uma modalidade alternativa, o ácido nucleico molde é DNA de cadeia simples.

[0429] Em modalidades, o ácido nucleico molde compreende a sequência que codifica uma proteína globina, por exemplo, uma beta globina, por exemplo, compreende um gene da beta globina. Em uma modalidade, a beta globina codificada pelo ácido nucleico compreende uma ou mais mutações, por exemplo, mutações antifalcizantes. Em uma modalidade, a beta globina codificada pelo ácido nucleico compreende a mutação T87Q. Em uma modalidade, a beta globina codificada pelo ácido nucleico compreende a mutação G16D. Em uma modalidade, a beta globina codificada pelo ácido nucleico compreende a mutação E22A. Em uma modalidade, o gene da beta globina compreende as mutações G16D, E22A e T87Q. Em modalidades, o ácido nucleico molde compreende ainda um ou mais elementos reguladores, por exemplo, um promotor (por exemplo, um promotor da beta globina humana), um intensificador em 3', e/ou, pelo menos, uma porção de

uma região de controle do locus globina (por exemplo, um ou mais sítios de hipersensibilidade DNaseI (por exemplo, HS2, HS3 e/ou HS4 do locus da globina humana)).

[0430] Em outras modalidades, o ácido nucleico molde compreende uma sequência que codifica uma globina gama, por exemplo, compreende um gene da globina gama. Em modalidades, o ácido nucleico molde compreende uma sequência que codifica mais de uma cópia de uma proteína de globina gama, por exemplo, compreende duas ou mais, por exemplo, duas sequências do gene da globina gama. Em modalidades, o ácido nucleico molde compreende ainda um ou mais elementos reguladores, por exemplo, um promotor e/ou intensificador.

[0431] Em uma modalidade, o ácido nucleico molde altera a estrutura da posição alvo, participando em um evento de reparação dirigida por homologia. Em uma modalidade, o ácido nucleico molde altera a sequência da posição alvo. Em uma modalidade, o ácido nucleico molde resulta na incorporação de uma base modificada, ou que não ocorre naturalmente, no ácido nucleico alvo.

[0432] As mutações em um gene ou via aqui descritas podem ser corrigidas utilizando uma das abordagens aqui discutidas. Em uma modalidade, uma mutação em um gene ou via aqui descrita é corrigida por reparação dirigida por homologia (HDR) utilizando um ácido nucleico molde. Em uma modalidade, uma mutação em um gene ou via aqui descrita é corrigida por recombinação homóloga (HR) utilizando um ácido nucleico molde. Em uma modalidade, uma mutação em um gene ou via aqui descrita é corrigida por reparação de união de extremidade não-homóloga (NHEJ, do inglês "Non-Homologous End Joining") usando um ácido nucleico molde. Em outras modalidades, ácidos nucleicos que codificam moléculas de interesse podem ser inseridos em ou próximo de um sítio modificado por um sistema CRISPR da presente invenção. Em modalidades, o ácido nucleico molde compreende

elementos reguladores, por exemplo, um ou mais promotores e/ou intensificadores, ligados de forma operacional à sequência de ácido nucleico que codifica uma molécula de interesse, por exemplo, como aqui descrito.

Reparação por HDR ou HR e Ácidos Nucleicos Molde

[0433] Como aqui descrito, a reparação dirigida por homologia induzida por nucleases (HDR) ou recombinação homóloga (HR) pode ser utilizada para alterar uma sequência-alvo e corrigir (por exemplo, reparar ou editar) uma mutação no genoma. Apesar de não querer ficar limitado pela teoria, acredita-se que a alteração da sequência-alvo ocorre por reparação com base em um molde dado ou ácido nucleico molde. Por exemplo, o molde dado ou o ácido nucleico molde proporciona a alteração da sequência-alvo. Está contemplado que um plasmídeo dado ou molde de cadeia dupla linear pode ser utilizado como molde para recombinação homóloga. Está ainda contemplado que um molde dado de cadeia simples pode ser utilizado como molde para alteração da sequência-alvo por métodos alternados de reparação dirigida por homologia (por exemplo, anelamento da cadeia simples) entre a sequência-alvo e o molde dado. A alteração induzida pelo molde dado de uma sequência-alvo pode depender da clivagem por uma molécula Cas9. A clivagem por Cas9 pode compreender uma quebra de cadeia dupla, uma quebra de cadeia simples ou duas quebras de cadeia simples.

[0434] Em uma modalidade, uma mutação pode ser corrigida por uma única quebra de cadeia dupla ou duas quebras de cadeia simples. Em uma modalidade, uma mutação pode ser corrigida fornecendo um molde e um sistema CRISPR/Cas9 que cria (1) uma quebra de cadeia dupla, (2) duas quebras de cadeia simples, (3) duas quebras de cadeia dupla, com uma quebra ocorrendo em cada lado da sequência-alvo, (4) uma quebra de cadeia dupla e duas quebras de cadeia simples, com a

quebra de cadeia dupla e duas quebras de cadeia simples ocorrendo em cada lado da sequência-alvo, (5) quatro quebras de cadeia simples com um par de quebras de cadeia simples ocorrendo em cada lado da sequência-alvo, ou (6) uma quebra de cadeia simples.

Correção mediada por quebra de cadeia dupla

[0435] Em uma modalidade, a clivagem de cadeia dupla é efetuada por uma molécula Cas9, tendo atividade de clivagem associada a um domínio semelhante a HNH e atividade de clivagem associada a um domínio semelhante a RuvC, por exemplo, um domínio semelhante a RuvC N-terminal, por exemplo, uma Cas9 de tipo selvagem. Tais modalidades requerem apenas um único gRNA.

Correção mediada por quebra de cadeia simples

[0436] Noutras modalidades, duas quebras de cadeia simples, ou *nicks*, são efetuadas por uma molécula Cas9, tendo atividade de *nickase*, por exemplo, atividade de clivagem associada a um domínio semelhante a HNH ou atividade de clivagem associada a um domínio semelhante a RuvC em N-terminal. Tais modalidades requerem dois gRNAs, uma para a colocação de cada quebra de cadeia simples. Em uma modalidade, a molécula Cas9 tendo atividade de *nickase* cliva a cadeia à qual o gRNA hibrida, mas não a cadeia que é complementar à cadeia à qual o gRNA hibrida. Em uma modalidade, a molécula Cas9 que possui atividade *nickase* não cliva a cadeia à qual o gRNA hibrida, mas em vez disso, cliva a cadeia que é complementar à cadeia a que o gRNA hibrida.

[0437] Em uma modalidade, a *nickase* tem atividade HNH, por exemplo, uma molécula Cas9 tendo a atividade RuvC inativada, por exemplo, uma molécula Cas9 tendo uma mutação em D10, por exemplo, a mutação D10A. D10A inativa o RuvC; portanto, a Cas9 *nickase* possui (somente) atividade HNH e cortará na cadeia à qual o gRNA hibrida (por exemplo, a cadeia complementar, que não possui o

NGG PAM). Em outras modalidades, uma molécula Cas9 que tem uma mutação H840, por exemplo, uma H840A, pode ser usada como um *nickase*. H840A inativa HNH; por conseguinte, a Cas9 *nickase* tem (apenas) atividade RuvC e corta na cadeia não complementar (por exemplo, a cadeia que possui o NGG PAM e cuja sequência é idêntica ao gRNA).

[0438] Em uma modalidade, em que uma *nickase* e dois gRNAs são utilizados para posicionar dois *nicks* de cadeia simples, um *nick* está na cadeia + e um *nick* está na cadeia - do ácido nucleico alvo. Os PAMs estão voltados para fora. Os gRNAs podem ser selecionados, de tal forma que os gRNAs são separados por cerca de 0-50, 0-100 ou 0-200 nucleotídeos. Em uma modalidade, não existe sobreposição entre a sequência-alvo que é complementar aos domínios-alvo dos dois gRNAs. Em uma modalidade, os gRNAs não se sobrepõem e são separados por tanto quanto 50, 100 ou 200 nucleotídeos. Em uma modalidade, a utilização de dois gRNAs pode aumentar a especificidade, por exemplo, diminuindo a ligação fora do alvo (Ran et al., CELL 2013).

[0439] Em uma modalidade, um único *nick* pode ser utilizado para induzir HDR. É aqui contemplado que um único *nick* pode ser utilizado para aumentar a razão de HDR, HR ou NHEJ em um dado sítio de clivagem.

[0440] A colocação da quebra de cadeia dupla ou uma quebra de cadeia simples em relação à posição alvo

[0441] A quebra de cadeia dupla ou quebra de cadeia simples em uma das cadeias deve estar suficientemente próxima da posição alvo, de modo que a correção ocorra. Em uma modalidade, a distância não é superior a 50, 100, 200, 300, 350 ou 400 nucleotídeos. Apesar de não querer ficar limitado pela teoria, acredita-se que a quebra deve estar suficientemente próxima da posição alvo, de tal modo que a quebra

esteja dentro da região que está sujeita à remoção mediada por exonuclease durante a resseção final. Se a distância entre a posição alvo e uma quebra for grande demais, a mutação pode não ser incluída na resseção final e, portanto, pode não ser corrigida, pois a sequência dadora pode ser usada apenas para corrigir a sequência dentro da região de resseção final.

[0442] Em uma modalidade, na qual um gRNA (gRNA unimolecular (ou quimérico) ou modular) e nuclease Cas9 induzem uma quebra de cadeia dupla com o objetivo de induzir correção mediada por HDR- ou HR-, o sítio de clivagem é entre 0-200 pb (por exemplo, 0 a 175, 0 a 150, 0 a 125, 0 a 100, 0 a 75, 0 a 50, 0 a 25, 25 a 200, 25 a 175, 25 a 150, 25 a 125, 25 a 100, 25 a 75, 25 a 50, 50 a 200, 50 a 175, 50 a 150, 50 a 125, 50 a 100, 50 a 75, 75 a 200, 75 a 175, 75 a 150, 75 a 125, 75 a 100 pb) longe da posição alvo. Em uma modalidade, o sítio de clivagem está entre 0-100 pb (por exemplo, 0 a 75, 0 a 50, 0 a 25, 25 a 100, 25 a 75, 25 a 50, 50 a 100, 50 a 75 ou 75 a 100 pb) longe da posição alvo.

[0443] Em uma modalidade, em que dois gRNAs (independentemente, gRNA unimolecular (ou quimérico) ou modular) complexados com *nickases* Cas9 induzem duas quebras de cadeia simples com a finalidade de induzir a correção mediada por HDR, o *nick* mais próximo está entre 0-200 pb (por exemplo, 0 a 175, 0 a 150, 0 a 125, 0 a 100, 0 a 75, 0 a 50, 0 a 25, 25 a 200, 25 a 175, 25 a 150, 25 a 125, 25 a 100, 25 a 75, 25 a 50, 50 a 200, 50 a 175, 50 a 150, 50 a 125, 50 a 100, 50 a 75, 75 a 200, 75 a 175, 75 a 150, 75 a 125, 75 a 100 bp) longe da posição alvo e os dois *nicks* estarão idealmente dentro de 25-55 pb um do outro (por exemplo, 25 a 50, 25 a 45, 25 a 40, 25 a 35, 25 a 30, 30 a 55, 30 a 50, 30 a 45, 30 a 40, 30 a 35, 35 a 55, 35 a 50, 35 a 45, 35 a 40, 40 a 55, 40 a 50, 40 a 45 pb) e não mais que 100 pb afastados um do outro (por exemplo, não mais do que 90, 80, 70, 60,

50, 40, 30, 20, 10 ou 5 pb afastados um do outro). Em uma modalidade, o sítio de clivagem está entre 0-100 pb (por exemplo, 0 a 75, 0 a 50, 0 a 25, 25 a 100, 25 a 75, 25 a 50, 50 a 100, 50 a 75 ou 75 a 100 pb) longe da posição alvo.

[0444] Em uma modalidade, dois gRNAs, por exemplo, independentemente, gRNA unimolecular (ou quimérico) ou modular, são configurados para posicionar uma quebra de cadeia dupla em ambos os lados de uma posição alvo. Em uma modalidade alternativa, três gRNAs, por exemplo, independentemente, gRNA unimolecular (ou quimérico) ou modular, são configurados para posicionar uma quebra de cadeia dupla (isto é, um gRNA complexa com uma nuclease Cas9) e duas quebras de cadeia simples ou quebras de cadeia simples emparelhadas (ou seja, dois gRNAs complexam com Cas9 *nickases*) em cada lado da posição alvo (por exemplo, o primeiro gRNA é usado para direcionar a montante (isto é, 5') da posição alvo e o segundo gRNA é usado para direcionar a jusante (isto é, 3') da posição alvo). Em outra modalidade, quatro gRNAs, por exemplo, independentemente, gRNA unimolecular (ou quimérico) ou modular, são configurados para gerar dois pares de quebras de cadeia simples (ou seja, dois pares de dois gRNAs complexados com Cas9 *nickase*) em ambos os lados da posição alvo (por exemplo, o primeiro gRNA é usado para direcionar a montante (isto é, 5') da posição alvo e o segundo gRNA é usado para direcionar a jusante (ou seja, 3') da posição alvo). A(s) quebra(s) de cadeia dupla ou o mais próximo dos dois nicks de cadeia simples em um par, idealmente, estará dentro de 0-500 pb da posição alvo (por exemplo, não mais do que 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 ou 25 pb a partir da posição alvo). Quando *nickases* são usadas, os dois nicks em um par estão entre 25 e 55 pb um do outro (por exemplo, entre 25 a 50, 25 a 45, 25 a 40, 25 a 35, 25 a 30, 50 a 55, 45 a 55, 40 a 55, 35 a 55, 30 a 55, 30 a 50, 35 a 50, 40 a 50, 45 a 50, 35 a 45 ou 40 a 45

pb) e não mais que 100 pb de distância um do outro (por exemplo, não mais do que 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ou 10 pb).

[0445] Em uma modalidade, dois gRNAs, por exemplo, independentemente, gRNA unimolecular (ou quimérico) ou modular, são configurados para posicionar uma quebra de cadeia dupla em ambos os lados de uma posição alvo. Em uma modalidade alternativa, três gRNAs, por exemplo, independentemente, gRNA unimolecular (ou quimérico) ou modular, são configurados para posicionar uma quebra de cadeia dupla (isto é, um gRNA complexa com uma nuclease Cas9) e duas quebras de cadeia simples ou quebras de cadeia simples emparelhadas (ou seja, dois gRNAs complexam com Cas9 *nickases*) em duas sequências-alvo (por exemplo, o primeiro gRNA é utilizado para direcionar uma sequência-alvo a montante (isto é, 5') e o segundo gRNA é utilizado para direcionar uma sequência-alvo a jusante (isto é, 3') de um sítio de inserção. Em outra modalidade, quatro gRNAs, por exemplo, independentemente, gRNA unimolecular (ou quimérico) ou modular, são configurados para gerar dois pares de quebras de cadeia simples (ou seja, dois pares de dois gRNAs complexados com Cas9 *nickases*) em cada lado de um sítio de inserção (por exemplo, o primeiro gRNA é utilizado para direcionar uma sequência-alvo a montante (isto é, 5') aqui descrita, e o segundo gRNA é utilizado para direcionar uma sequência-alvo a jusante (isto é, 3') aqui descrita). A(s) quebra(s) de cadeia dupla ou o mais próximo dos dois nicks de cadeia simples em um par, idealmente, estará dentro de 0-500 pb da posição alvo (por exemplo, não mais do que 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 ou 25 pb a partir da posição alvo). Quando *nickases* são usadas, os dois nicks em um par estão entre 25 e 55 pb um do outro (por exemplo, entre 25 a 50, 25 a 45, 25 a 40, 25 a 35, 25 a 30, 50 a 55, 45 a 55, 40 a 55, 35 a 55, 30 a 55, 30 a 50, 35 a 50, 40 a 50, 45 a 50, 35 a 45 ou 40 a 45 pb) e não mais que 100 pb de distância um do outro (por exemplo, não

mais do que 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ou 10 pb).

Comprimento dos braços de homologia

[0446] O braço de homologia deve estender-se, pelo menos, até à região em que a resseção final pode ocorrer, por exemplo, de modo a permitir que a *overhang* de cadeia simples ressecada encontre uma região complementar dentro do molde dador. O comprimento total pode ser limitado por parâmetros tais como tamanho do plasmídeo ou limites de empacotamento viral. Em uma modalidade, um braço de homologia não se estende em elementos repetidos, por exemplo, repetições de ALU, repetições LINE. Um modelo pode ter dois braços de homologia com comprimentos iguais ou diferentes.

[0447] Os comprimentos de braço de homologia exemplificativos incluem, pelo menos, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ou 1000 nucleotídeos.

[0448] A posição alvo, tal como aqui utilizado, refere-se a um sítio em um ácido nucleico alvo (por exemplo, cromossomo) que é modificado por um processo dependente da molécula Cas9. Por exemplo, a posição alvo pode ser uma clivagem modificada pela molécula Cas9 do ácido nucleico alvo e modificação dirigida do ácido nucleico molde, por exemplo, correção, da posição alvo. Em uma modalidade, uma posição alvo pode ser um sítio entre dois nucleotídeos, por exemplo, nucleotídeos adjacentes, no ácido nucleico alvo no qual é adicionado um ou mais nucleotídeos. A posição alvo pode compreender um ou mais nucleotídeos que são alterados, por exemplo, corrigidos, por um ácido nucleico molde. Em uma modalidade, a posição alvo está dentro de uma sequência-alvo (por exemplo, a sequência à qual o gRNA se liga). Em uma modalidade, uma posição alvo é a montante ou a jusante de uma sequência-alvo (por exemplo, a sequência à qual o gRNA se liga).

[0449] Tipicamente, a sequência molde sofre uma recombinação mediada ou catalisada por quebra com a sequência-alvo. Em uma

modalidade, o ácido nucleico molde inclui sequência que corresponde a um sítio na sequência-alvo que é clivado por um evento de clivagem mediado por Cas9. Em uma modalidade, o ácido nucleico molde inclui sequência que corresponde a ambos, um primeiro sítio na sequência-alvo que é clivado em um primeiro evento mediado por Cas9, e um segundo sítio na sequência-alvo que é clivado em um segundo evento mediado por Cas9.

[0450] Em uma modalidade, o ácido nucleico molde pode incluir sequência que resulta em uma alteração na sequência de codificação de uma sequência traduzida, por exemplo, uma que resulta na substituição de um aminoácido por outro em um produto proteico, por exemplo, transformação de um alelo mutante em um alelo de tipo selvagem, transformação de um alelo de tipo selvagem em um alelo mutante e/ou a introdução de um códon de paragem, inserção de um resíduo de aminoácido, deleção de um resíduo de aminoácido, ou uma mutação sem sentido.

[0451] Em outras modalidades, o ácido nucleico molde pode incluir sequência que resulta em uma alteração em uma sequência não codificante, por exemplo, uma alteração em um éxon ou em uma região não-traduzida ou não-transcrita em 3' ou em 5'. Tais alterações incluem uma alteração em um elemento de controle, por exemplo, um promotor, um intensificador e uma alteração em um elemento de controle de ação trans ou ação cis.

[0452] O ácido nucleico molde pode incluir uma sequência que, quando integrada, resulta em:

- diminuição da atividade de um elemento de controle positivo;
- aumento da atividade de um elemento de controle positivo;
- diminuição da atividade de um elemento de controle negativo;
- aumento da atividade de um elemento de controle negativo;
- diminuição da expressão de um gene;

aumento da expressão de um gene;
 aumento da resistência a um distúrbio ou doença;
 aumento da resistência à entrada viral;
 correção de uma mutação ou alteração de um resíduo de aminoácido indesejado;
 conferir, aumentar, abolir ou diminuir uma propriedade biológica de um produto genético, por exemplo, aumentando a atividade enzimática de uma enzima, ou aumentando a capacidade de um produto genético para interagir com outra molécula.

[0453] O ácido nucleico molde pode incluir sequência que resulta em:

uma alteração na sequência de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou mais nucleotídeos da sequência-alvo.

[0454] Em uma modalidade, o ácido nucleico molde é 20+/- 10, 30+/- 10, 40+/- 10, 50+/- 10, 60+/- 10, 70+/- 10, 80+/- 10, 90+/- 10, 100+/- 10, 110+/- 10, 120+/- 10, 130+/- 10, 140+/- 10, 150+/- 10, 160+/- 10, 170+/- 10, 180+/- 10, 190+/- 10, 200+/- 10, 210+/- 10, 220+/- 10, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-2000, 2000-3000 ou mais do que 3000 nucleotídeos de comprimento.

[0455] Um ácido nucleico molde compreende os seguintes componentes:

[braço de homologia 5'] - [sequência de inserção] - [braço de homologia 3'].

[0456] Os braços de homologia proporcionam recombinação no cromossomo, que pode substituir o elemento indesejado, por exemplo, uma mutação ou assinatura, com a sequência de substituição. Em uma modalidade, os braços de homologia flanqueiam os sítios de clivagem mais distais.

[0457] Em uma modalidade, a extremidade 3' do braço de

homologia 5' é a posição próxima da extremidade 5' da sequência de substituição. Em uma modalidade, o braço de homologia 5' pode estender, pelo menos, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 180, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, ou 2000 nucleótidos 5' a partir da extremidade 5' da sequência de substituição.

[0458] Em uma modalidade, a extremidade 5' do braço de homologia 3' é a posição próxima da extremidade 3' da sequência de substituição. Em uma modalidade, o braço de homologia 3' pode estender, pelo menos, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 180, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, ou 2000 nucleótidos 3' a partir da extremidade 3' da sequência de substituição.

[0459] É aqui contemplado que um ou ambos os braços de homologia podem ser encurtados para evitar a inclusão de certos elementos de repetição de sequência, por exemplo, elementos LINE, repetições Alu. Por exemplo, um braço de homologia 5' pode ser encurtado para evitar um elemento de repetição de sequência. Em outras modalidades, um braço de homologia 3' pode ser encurtado para evitar um elemento de repetição de sequência. Em algumas modalidades, os braços de homologia 5' e 3' podem ser encurtados para evitar a inclusão de certos elementos de repetição de sequência.

[0460] É aqui contemplado que os ácidos nucleicos molde para corrigir uma mutação podem ser criados para utilização como um oligonucleotídeo de cadeia simples (ssODN, do inglês "single-stranded oligonucleotide"). Quando se utiliza um ssODN, os braços de homologia 5' e 3' podem variar até cerca de 200 pares de bases (pb) de comprimento, por exemplo, pelo menos 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ou 200 pb de comprimento. Braços de homologia mais longos são também contemplados para ssODNs enquanto melhorias na síntese de oligonucleotídeos que continuam a ser realizadas.

Abordagens NHEJ para Direcionamento de Gene

[0461] Como aqui descrito, a união de extremidade não-homóloga (NHEJ, do inglês "non-homologous end-joining") induzida por nuclease pode ser utilizada para alvejar inativações específicas de gene. A NHEJ induzida por nuclease também pode ser utilizada para remover (por exemplo, deletar) sequência em um gene de interesse.

[0462] Apesar de não querer ficar limitado pela teoria, acredita-se que, em uma modalidade, as alterações genômicas associadas aos métodos aqui descritos dependem de NHEJ induzida por nuclease e da natureza propensa a erros da via de reparação NHEJ. A NHEJ repara uma quebra de cadeia dupla no DNA unindo as duas extremidades; no entanto, geralmente, a sequência original é restaurada apenas se duas extremidades compatíveis, exatamente como foram formadas pela quebra da cadeia dupla, estiverem perfeitamente ligadas. As extremidades de DNA da quebra de cadeia dupla são frequentemente sujeitas a processamento enzimático, resultando na adição ou remoção de nucleotídeos, em uma ou ambas as cadeias, antes de voltar a juntar as extremidades. Isto resulta na presença de mutações de inserção e/ou deleção (indel) na sequência de DNA no sítio da reparação NHEJ. Dois terços dessas mutações podem alterar o quadro de leitura e, portanto, produzir uma proteína não funcional. Adicionalmente, as mutações que mantêm o quadro de leitura, mas que inserem ou deletam uma quantidade significativa de sequência, podem destruir a funcionalidade da proteína. Isto é dependente de locus, uma vez que mutações em domínios funcionais críticos são provavelmente menos toleráveis do que mutações em regiões não críticas da proteína.

[0463] As mutações indel geradas por NHEJ são de natureza imprevisível; no entanto, em um determinado sítio de quebra, certas sequências indel são favorecidas e são representadas em excesso na população. Os comprimentos de deleções podem variar amplamente; mais comumente na faixa de 1-50 pb, mas eles podem atingir facilmente

mais de 100-200 pb. As inserções tendem a ser mais curtas e geralmente incluem duplicações curtas da sequência imediatamente ao redor do sítio da quebra. No entanto, é possível obter grandes inserções e, nestes casos, a sequência inserida foi muitas vezes atribuída a outras regiões do genoma ou ao DNA plasmídico presente nas células.

[0464] Como NHEJ é um processo mutagênico, também pode ser usado para deletar pequenos motivos de sequência, desde que a geração de uma sequência final específica não seja necessária. Se uma quebra de cadeia dupla for direcionada perto de uma sequência-alvo curta, as mutações de deleção causadas pela reparação NHEJ frequentemente se estendem e, portanto, removem os nucleotídeos indesejáveis. Para a deleção de segmentos de DNA maiores, a introdução de duas quebras de cadeia dupla, uma em cada lado da sequência, pode resultar em NHEJ entre as extremidades com a remoção de toda a sequência interveniente. Ambas as abordagens podem ser usadas para deletar sequências de DNA específicas; no entanto, a natureza propensa a erros de NHEJ ainda pode produzir mutações indel no sítio da reparação.

[0465] Ambas as moléculas Cas9 de clivagem em cadeia dupla e moléculas Cas9 de cadeia simples ou *nickase* podem ser utilizadas nos métodos e composições aqui descritos para gerar indels mediados por NHEJ. Indels mediados por NHEJ direcionados para o gene, por exemplo, uma região codificante, por exemplo, uma região codificante inicial de um gene de interesse pode ser utilizada para inativar (isto é, eliminar a expressão de) um gene de interesse. Por exemplo, a região de codificação inicial de um gene de interesse inclui sequência imediatamente após um sítio de início de transcrição, dentro de um primeiro éxon da sequência de codificação, ou dentro de 500 pb do sítio de início da transcrição (por exemplo, inferior a 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 ou 50 pb).

[0466] Colocação de quebras de cadeia dupla ou de cadeia simples em relação à posição alvo

[0467] Em uma modalidade, na qual um gRNA e nuclease Cas9 geram uma quebra de cadeia dupla com a finalidade de induzir indels mediadas por NHEJ, um gRNA, por exemplo, uma molécula de gRNA unimolecular (ou quimérica) ou modular, é configurado para posicionar uma quebra de cadeia dupla em estreita proximidade com um nucleotídeo da posição alvo. Em uma modalidade, o local de clivagem situa-se entre 0-500 pb de distância da posição do alvo (por exemplo, menos de 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 pb a partir da posição do alvo).

[0468] Em uma modalidade, em que dois gRNAs complexando com *nickases* Cas9 induzem duas quebras de cadeia simples para a indução de indels mediadas por NHEJ, dois gRNAs, por exemplo, independentemente, gRNA unimolecular (ou quimérico) ou modular, são configurados para posicionar duas quebras de cadeia única para fornecer para NHEJ reparar um nucleotídeo da posição alvo. Em uma modalidade, os gRNAs são configurados para cortes de posição na mesma posição, ou dentro de poucos nucleotídeos um do outro, em diferentes cadeias, essencialmente imitando uma quebra de cadeia dupla. Em uma modalidade, o nick mais próximo está entre 0-30 pb da posição alvo (por exemplo, menos de 30, 25, 20, 1, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 pb da posição alvo), e os dois nicks estão entre 25-55 pb um do outro (por exemplo, entre 25 a 50, 25 a 45, 25 a 40, 25 a 35, 25 a 30, 50 a 55, 45 a 55, 40 a 55, 35 a 55, 30 a 55, 30 a 50, 35 a 50, 40 a 50, 45 a 50, 35 a 45 ou 40 a 45 pb) e a não mais de 100 pb um do outro (por exemplo, não mais do que 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ou 10 pb). Em uma modalidade, os gRNAs são configurados para colocar uma quebra de cadeia simples em ambos os lados de um nucleotídeo da posição alvo.

[0469] Ambas as moléculas Cas9 de clivagem em cadeia dupla e moléculas Cas9 de cadeia simples ou *nickase* podem ser utilizadas nos métodos e composições aqui descritos para gerar quebras em ambos os lados de uma posição alvo. Quebras de cadeia simples emparelhada ou de cadeia dupla podem ser geradas em ambos os lados de uma posição alvo para remover a sequência de ácido nucleico entre os dois cortes (por exemplo, a região entre as duas quebras é eliminada). Em uma modalidade, dois gRNAs, por exemplo, independentemente, gRNA unimolecular (ou quimérico) ou modular, são configurados para posicionar uma quebra de cadeia dupla em ambos os lados de uma posição alvo (por exemplo, o primeiro gRNA é usado para direcionar a montante (ou seja, 5') da mutação em um gene ou via aqui descrita, e o segundo gRNA é utilizado para direcionar para jusante (ou seja, 3') da mutação em um gene ou via aqui descrita). Em uma modalidade alternativa, três gRNAs, por exemplo, independentemente, gRNA unimolecular (ou quimérico) ou modular, são configurados para posicionar uma quebra de cadeia dupla (isto é, um gRNA complexa com uma nuclease Cas9) e duas quebras de cadeia simples ou quebras de cadeia simples emparelhadas (ou seja, dois gRNAs complexam com Cas9 *nickases*) em cada lado uma posição alvo (por exemplo, o primeiro gRNA é usado para direcionar a montante (isto é, 5') da mutação em um gene ou via aqui descrita, e o segundo gRNA é usado para direcionar a jusante (isto é, 3') da mutação em um gene ou via aqui descrita). Em outra modalidade, quatro gRNAs, por exemplo, independentemente, gRNA unimolecular (ou quimérico) ou modular, são configurados para gerar dois pares de quebras de cadeia simples (ou seja, dois pares de dois gRNAs complexam com Cas9 *nickase*) em ambos os lados da posição alvo (por exemplo, o primeiro gRNA é usado para direcionar a montante (isto é, 5') da mutação em um gene ou via aqui descrita, e o segundo gRNA é usado para direcionar a jusante (ou seja, 3') da

mutação em um gene ou via aqui descrita). A(s) quebra(s) de cadeia dupla ou o mais próximo dos dois nicks de cadeia simples em um par, idealmente, estará dentro de 0-500 pb da posição alvo (por exemplo, não mais do que 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 ou 25 pb a partir da posição alvo). Quando nickases são usadas, os dois nicks em um par estão entre 25 e 55 pb um do outro (por exemplo, entre 25 a 50, 25 a 45, 25 a 40, 25 a 35, 25 a 30, 50 a 55, 45 a 55, 40 a 55, 35 a 55, 30 a 55, 30 a 50, 35 a 50, 40 a 50, 45 a 50, 35 a 45 ou 40 a 45 pb) e não mais que 100 pb de distância um do outro (por exemplo, não mais do que 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ou 10 pb).

[0470] Em outras modalidades, a inserção de ácido nucleico molde pode ser mediada por união de extremidade de micro-homologia (MMEJ, do inglês "microhomology end joining"). Ver, por exemplo, Saksuma et al., "MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems." *Nature Protocols* **11**, 118–133 (2016) doi:10.1038/nprot.2015.140 Publicado online a 17 de dezembro de 2015, cujos conteúdos são incorporados por referência na sua totalidade.

VIII. Sistemas Compreendendo Mais do que uma Molécula de gRNA

[0471] Apesar de não querer ficar limitado pela teoria, foi surpreendentemente mostrado no presente documento que o direcionamento de duas sequências-alvo (por exemplo, por dois complexos de molécula de gRNA/molécula Cas9 que induzem cada um uma quebra de cadeia simples ou dupla em ou próximo das suas sequências-alvo respectivas) localizadas próximas a um ácido nucleico contínuo induz excisão (por exemplo, deleção) da sequência de ácido nucléico (ou, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% da sequência de ácido nucleico) localizada entre as duas sequências-alvo. Em alguns aspectos, a presente invenção proporciona para a

utilização de duas ou mais moléculas de gRNA que compreendem domínios-alvo direcionando sequências-alvo em estreita proximidade em um ácido nucleico contínuo, por exemplo, um cromossomo, por exemplo, um gene ou locus gene, incluindo os seus íntrons, éxons e elementos reguladores. A utilização pode ser, por exemplo, por introdução das duas ou mais moléculas de gRNA, juntamente com uma ou mais moléculas Cas9 (ou ácido nucleico que codifica as duas ou mais moléculas de gRNA e/ou a uma ou mais moléculas Cas9) em uma célula.

[0472] Em alguns aspectos, as sequências-alvo das duas ou mais moléculas de gRNA estão localizadas a, pelo menos, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10,000, 11,000, 12,000, 13,000, 14,000, ou 15,000 nucleotídeos em um ácido nucleico contínuo, mas não mais do que 25.000 nucleotídeos em um ácido nucleico contínuo. Em modalidades, as sequências-alvo estão localizadas a cerca de 4000 e cerca de 6000 nucleotídeos de distância. Em uma modalidade, as sequências-alvo estão localizadas a cerca de 4000 nucleotídeos de distância. Em uma modalidade, as sequências-alvo estão localizadas a cerca de 5000 nucleotídeos de distância. Em uma modalidade, as sequências-alvo estão localizadas a cerca de 6000 nucleotídeos de distância.

[0473] Em alguns aspectos, a pluralidade de moléculas de gRNA cada direciona para sequências dentro do mesmo gene ou locus do gene. Em um aspecto exemplificativo, as sequências-alvo das duas ou mais moléculas de gRNA estão localizadas na região promotora de HBG1. Em um aspecto exemplificativo, as sequências-alvo das duas ou mais moléculas de gRNA estão localizadas na região promotora de HBG2. Em outro aspecto, a pluralidade de moléculas de gRNA cada direciona para sequências dentro de 2 ou mais genes ou loci génicos

diferentes. Em um aspecto exemplificativo, a sequência-alvo de uma ou mais das moléculas de gRNA situa-se na região promotora de HBG1, e a sequência-alvo de uma ou mais das outras moléculas gRNA está localizada na região promotora de HBG2.

[0474] Em alguns aspectos, a invenção proporciona composições e células compreendendo uma pluralidade, por exemplo, 2 ou mais, por exemplo, 2, moléculas de gRNA da invenção, em que a pluralidade de moléculas de gRNA tem como alvo sequências a menos de 15.000, a menos de 14.000, a menos de 13.000, a menos de 12.000, a menos de 11.000, a menos de 10.000, a menos de 9.000, a menos de 8.000, a menos de 7.000, a menos de 6.000, a menos de 5.000, a menos de 4.000, a menos de 3.000, a menos de 2.000, a menos de 1.000, a menos de 900, a menos de 800, a menos de 700, a menos de 600, a menos de 500, a menos de 400, a menos de 300, a menos de 200, a menos de 100, a menos de 90, a menos de 80, a menos de 70, a menos de 60, a menos de 50, a menos de 40 ou a menos de 30 nucleotídeos de distância. Em uma modalidade, as sequências-alvo estão na mesma cadeia de ácido nucleico duplex. Em uma modalidade, as sequências-alvo estão em diferentes cadeias de ácido nucleico dúpex.

[0475] Em uma modalidade, a invenção proporciona um método para excisar (por exemplo, deleção) ácido nucleico disposto entre dois sítios de ligação ao gRNA dispostos a menos de 25.000, a menos de 20.000, a menos de 15.000, a menos de 14.000, a menos de 13.000, a menos de 12.000, a menos de 11.000, a menos de 10.000, a menos de 9.000, a menos de 8.000, a menos de 7.000, a menos de 6.000, a menos de 5.000, a menos de 4.000, a menos de 3.000, a menos de 2.000, a menos de 1.000, a menos de 900, a menos de 800, a menos de 700, a menos de 600, a menos de 500, a menos de 400, a menos de 300, a menos de 200, a menos de 100, a menos de 90, a menos de 80, a menos de 70, a menos de 60, a menos de 50, a menos de 40 ou a

menos de 30 nucleotídeos de distância nas mesmas ou diferentes cadeias de ácido nucleico dúplice. Em uma modalidade, o método proporciona a deleção de mais de 50%, mais de 60%, mais de 70%, mais de 80%, mais de 85%, mais de 86%, mais de 87%, mais de 88%, mais de 89%, mais de 90%, mais de 91%, mais de 92%, mais de 93%, mais de 94%, mais de 95%, mais de 96%, mais de 97%, mais de 98%, mais de 99%, ou 100% dos nucleotídeos dispostos entre os sítios de PAM associados a cada sítio de ligação de gRNA. Em modalidades, a deleção compreende adicionalmente um ou mais nucleotídeos dentro de um ou mais dos sítios PAM associados a cada sítio de ligação ao gRNA. Em modalidades, a deleção também compreende um ou mais nucleotídeos de fora da região entre os sítios de PAM associados com cada sítio de ligação ao gRNA.

[0476] Em um aspecto, as duas ou mais moléculas de gRNA compreendem domínios-alvo direcionando sequências-alvo flanqueando um elemento regulador de genes, por exemplo, um sítio de ligação de promotor, uma região do intensificador ou uma região repressora, tal que a excisão da sequência interveniente (ou uma porção da sequência interveniente) causa uma regulação ascendente ou descendente de um gene de interesse. Em outras modalidades, as duas ou mais moléculas de gRNA compreendem domínios-alvo que têm como alvo sequências que flanqueiam um gene, de tal modo que a excisão da sequência interveniente (ou sua porção) causa a deleção do gene de interesse.

[0477] Em uma modalidade, as duas ou mais moléculas de gRNA incluem, cada uma, um domínio-alvo, por exemplo, consistindo em, uma sequência de domínio-alvo da Tabela 1, por exemplo, da Tabela 2 ou, por exemplo, da Tabela 3a ou Tabela 3b. Em modalidades, as duas ou mais moléculas de gRNA incluem, cada uma, domínio-alvo compreendendo, por exemplo, que consistindo em, o domínio-alvo de

uma molécula gRNA que resulta em, pelo menos, 15% de regulação positiva do número de células F de uma população de glóbulos vermelhos diferenciados (por exemplo, no dia 7 a seguir à edição) de HSPCs editadas pelo referido gRNA ex vivo através dos métodos aqui descritos. Em aspectos, as duas ou mais moléculas de gRNA compreendem domínios-alvo que são complementares com sequências no mesmo gene ou região, por exemplo, a região promotora de HBG1 ou a região promotora de HBG2. Em aspectos, as duas ou mais moléculas de gRNA compreendem domínios-alvo que são complementares com sequências de diferentes genes ou regiões, por exemplo, um na região promotora de HBG1 e um na região promotora de HBG2.

[0478] Em um aspecto, as duas ou mais moléculas de gRNA compreendem domínios-alvo direcionando sequências-alvo flanqueando um elemento regulador de genes, por exemplo, um sítio de ligação de promotor, uma região do intensificador ou uma região repressora, tal que a excisão da sequência interveniente (ou uma porção da sequência interveniente) causa uma regulação ascendente ou descendente de um gene de interesse. Em outro aspecto, as duas ou mais moléculas de gRNA compreendem domínios-alvo direcionando para sequências que flanqueiam um gene, de tal modo que a excisão da sequência interveniente (ou uma porção da sequência interveniente) causa a deleção do gene de interesse. A título de exemplo, as duas ou mais moléculas de gRNA compreendem domínios-alvo direcionando para sequências-alvo flanqueando o gene HBG1 (por exemplo, uma molécula de gRNA direcionando para uma sequência-alvo na região promotora de HBG1, e uma segunda molécula de gRNA direcionando para uma sequência-alvo na região promotora de HBG2), tal que o gene HBG1 é excisado.

[0479] Em uma modalidade, as duas ou mais moléculas de gRNA

compreendem domínios-alvo que compreendem, por exemplo, consistem em, domínios-alvo selecionados a partir da Tabela 1.

[0480] Em aspectos, as duas ou mais moléculas de gRNA compreendem domínios-alvo que compreendem, por exemplo, consistindo em, sequências do domínio-alvo listadas na Tabela 2, acima. Em aspectos, as duas ou mais moléculas de gRNA compreendem domínios-alvo que compreendem, por exemplo, consistindo em, sequências do domínio-alvo dos gRNAs listados na Tabela 3a, acima. Em aspectos, as duas ou mais moléculas de gRNA compreendem domínios-alvo que compreendem, por exemplo, consistindo em, sequências do domínio-alvo listadas na Tabela 3b, acima.

[0481] As moléculas de gRNA compreendendo domínios-alvo que têm como alvo sequências dentro de uma região HPHP não deleção, por exemplo, uma região promotora de HBG1 e/ou HBG2, podem adicionalmente ser usadas com uma molécula de gRNA compreendendo um domínio-alvo complementar a uma sequência-alvo dentro, por exemplo, uma região intensificadora BCL11a (por exemplo, uma região intensificadora +55, +58 ou +62 BCL11a) e/ou uma molécula de gRNA compreendendo um domínio-alvo complementar a uma sequência-alvo de um locus HPFH de deleção. Tais loci de HPFH de deleção são conhecidos na técnica, por exemplo, os descritos em Sankaran VG et al. NEJM (2011) 365: 807-814 (aqui incorporado por referência na sua totalidade).

IX. Propriedades do gRNA

[0482] Foi ainda surpreendentemente mostrado aqui que moléculas de gRNA únicas podem ter sequências-alvo em mais do que um loci (por exemplo, loci com elevada homologia de sequência), e que, quando tais loci estão presentes no mesmo cromossomo, por exemplo, dentro de menos de cerca de 15.000 nucleotídeos, menos de cerca de 14.000

nucleotídeos, menos de cerca de 13.000 nucleotídeos, menos de cerca de 12.000 nucleotídeos, menos de cerca de 11.000 nucleotídeos, menos de cerca de 10.000 nucleotídeos, menos de cerca de 9.000 nucleotídeos, menos de cerca de 8.000 nucleotídeos, menos de cerca de 7.000 nucleotídeos, menos de cerca de 6.000 nucleotídeos, menos de cerca de 5.000 nucleotídeos, menos de cerca de 4.000 nucleotídeos ou menos de cerca de 3.000 nucleotídeos (por exemplo, de cerca de 4.000 a cerca de 6.000 nucleotídeos de distância), tal molécula de gRNA pode resultar na excisão da sequência interveniente (ou parte da mesma), resultando assim em um efeito benéfico, por exemplo, regulação positiva da hemoglobina fetal em células eritroides diferenciadas de HSPCs modificadas (como descrito aqui). Assim, em um aspecto, a invenção fornece moléculas de gRNA que têm sequências-alvo em dois loci, por exemplo, para loci no mesmo cromossomo, por exemplo, que têm sequências-alvo em uma região promotora de HBG1 e em uma região promotora de HBG2 (por exemplo como descrito na Tabela 1). Sem começar limitado pela teoria, acredita-se que tais gRNAs podem resultar no corte do genoma em mais de um local (por exemplo, na sequência-alvo em cada uma das duas regiões), e que o reparo subsequente pode resultar em uma deleção da sequência de ácido nucleico interveniente. Mais uma vez, sem ser limitado por teoria, a deleção da referida sequência interveniente pode ter um efeito desejado na expressão ou função de uma ou mais proteínas.

[0483] Foi ainda surpreendentemente mostrado que moléculas de gRNA que compreendem um domínio-alvo complementar a uma sequência apenas em um gene ou região, por exemplo, que é complementar a uma sequência-alvo na região promotora de HBG1 (mas não na região promotora de HBG2), ou que é complementar a uma sequência-alvo na região do promotor de HBG2 (mas não a região

promotora de HBG1), pode resultar em regulação positiva significativa de hemoglobina fetal em células eritroides diferenciadas de HSPCs modificadas (como aqui descrito). Em aspectos, a invenção fornece assim moléculas de gRNA que compreendem um domínio-alvo que é complementar a uma sequência-alvo em uma única região HPFH não deleção, por exemplo, dentro de uma região promotora de HBG1 ou HBG2 (por exemplo, como descrito na Tabela 1), mas que não tem uma sequência-alvo complementar completa (por exemplo, 100%) em qualquer outro gene ou região.

[0484] Foi ainda surpreendentemente mostrado no presente documento que moléculas de gRNA e sistemas CRISPR compreendendo as referidas moléculas de gRNA produzem padrões de indel semelhantes ou idênticos ao longo de múltiplas experiências utilizando o mesmo tipo de célula, método de entrega e componentes de gRNA/tracr. Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que alguns padrões de indel podem ser mais vantajosos do que outros. Por exemplo, as indels que incluem predominantemente inserções e/ou deleções que resultam em uma "mutação de deslocação do quadro de leitura" (por exemplo, inserções ou deleções de 1- ou 2- pares de bases, ou qualquer inserção ou deleção onde $n/3$ não é um número inteiro (onde n = o número de nucleotídeos na inserção ou deleção)) podem ser benéficas na redução ou eliminação da expressão de uma proteína funcional. Da mesma forma, os indels que incluem predominantemente "grandes deleções" (deleções de mais de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 ou 30 nucleotídeos, por exemplo, mais de 1 kb, mais de 2 kb, mais de 3 kb, mais de 5 kb ou mais de 10 kb, por exemplo, compreendendo sequência disposta entre um primeiro e segundo sítio de ligação para um gRNA, por exemplo, como aqui descrito) pode também ser benéfico, por exemplo, na remoção de sequências reguladoras críticas como promotor sítios de ligação, ou alterando a estrutura ou função de um

locus, que podem similarmente ter um efeito na expressão da proteína funcional. Embora os padrões de indel induzidos por um dado sistema gRNA/CRISPR tenham sido surpreendentemente reproduzidos para um determinado tipo de célula, gRNA e sistema CRISPR, como aqui descrito, nenhuma estrutura indel única será inevitavelmente produzida em uma dada célula após a introdução de um sistema gRNA/CRISPR.

[0485] A invenção proporciona assim moléculas de gRNA que criam um padrão ou estrutura indel benéfico, por exemplo, que têm padrões ou estruturas indel predominantemente compostas de grandes deleções. Tais moléculas de gRNA podem ser selecionadas por meio da avaliação do padrão ou estrutura indel criada por uma molécula de gRNA candidata em uma célula de ensaio (por exemplo, uma célula HEK293) ou na célula de interesse, por exemplo, uma célula de HSPC por NGS, como aqui descrito. Como mostrado nos Exemplos, foram descobertas moléculas de gRNA que, quando introduzidas na população celular desejada, resultam em uma população de células compreendendo uma fracção significativa das células tendo uma grande deleção em ou próximo da sequência-alvo do gRNA. Em alguns casos, a taxa de formação de indel de grande deleção é tão elevada quanto 75%, 80%, 85%, 90% ou mais. A invenção proporciona assim populações de células que compreendem, pelo menos, cerca de 40% de células (por exemplo, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 99%) tendo uma grande deleção, por exemplo como aqui descrito, em ou próximo do sítio-alvo de uma molécula de gRNA aqui descrito. A invenção proporciona também populações de células que compreendem, pelo menos, cerca de 50% de células (por exemplo, pelo

menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 99%) tendo uma grande deleção, por exemplo como aqui descrito, em ou próximo do sítio-alvo de uma molécula de gRNA aqui descrito.

[0486] A invenção proporciona, assim, métodos de seleção de moléculas de gRNA para utilização nos métodos terapêuticos da invenção, compreendendo: 1) proporcionar uma pluralidade de moléculas de gRNA a um alvo de interesse, 2) avaliar o padrão ou estrutura indel criado pela utilização das referidas moléculas de gRNA, 3) selecionar uma molécula de gRNA que forme um padrão ou estrutura indel composto predominantemente de mutações de deslocação do quadro de leitura, grandes deleções ou uma sua combinação, e 4) utilizando o referido gRNA selecionado em métodos da invenção.

[0487] A invenção proporciona, assim, métodos de seleção de moléculas de gRNA para utilização nos métodos terapêuticos da invenção, compreendendo: 1) proporcionar uma pluralidade de moléculas de gRNA a um alvo de interesse, por exemplo, que possuem sequências-alvo em mais de uma localização, 2) avaliar o padrão ou estrutura indel criada pelo uso das referidas moléculas de gRNA, 3) selecionar uma molécula de gRNA que forma uma excisão da sequência compreendendo a sequência de ácido nucleico localizada entre as duas sequências-alvo, por exemplo, em pelo menos cerca de 25% ou mais das células de uma população de células que estão expostas às referidas moléculas de gRNA, e 4) utilizando a referida molécula de gRNA selecionada em métodos da invenção.

[0488] A invenção proporciona ainda métodos de alteração de células e células alteradas, em que um padrão de indel particular é constantemente produzido com um dado sistema gRNA/CRISPR nesse

tipo de célula. Os padrões de indel, incluindo as 5 principais indels que ocorrem mais frequentemente observadas com os sistemas gRNA/CRISPR aqui descritos podem ser determinados utilizando os métodos dos exemplos e são divulgados, por exemplo, nos Exemplos. Como mostrado nos Exemplos, são geradas populações de células, em que uma fração significativa das células compreende uma das 5 principais indels (por exemplo, populações de células em que uma das 5 principais indels está presente em mais de 30%, mais do que 40%, mais de 50%, mais de 60% ou mais das células da população. Assim, a invenção proporciona células, por exemplo, HSPCs (como aqui descrito), que compreendem uma indel de qualquer uma das 5 principais indels observadas com um dado sistema gRNA/CRISPR. Além disso, a invenção proporciona populações de células, por exemplo, HSPCs (como aqui descrito), que quando avaliadas por, por exemplo, NGS, compreendem uma elevada percentagem de células compreendendo uma das 5 principais indels aqui descritas para um dado sistema gRNA/CRISPR. Quando usado em conexão com análise de padrão indel, uma "elevada percentagem" refere-se a pelo menos 50% (por exemplo, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 99%) das células da população compreendendo uma das 5 principais indels aqui descritas para um dado sistema gRNA/CRISPR. Noutras modalidades, a população de células compreende, pelo menos, cerca de 25% (por exemplo, de cerca de 25% a cerca de 60%, por exemplo, de cerca de 25% a cerca de 50%, por exemplo, de cerca de 25% a cerca de 40%, por exemplo de cerca de 25% a cerca de 35%) de células que possuem uma das 5 principais indels aqui descritas para um dado sistema gRNA/CRISPR.

[0489] Também foi descoberto que certas moléculas de gRNA não

criam indels em sequências fora do alvo (por exemplo, sequências fora do alvo fora da região promotora HBG1 e/ou HBG2) dentro do genoma do tipo de célula-alvo, ou produzem indels em sítios fora do alvo (por exemplo, sequências fora do alvo fora da região promotora de HBG1 e/ou HBG2) em frequências muito baixas (por exemplo, <5% das células dentro de uma população) em relação à frequência de criação de indel no sítio-alvo. Assim, a invenção proporciona moléculas de gRNA e sistemas CRISPR que não exibem formação de indel fora do alvo no tipo de célula-alvo, ou que produzem uma frequência de formação de indel fora do alvo inferior a 5%, por exemplo, um indel em qualquer sítio fora do alvo fora da região promotora de HBG1 e/ou a HBG2 a uma frequência de menos do que 5%. Em modalidades, a invenção fornece moléculas de gRNA e sistemas CRISPR que não apresentam qualquer formação de indel fora do alvo no tipo de célula-alvo. Assim, a invenção proporciona ainda uma célula, por exemplo, uma população de células, por exemplo, HSPCs, por exemplo, como aqui descrito, que compreende um indel em ou próximo de um sítio-alvo de uma molécula de gRNA aqui descrito (por exemplo, um indel de deslocação do quadro de leitura ou qualquer uma das 5 principais indels produzidas por um dado sistema gRNA/CRISPR, por exemplo, como aqui descrito), mas não compreende um indel em qualquer sítio fora do alvo da molécula de gRNA, por exemplo, um indel em qualquer sítio fora do alvo fora da região promotora HBG1 e/ou HBG2. Em outras modalidades, a invenção proporciona ainda uma população de células, por exemplo, HSPCs, por exemplo, como aqui descrito, que compreende pelo menos 20%, por exemplo, pelo menos 30%, por exemplo, pelo menos 40%, por exemplo, pelo menos 50%, por exemplo, pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 70%, por exemplo, pelo menos 75% das células que têm um indel em ou próximo de um sítio-alvo de uma molécula de gRNA aqui descrita (por exemplo, um indel de deslocação do quadro de leitura

ou qualquer uma das 5 principais indels produzidas por um dado sistema gRNA/CRISPR, por exemplo, como aqui descrito), mas que compreende menos de 5%, por exemplo, menos de 4%, menos de 3%, menos de 2% ou menos de 1%, de células compreendendo um indel em qualquer sítio fora do alvo da molécula de gRNA, por exemplo, um indel em qualquer sítio fora do alvo fora da região promotora de HBG1 e/ou HBG2. Em outras modalidades, a invenção proporciona ainda uma população de células, por exemplo, HSPCs, por exemplo, como aqui descrito, que compreende pelo menos 20%, por exemplo, pelo menos 30%, por exemplo, pelo menos 40%, por exemplo, pelo menos 50%, por exemplo, pelo menos 60%, por exemplo, pelo menos 70%, por exemplo, pelo menos 75%, por exemplo, pelo menos 80%, por exemplo, pelo menos 90%, por exemplo, pelo menos 95% de células que têm um indel dentro da região promotora de HBG1 e/ou HBG2 (por exemplo, em uma ou próximo de uma sequência que é pelo menos 90% homóloga à sequência-alvo do gRNA), mas que compreende menos de 5%, por exemplo, menos de 4%, menos de 3%, menos de 2% ou menos de 1%, de células compreendendo um indel em ou próximo de qualquer sítio fora do alvo fora da região promotora de HBG1 e/ou HBG2. Em modalidades, o indel fora do alvo é formado dentro de uma sequência de um gene, por exemplo, dentro de uma sequência de codificação de um gene. Em modalidades, o indel fora do alvo não é formado dentro de uma sequência de um gene, por exemplo, dentro de uma sequência de codificação de um gene, em uma célula de interesse, por exemplo, como aqui descrito.

X. Entrega/Construções

[0490] Os componentes, por exemplo, uma molécula Cas9 ou molécula de gRNA, ou ambas, podem ser entregues, formuladas ou administradas em uma variedade de formas. Como um exemplo não limitativo, a molécula de gRNA e a molécula Cas9 podem ser

formuladas (em uma ou mais composições), diretamente entregues ou administradas a uma célula na qual um evento de edição do genoma é desejado. Alternativamente, o ácido nucleico que codifica um ou mais componentes, por exemplo, uma molécula Cas9 ou molécula de gRNA, ou ambas, pode ser formulado (em uma ou mais composições), entregue ou administrado. Em um aspecto, a molécula de gRNA é fornecida como DNA que codifica a molécula de gRNA e a molécula Cas9 é fornecida como DNA codificante da molécula Cas9. Em uma modalidade, a molécula de gRNA e a molécula Cas9 são codificadas em moléculas de ácido nucleico separadas. Em uma modalidade, a molécula de gRNA e a molécula Cas9 são codificadas na mesma molécula de ácido nucleico. Em um aspecto, a molécula de gRNA é fornecida como RNA e a molécula Cas9 é fornecida como DNA que codifica a molécula Cas9. Em uma modalidade, a molécula de gRNA é fornecida com uma ou mais modificações, por exemplo, como aqui descrito. Em um aspecto, a molécula de gRNA é fornecida como RNA e a molécula Cas9 é fornecida como mRNA que codifica a molécula Cas9. Em um aspecto, a molécula de gRNA é fornecida como RNA e a molécula Cas9 é fornecida como uma proteína. Em uma modalidade, a molécula de gRNA e a molécula Cas9 são fornecidas como um complexo de proteína ribonuclear (RNP, do inglês "ribonuclear protein complex"). Em um aspecto, a molécula de gRNA é fornecida como DNA que codifica a molécula de gRNA e a molécula Cas9 é fornecida como uma proteína.

[0491] A entrega, por exemplo, entrega do RNP, (por exemplo, as células HSPC como aqui descritas) pode ser conseguida por, por exemplo, eletroporação (por exemplo, como conhecido na técnica) ou outro método que torne a membrana celular permeável ao ácido nucleico e/ou moléculas polipeptídicas. Em modalidades, o sistema CRISPR, por exemplo, o RNP como aqui descrito, é entregue por

eletroporação utilizando um Nucleofector-4D (Lonza), por exemplo, utilizando o programa CM-137 no Nucleofector-4D (Lonza). Em modalidades, o sistema CRISPR, por exemplo, o RNP como aqui descrito, é entregue por eletroporação utilizando uma voltagem de cerca de 800 volts a cerca de 2000 volts, por exemplo, de cerca de 1000 volts a cerca de 1800 volts, por exemplo, de cerca de 1200 volts a cerca de 1800 volts, por exemplo, de cerca de 1400 volts a cerca de 1800 volts, por exemplo, de cerca de 1600 volts a cerca de 1800 volts, por exemplo, cerca de 1700 volts, por exemplo, a uma voltagem de 1700 volts. Em modalidades, a largura/comprimento de pulso é de cerca de 10 ms a cerca de 50 ms, por exemplo, de cerca de 10 ms a cerca de 40 ms, por exemplo, de cerca de 10 ms a cerca de 30 ms, por exemplo, de cerca de 15 ms a cerca de 25 ms, por exemplo, cerca de 20 ms, por exemplo, 20 ms. Em modalidades, 1, 2, 3, 4, 5, ou mais, por exemplo, 2, por exemplo, 1 pulso, são utilizados. Em uma modalidade, o sistema CRISPR, por exemplo, o RNP, tal como aqui descrito, é entregue por eletroporação usando uma voltagem de cerca de 1700 volts (por exemplo, 1700 volts), uma largura de pulso de cerca de 20 ms (por exemplo, 20 ms), utilizando um pulso único (1). Em modalidades, a eletroporação é realizada utilizando um eletroporador Neon. Técnicas adicionais para tornar a membrana permeável são conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, compressão celular (por exemplo, como descrito em WO2015/023982 e WO2013/059343, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade), nano-agulhas (por exemplo, como descrito em Chiappini et al., Nat. Mat., 14; 532-39, ou US2014/0295558, cujo conteúdo é aqui incorporado como referência em sua totalidade) e nano-canudos (por exemplo, como descrito em Xie, ACS Nano, 7 (5); 4351-58, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade).

[0492] Quando um componente é entregue codificado no DNA, o

DNA incluirá tipicamente uma região de controle, por exemplo, compreendendo um promotor, para efetuar a expressão. Promotores úteis para sequências de moléculas Cas9 incluem promotores de controle CMV, EF-1alfa, MSCV, PGK, CAG. Promotores úteis para gRNAs incluem os promotores H1, EF-1a e U6. Promotores com forças semelhantes ou diferentes podem ser selecionados para ajustar a expressão dos componentes. As sequências que codificam uma molécula Cas9 podem compreender um sinal de localização nuclear (NLS), por exemplo, um NLS de SV40. Em uma modalidade, um promotor para uma molécula Cas9 ou uma molécula de gRNA pode ser, independentemente, induzível, específico de tecido ou específico de célula.

Entrega baseada em DNA de uma molécula Cas9 e/ou uma molécula de gRNA

[0493] O DNA que codifica moléculas Cas9 e/ou moléculas de gRNA pode ser administrado a sujeitos ou entregue nas células por métodos conhecidos na técnica ou como aqui descrito. Por exemplo, o DNA que codifica Cas9 e/ou codifica gRNA pode ser entregue, por exemplo, por vetores (por exemplo, vetores virais ou não-virais), métodos não baseados em vetor (por exemplo, usando DNA nu ou complexos de DNA), ou uma combinação destes.

[0494] Em algumas modalidades, o DNA que codifica Cas9 e/ou gRNA é entregue por um vetor (por exemplo, vetor/vírus, plasmídeo, minicírculo ou nanoplasmaídeo).

[0495] Um vetor pode compreender uma sequência que codifica uma molécula Cas9 e/ou uma molécula de gRNA. Um vetor também pode compreender uma sequência que codifica um peptídeo sinal (por exemplo, para localização nuclear, localização nucleolar, localização mitocondrial), fundido, por exemplo, a uma sequência de moléculas Cas9. Por exemplo, um vetor pode compreender uma ou mais

sequências de localização nuclear (por exemplo, a partir de SV40) fundidas com a sequência que codifica a molécula Cas9.

[0496] Um ou mais elementos reguladores/de controle, por exemplo, um promotor, um intensificador, um íntron, um sinal de poliadenilação, uma sequência de consenso de Kozak, sítios internos de entrada no ribossoma (IRES), uma sequência 2A e um aceitador ou dador de emenda podem ser incluídos nos vetores. Em algumas modalidades, o promotor é reconhecido pela RNA polimerase II (por exemplo, um promotor CMV). Noutras modalidades, o promotor é reconhecido pela RNA polimerase III (por exemplo, um promotor U6). Em algumas modalidades, o promotor é um promotor regulado (por exemplo, promotor induzível). Em outras modalidades, o promotor é um promotor constitutivo. Em algumas modalidades, o promotor é um promotor específico do tecido. Em algumas modalidades, o promotor é um promotor viral. Em outras modalidades, o promotor é um promotor não viral.

[0497] Em algumas modalidades, o vetor ou veículo de entrega é um minicírculo. Em algumas modalidades, o vetor ou veículo de entrega é um nanoplasmídeo.

[0498] Em algumas modalidades, o vetor ou veículo de entrega é um vetor viral (por exemplo, para geração de vírus recombinantes). Em algumas modalidades, o vírus é um vírus de DNA (por exemplo, vírus de dsDNA ou ssDNA). Em outras modalidades, o vírus é um vírus de RNA (por exemplo, um vírus ssRNA).

[0499] Vetores virais/vírus exemplares incluem, por exemplo, retrovírus, lentivírus, adenovírus, vírus adeno-associados (AAV), vírus vaccinia, poxvírus e vírus da herpes simples. A tecnologia de vetores virais é bem conhecida na técnica e é descrita, por exemplo, em Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY), e em outros

manuals de virologia e biologia molecular.

[0500] Em algumas modalidades, o vírus infeta células em divisão. Em outras modalidades, o vírus infecta células em não divisão. Em algumas modalidades, o vírus infecta tanto células em divisão como células em não divisão. Em algumas modalidades, o vírus pode integrar-se no genoma do hospedeiro. Em algumas modalidades, o vírus é manipulado para ter imunidade reduzida, por exemplo, em humanos. Em algumas modalidades, o vírus é competente para replicação. Noutras modalidades, o vírus é deficiente na replicação, por exemplo, tendo uma ou mais regiões codificantes para os genes necessários para ciclos adicionais de replicação e/ou empacotamento de virions substituídos por outros genes ou eliminados. Em algumas modalidades, os vírus causam a expressão transiente da molécula Cas9 e/ou da molécula de gRNA. Em outras modalidades, os vírus causam uma expressão duradoura, por exemplo, pelo menos 1 semana, 2 semanas, 1 mês, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1 ano, 2 anos, ou permanente, da molécula Cas9 e/ou a molécula de gRNA. A capacidade de empacotamento dos vírus pode variar, por exemplo, de pelo menos cerca de 4 kb a pelo menos cerca de 30 kb, por exemplo, pelo menos 5 kb, 10 kb, 15 kb, 20 kb, 25 kb, 30 kb, 35 kb, 40 kb, 45 kb ou 50 kb.

[0501] Em algumas modalidades, o DNA que codifica Cas9 e/ou gRNA é entregue por um retrovírus recombinante. Em algumas modalidades, o retrovírus (por exemplo, o vírus da leucemia murina Moloney) compreende uma transcriptase reversa, por exemplo, que permite a integração no genoma do hospedeiro. Em algumas modalidades, o retrovírus é competente para replicação. Noutras modalidades, o retrovírus é deficiente na replicação, por exemplo, tendo uma das mais regiões codificantes para os genes necessários para ciclos adicionais de replicação e empacotamento de vírion substituídos por outros genes, ou suprimidos.

[0502] Em algumas modalidades, o DNA codificando Cas9 e/ou gRNA é fornecido por um lentivírus recombinante. Por exemplo, o lentivírus é defeituoso na replicação, por exemplo, não compreende um ou mais genes necessários para a replicação viral.

[0503] Em algumas modalidades, o DNA que codifica Cas9 e/ou gRNA é entregue por um adenovírus recombinante. Em algumas modalidades, o adenovírus é manipulado para ter imunidade reduzida em humanos.

[0504] Em algumas modalidades, o DNA que codifica Cas9 e/ou gRNA é entregue por um AAV recombinante. Em algumas modalidades, o AAV pode incorporar o seu genoma no de uma célula hospedeira, por exemplo, uma célula-alvo, como aqui descrita. Em algumas modalidades, o AAV é um vírus adeno-associado auto-complementar (scAAV, do inglês "self-complementary adeno-associated virus"), por exemplo, um scAAV que empacota ambas as cadeias que emparelham em conjunto para formar DNA de cadeia dupla. Os serotipos de AAV que podem ser utilizados nos métodos revelados incluem, por exemplo, AAV1, AAV2, AAV2 modificado (por exemplo, modificações em Y444F, Y500F, Y730F e/ou S662V), AAV3, AAV3 modificado (por exemplo, modificações em Y705F, Y731F e/ou T492V), AAV4, AAV5, AAV6, AAV6 modificado (por exemplo, modificações em S663V e/ou T492V), AAV8, AAV 8.2, AAV9, AAV rh 10 e AAV pseudotipado, tal como AAV2/8, AAV2/5 e AAV2/6 também podem ser utilizados nos métodos divulgados.

[0505] Em algumas modalidades, o DNA que codifica Cas9 e/ou gRNA é distribuído por um vírus híbrido, por exemplo, um híbrido de um ou mais dos vírus aqui descritos.

[0506] Uma célula de empacotamento é usada para formar uma partícula de vírus que é capaz de infectar uma célula hospedeira ou alvo. Tal célula inclui uma célula 293, que pode empacotar adenovírus

e uma célula $\psi 2$ ou uma célula PA317, que pode empacotar retrovírus. Um vetor viral usado em terapia genética é geralmente gerado por uma linhagem de células produtoras que empacota um vetor de ácido nucléico em uma partícula viral. O vetor contém tipicamente as sequências virais mínimas necessárias para o empacotamento e subsequente integração em um hospedeiro ou célula-alvo (se aplicável), outras sequências virais sendo substituídas por um cassete de expressão que codifica a proteína a ser expressa. Por exemplo, um vetor AAV utilizado em terapia genética tipicamente apenas possui sequências de repetição terminal invertidas (ITR) do genoma de AAV que são necessárias para empacotamento e expressão genética na célula hospedeira ou alvo. As funções virais ausentes são fornecidas em trans pela linhagem celular de empacotamento. Daqui em diante, o DNA viral é empacotado em uma linhagem celular, que contém um plasmídeo auxiliar codificando os outros genes AAV, nomeadamente, rep e cap, mas sem as sequências de ITR. A linhagem celular também é infectada com adenovírus como auxiliar. O vírus auxiliar promove a replicação do vetor AAV e a expressão dos genes AAV do plasmídeo auxiliar. O plasmídeo auxiliar não é empacotado em quantidades significativas devido a uma falta de sequências de ITR. A contaminação com adenovírus pode ser reduzida, por exemplo, por tratamento térmico ao qual o adenovírus é mais sensível que o AAV.

[0507] Em uma modalidade, o vetor viral tem a capacidade de reconhecimento do tipo celular e/ou tipo de tecido. Por exemplo, o vetor viral pode ser pseudotipado com uma glicoproteína de envelope viral diferente/alternativa; manipulado com um receptor específico do tipo de célula (por exemplo, modificação genética das glicoproteínas do envelope viral para incorporar ligantes de direcionamento, tais como um ligante peptídico, um anticorpo de cadeia única, um fator de crescimento); e/ou modificado para ter uma ponte molecular com

especificidades duplas, com uma extremidade reconhecendo uma glicoproteína viral e a outra extremidade reconhecendo uma porção da superfície da célula-alvo (por exemplo, ligante-receptor, anticorpo monoclonal, avidina-biotina e conjugação química).

[0508] Em uma modalidade, o vetor viral alcança expressão específica do tipo de célula. Por exemplo, um promotor específico de tecido pode ser construído para restringir a expressão do transgene (Cas 9 e gRNA) apenas na célula-alvo. A especificidade do vetor também pode ser mediada pelo controle dependente de microRNA da expressão do transgene. Em uma modalidade, o vetor viral tem eficiência aumentada da fusão do vetor viral e uma membrana da célula-alvo. Por exemplo, uma proteína de fusão, tal como hemaglutina (HA) fusão-competente, pode ser incorporada para aumentar a absorção de vírus nas células. Em uma modalidade, o vetor viral tem a capacidade de localização nuclear. Por exemplo, um vírus que requer a quebra da parede celular (durante a divisão celular) e, portanto, não infectará uma célula não em divisão pode ser alterado para incorporar um peptídeo de localização nuclear na proteína matriz do vírus, permitindo assim a transdução de células não proliferantes.

[0509] Em algumas modalidades, o DNA que codifica Cas9 e/ou gRNA é entregue por um método não baseado em vetores (por exemplo, utilizando complexos de DNA ou DNA nu). Por exemplo, o DNA pode ser entregue, por exemplo, por sílica ou silicato (Ormosil) modificados organicamente, eletroporação, pistola de genes, sonoporação, magnetofecção, transfecção mediada por lipídeos, dendrímeros, nanopartículas inorgânicas, fosfatos de cálcio ou uma combinação destes.

[0510] Em algumas modalidades, o DNA que codifica Cas9 e/ou gRNA é entregue por uma combinação de um método baseado em vetores e um método não baseado em vetores. Por exemplo, um

virossomo compreende um lipossoma combinado com um vírus inativado (por exemplo, HIV ou vírus influenza), que pode resultar em transferência de genes mais eficiente, por exemplo, em uma célula epitelial respiratória, do que um método viral ou lipossômico apenas.

[0511] Em uma modalidade, o veículo de entrega é um vetor não viral. Em uma modalidade, o vetor não viral é uma nanopartícula inorgânica (por exemplo, ligada à carga útil à superfície da nanopartícula). Nanopartículas inorgânicas exemplificativas incluem, por exemplo, nanopartículas magnéticas (por exemplo, Fe_3O_4), ou de sílica. A superfície exterior da nanopartícula pode ser conjugada com um polímero carregado positivamente (por exemplo, polietilenimina, polilisina, poliserina) que permite a ligação (por exemplo, conjugação ou aprisionamento) de carga útil. Em uma modalidade, o vetor não viral é uma nanopartícula orgânica (por exemplo, aprisionamento da carga útil no interior da nanopartícula). Nanopartículas orgânicas exemplificativas incluem, por exemplo, lipossomas SNALP que contêm lipídeos catiônicos em conjunto com lipídeos auxiliares neutros que são revestidos com polietilenoglicol (PEG) e protamina e complexo de ácidos nucleicos revestido com revestimento lipídico.

[0512] Lipídeos e/ou polímeros exemplificativos para transferência de sistemas CRISPR ou ácido nucleico, por exemplo, vetores, codificando sistemas CRISPR ou seus componentes incluem, por exemplo, aqueles descritos em WO2011/076807, WO2014/136086, WO2005/060697, WO2014/140211, WO2012/031046, WO2013/103467, WO2013/006825, WO2012/006378, WO2015/095340 e WO2015/095346, os conteúdos de cada um dos anteriores são aqui incorporados por referência na sua totalidade. Em uma modalidade, o veículo tem modificações de direcionamento para aumentar a atualização da célula-alvo de nanopartículas e lipossomas, por exemplo, antígenos específicos de células, anticorpos monoclonais,

anticorpos de cadeia simples, aptâmeros, polímeros, açúcares e peptídeos penetrantes celulares. Em uma modalidade, o veículo utiliza peptídeos/polímeros fusogênicos e desestabilizadores de endossomos. Em uma modalidade, o veículo sofre alterações conformacionais provocadas por ácido (por exemplo, para acelerar o escape endossômico da carga). Em uma modalidade, um polímero clivável ao estímulo é usado, por exemplo, para liberação em um compartimento celular. Por exemplo, podem ser utilizados polímeros catiônicos à base de dissulfeto que são clivados no ambiente celular redutor.

[0513] Em uma modalidade, o veículo de entrega é um veículo de entrega biológico não viral. Em uma modalidade, o veículo é uma bactéria atenuada (por exemplo, naturalmente ou artificialmente manipulada para ser invasiva, mas atenuada para prevenir patogênese e expressando o transgene (por exemplo, *Listeria monocytogenes*, certas estirpes de *Salmonella*, *Bifidobacterium longum* e *Escherichia coli* modificada), bactérias possuindo tropismo nutricional e tecido-específico para alvejar tecidos específicos, bactérias com proteínas de superfície modificadas para alterar a especificidade do tecido alvo). Em uma modalidade, o veículo é um bacteriófago geneticamente modificado (por exemplo, fagos modificados que têm grande capacidade de empacotamento, menos imunogênicos, contendo as sequências de manutenção do plasmídeo de mamíferos e tendo ligantes de direcionamento incorporados). Em uma modalidade, o veículo é uma partícula semelhante a vírus de mamífero. Por exemplo, partículas virais modificadas podem ser geradas (por exemplo, por purificação das partículas "vazias" seguidas por montagem *ex vivo* do vírus com a carga desejada). O veículo também pode ser manipulado para incorporar ligantes de direcionamento para alterar a especificidade do tecido alvo. Em uma modalidade, o veículo é um lipossoma biológico. Por exemplo, o lipossoma biológico é uma partícula à base de fosfolipídio derivada de

células humanas (por exemplo, fantasmas de eritrócitos, que são hemácias divididas em estruturas esféricas derivadas do sujeito (por exemplo, o direcionamento de tecido pode ser conseguido por ligação de vários tecidos ou ligantes específicos de células), ou exossomos secretórios - sujeito (isto é, paciente) derivados de nanovesículas ligadas à membrana (30 - 100 nm) de origem endocítica (por exemplo, pode ser produzido a partir de vários tipos de células e pode, portanto, ser absorvido por células sem a necessidade de ligantes de direcionamento).

[0514] Em uma modalidade, uma ou mais moléculas de ácido nucleico (por exemplo, moléculas de DNA), com exceção dos componentes de um sistema de Cas, por exemplo, o componente da molécula Cas9 e/ou o componente de molécula de gRNA aqui descritos, são entregues. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico é fornecida ao mesmo tempo que um ou mais componentes do sistema Cas são entregues. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico é entregue antes ou depois (por exemplo, menos do que cerca de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 6 horas, 9 horas, 12 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 1 semana, 2 semanas ou 4 semanas) de um ou mais componentes do sistema Cas9 serem entregues. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico é entregue por um meio diferente do que um ou mais dos componentes do sistema de Cas9, por exemplo, o componente de molécula Cas9 e/ou o componente de molécula de gRNA, são entregues. A molécula de ácido nucleico pode ser entregue por qualquer um dos métodos de entrega aqui descritos. Por exemplo, a molécula de ácido nucleico pode ser entregue por um vetor viral, por exemplo, um lentivírus deficiente em integração, e o componente da molécula Cas9 e/ou o componente da molécula de gRNA podem ser entregues por eletroporação, por exemplo, de tal forma que a toxicidade causada por ácidos nucleicos (por exemplo, DNAs) possa ser reduzida.

Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico codifica uma proteína terapêutica, por exemplo, uma proteína aqui descrita. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico codifica uma molécula de RNA, por exemplo, uma molécula de RNA aqui descrita. Entrega de RNA codificante de uma molécula Cas9

[0515] RNA que codifica moléculas Cas9 (por exemplo, moléculas Cas9 ativas, moléculas Cas9 inativas ou proteínas de fusão Cas9 inativas) e/ou moléculas de gRNA, podem ser entregues nas células, por exemplo, as células-alvo aqui descritas, por métodos conhecidos na técnica ou como aqui descrito. Por exemplo, RNA que codifica Cas9 e/ou que codifica gRNA pode ser entregue, por exemplo, por microinjeção, eletroporação, transfecção mediada por lipídeos, entrega mediada por peptídeo, ou uma combinação dos mesmos.

Entrega da molécula Cas9 como proteína

[0516] As moléculas Cas9 (por exemplo, moléculas Cas9 ativas, moléculas Cas9 inativas ou proteínas de fusão Cas9 inativas) podem ser entregues nas células por métodos conhecidos na técnica ou como aqui descrito. Por exemplo, as moléculas de proteína Cas9 podem ser entregues, por exemplo, por microinjeção, eletroporação, transfecção mediada por lipídeos, entrega mediada por peptídeo, compressão celular ou abrasão (por exemplo, por nano-agulhas) ou uma combinação dos mesmos. A entrega pode ser acompanhada de DNA que codifica um gRNA ou por um gRNA, por exemplo, por pré-complexando o gRNA e a proteína Cas9 em um complexo de proteína ribonuclear (RNP).

[0517] Em um aspeto, a molécula Cas9, por exemplo, tal como aqui descrita, é entregue como uma proteína e a molécula de gRNA é entregue como um ou mais RNAs (por exemplo, como um dgRNA ou sgRNA, como aqui descrito). Em modalidades, a proteína Cas9 está complexada com a molécula de gRNA antes da entrega a uma célula,

por exemplo, como aqui descrito, como um complexo de proteína ribonuclear ("RNP"). Em modalidades, o RNP pode ser entregue nas células, por exemplo, aqui descrito, através de qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, eletroporação. Como aqui descrito, e sem estar ligado à teoria, pode ser preferível usar uma molécula de gRNA e molécula Cas9 o que resulta em elevada % de edição na sequência-alvo (por exemplo, >85%, >90%, >95%, >98% ou >99%) na célula-alvo, por exemplo, aqui descrita, mesmo quando a concentração de RNP entregue à célula é reduzida. Novamente, sem estar limitado pela teoria, entregar uma concentração reduzida ou baixa de RNP compreendendo uma molécula de gRNA que produz uma elevada % de edição na sequência-alvo na célula-alvo (incluindo a baixa concentração de RNP), pode ser benéfico porque pode reduzir a frequência e o número de eventos de edição fora do alvo. Em um aspecto, onde uma concentração baixa ou reduzida de RNP é para ser usada, o seguinte procedimento exemplificativo pode ser usado para gerar o RNP com uma molécula de dgRNA:

1. Fornecer a molécula Cas9 e o tracr em solução a uma concentração elevada (por exemplo, uma concentração superior à concentração final de RNP a ser entregue à célula) e permitir que os dois componentes se equilibrem;
2. Fornecer a molécula de crRNA e permitir que os componentes se equilibrem (formando assim uma solução de elevada concentração de RNP);
3. Diluir a solução RNP até à concentração desejada;
4. Entregar o referido RNP na referida concentração desejada às células-alvo, por exemplo, por eletroporação.

[0518] O procedimento acima pode ser modificado para utilização com moléculas de sgRNA omitindo a etapa 2, acima, e na etapa 1, fornecendo a molécula Cas9 e a molécula sgRNA em solução a elevada

concentração, e permitindo que os componentes se equilibrem. Em modalidades, a molécula Cas9 e cada componente de gRNA são proporcionados em solução em uma razão de 1:2 (Cas9:gRNA), por exemplo, uma razão molar de 1:2 de molécula Cas9:gRNA. Quando são utilizadas moléculas dgRNA, a razão, por exemplo, razão molar, é de 1:2:2 (cas9:tracr:crRNA). Em modalidades, o RNP é formado a uma concentração de 20 uM ou maior, por exemplo, uma concentração de cerca de 20 uM para cerca de 50 uM. Em modalidades, o RNP é formado a uma concentração de 10 uM ou maior, por exemplo, uma concentração de cerca de 10 uM para cerca de 30 uM. Em modalidades, o RNP é diluído para uma concentração final de 10 uM ou menos (por exemplo, uma concentração de cerca de 0,01 uM a cerca de 10 uM), em uma solução que compreende a célula-alvo (por exemplo, aqui descrita) para entrega à referida célula-alvo. Em modalidades, o RNP é diluído para uma concentração final de 3 uM ou menos (por exemplo, uma concentração de cerca de 0,01 uM a cerca de 3 uM), em uma solução que compreende a célula-alvo (por exemplo, aqui descrita) para entrega à referida célula-alvo. Em modalidades, o RNP é diluído para uma concentração final de 1 uM ou menos (por exemplo, uma concentração de cerca de 0,01 uM a cerca de 1 uM), em uma solução que compreende a célula-alvo (por exemplo, aqui descrita) para entrega à referida célula-alvo. Em modalidades, o RNP é diluído para uma concentração final de 0,3 uM ou menos (por exemplo, uma concentração de cerca de 0,01 uM a cerca de 0,3 uM), em uma solução que compreende a célula-alvo (por exemplo, aqui descrita) para entrega à referida célula-alvo. Em modalidades, o RNP é fornecido a uma concentração final de cerca de 3 uM em uma solução compreendendo a célula-alvo (por exemplo, aqui descrita) para entrega à referida célula-alvo. Em modalidades, o RNP é fornecido a uma concentração final de cerca de 2 uM em uma solução compreendendo a célula-alvo (por

exemplo, aqui descrita) para entrega à referida célula-alvo. Em modalidades, o RNP é fornecido a uma concentração final de cerca de 1 uM em uma solução compreendendo a célula-alvo (por exemplo, aqui descrita) para entrega à referida célula-alvo. Em modalidades, o RNP é fornecido a uma concentração final de cerca de 0,3 uM em uma solução compreendendo a célula-alvo (por exemplo, aqui descrita) para entrega à referida célula-alvo. Em modalidades, o RNP é fornecido a uma concentração final de cerca de 0,1 uM em uma solução compreendendo a célula-alvo (por exemplo, aqui descrita) para entrega à referida célula-alvo. Em modalidades, o RNP é fornecido a uma concentração final de cerca de 0,05 uM em uma solução compreendendo a célula-alvo (por exemplo, aqui descrita) para entrega à referida célula-alvo. Em modalidades, o RNP é fornecido a uma concentração final de cerca de 0,03 uM em uma solução compreendendo a célula-alvo (por exemplo, aqui descrita) para entrega à referida célula-alvo. Em modalidades, o RNP é fornecido a uma concentração final de cerca de 0,01 uM em uma solução compreendendo a célula-alvo (por exemplo, aqui descrita) para entrega à referida célula-alvo. Em modalidades, o RNP é formulado em um meio adequado para eletroporação. Em modalidades, o RNP é entregue às células, por exemplo, células HSPC, por exemplo, como aqui descrito, por eletroporação, por exemplo, utilizando condições de eletroporação aqui descritas.

[0519] Em aspectos, os componentes do sistema de edição de genes (por exemplo, sistema CRISPR) e/ou ácido nucleico que codifica um ou mais componentes do sistema de edição de genes (por exemplo, sistema CRISPR) são introduzidos nas células por perturbação mecânica das células, por exemplo, passando as referidas células através de um poro ou canal que restringe as células. Tal perturbação pode ser realizada em uma solução compreendendo os componentes do sistema de edição de genes (por exemplo, sistema CRISPR) e/ou

ácido nucleico que codifica um ou mais componentes do sistema de edição de genes (por exemplo, sistema CRISPR), por exemplo, como aqui descrito. Em modalidades, a perturbação é realizada utilizando um sistema TRIAMF, por exemplo, como aqui descrito, por exemplo, nos Exemplos e no pedido de patente PCT PCT/US17/54110 (aqui incorporado por referência na sua totalidade).

Entrega Bi-Modal ou Diferencial de Componentes

[0520] A entrega separada dos componentes de um sistema Cas, por exemplo, o componente da molécula Cas9 e o componente da molécula de gRNA e, mais particularmente, a entrega dos componentes por modos diferentes, pode melhorar o desempenho, por exemplo, melhorando a especificidade e segurança do tecido.

[0521] Em uma modalidade, a molécula Cas9 e a molécula de gRNA são entregues por modos diferentes, ou como por vezes aqui referidos como modos diferenciais. Modos diferentes ou diferenciais, como aqui utilizados, referem-se a modos de entrega que conferem propriedades farmacodinâmicas ou farmacocinéticas diferentes na molécula componente objeto, por exemplo, uma molécula Cas9, molécula de gRNA ou ácido nucleico molde. Por exemplo, os modos de entrega podem resultar em distribuição tecidual diferente, meia-vida diferente ou distribuição temporal diferente, por exemplo, em um compartimento, tecido ou órgão selecionado.

[0522] Alguns modos de entrega, por exemplo, a entrega por um vetor de ácido nucléico que persiste em uma célula, ou em descendência de uma célula, por exemplo, por replicação autônoma ou inserção em ácido nucléico celular, resultam em expressão e presença mais persistentes de um componente.

XI. Métodos de Tratamento

[0523] Os sistemas Cas9, por exemplo, uma ou mais moléculas de gRNA e uma ou mais moléculas Cas9, aqui descritas, são úteis para o

tratamento de doença em um mamífero, por exemplo, em um ser humano. Os termos "tratar", "tratado", "tratando" e "tratamento" incluem a administração de sistemas Cas9, por exemplo, uma ou mais moléculas de gRNA e uma ou mais moléculas Cas9, às células para prevenir ou retardar o início dos sintomas, complicações, ou indícios bioquímicos de uma doença, aliviando os sintomas ou parando ou inibindo a continuação do desenvolvimento da doença, afeção ou distúrbio. O tratamento também pode incluir a administração de uma ou mais (por exemplo, uma população de) células, por exemplo, HSPCs, que foram modificadas pela introdução de uma molécula de gRNA (ou mais de uma molécula de gRNA) da presente invenção, ou pela introdução de um sistema CRISPR, tal como aqui descrito, ou por qualquer um dos métodos de preparação das referidas células aqui descrito, para prevenir ou retardar o aparecimento dos sintomas, complicações ou indícios bioquímicos de uma doença, aliviando os sintomas ou parando ou inibindo a continuação do desenvolvimento da doença, afeção ou distúrbio. O tratamento pode ser profilático (para prevenir ou retardar o início da doença, ou para prevenir a manifestação de sintomas clínicos ou subclínicos da mesma) ou supressão terapêutica ou alívio dos sintomas após a manifestação da doença. O tratamento pode ser medido pelas medidas terapêuticas descritas aqui. Assim, os métodos de "tratamento" da presente invenção também incluem a administração de células alteradas pela introdução de um sistema Cas9 (por exemplo, uma ou mais moléculas de gRNA e uma ou mais moléculas Cas9) nas referidas células a um sujeito de modo a curar, reduzir a gravidade ou melhorar um ou mais sintomas de uma doença ou afeção, a fim de prolongar a saúde ou a sobrevivência de um sujeito para além do esperado na ausência de tal tratamento. Por exemplo, "tratamento" inclui o alívio de um sintoma de doença em um sujeito em pelo menos 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%,

14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais.

[0524] Sistemas Cas9 compreendendo moléculas gRNA compreendendo os domínios-alvo aqui descritos, por exemplo, na Tabela 1 e os métodos e células (por exemplo, como aqui descrito) são úteis para o tratamento de hemoglobinopatias.

Hemoglobinopatias

[0525] As hemoglobinopatias englobam um número de anemias de origem genética nas quais há uma produção diminuída e/ou destruição aumentada (hemólise) dos glóbulos vermelhos (hemácias). Estes também incluem defeitos genéticos que resultam na produção de hemoglobinas anormais com uma capacidade prejudicada concomitante para manter a concentração de oxigênio. Alguns desses distúrbios envolvem a incapacidade de produzir β -globina normal em quantidades suficientes, enquanto outros envolvem a incapacidade de produzir β -globina normal por completo. Estes distúrbios associados à proteína β -globina são referidos geralmente como β -hemoglobinopatias. Por exemplo, as β -talassemias resultam de um defeito parcial ou completo na expressão do gene da β -globina, levando a HbA deficiente ou ausente. A anemia falciforme resulta de uma mutação pontual no gene estrutural da β -globina, levando à produção de uma hemoglobina anormal (falciforme) (HbS). A HbS é propensa à polimerização, particularmente sob condições desoxigenadas. As hemácias de HbS são mais frágeis que as hemácias normais e sofrem hemólise mais prontamente, levando eventualmente à anemia.

[0526] Em uma modalidade, um defeito genético em globina alfa ou globina beta é corrigido, por exemplo, por recombinação homóloga, utilizando as moléculas Cas9 e moléculas de gRNA, por exemplo, sistemas de CRISPR, aqui descritos.

[0527] Em uma modalidade, um gene que codifica uma cópia de

globina alfa ou beta globina de tipo selvagem (por exemplo, sem mutação) é inserido no genoma da célula, por exemplo, em um sítio porto seguro, por exemplo, em um sítio porto seguro AAVS1, por recombinação homóloga, utilizando um sistema CRISPR e métodos aqui descritos.

[0528] Em uma modalidade, um gene associado a hemoglobinopatias é alvo, utilizando a molécula Cas9 e molécula de gRNA aqui descrita. Os alvos exemplificativos incluem, por exemplo, genes associados ao controle dos genes da globina gama. Em uma modalidade, o alvo é uma região HPFH não deleção.

[0529] A hemoglobina fetal (também a hemoglobina F ou HbF ou $\alpha_2\gamma_2$) é um tetrâmero de dois polipeptídeos alfa-globina adultos e dois polipeptídeos gama-globina semelhantes a beta. HbF é a principal proteína de transporte de oxigênio no feto humano durante os últimos sete meses de desenvolvimento no útero e no recém-nascido até aproximadamente 6 meses de idade. Funcionalmente, a hemoglobina fetal difere mais da hemoglobina adulta, pois é capaz de se ligar ao oxigênio com maior afinidade que a forma adulta, dando ao feto em desenvolvimento melhor acesso ao oxigênio da corrente sanguínea da mãe.

[0530] Em recém-nascidos, a hemoglobina fetal é quase completamente substituída pela hemoglobina do adulto em aproximadamente 6 meses após o nascimento. Em adultos, a produção de hemoglobina fetal pode ser reativada farmacologicamente, o que é útil no tratamento de doenças como hemoglobinopatias. Por exemplo, em certos pacientes com hemoglobinopatias, níveis mais elevados de expressão da globina gama podem compensar parcialmente a produção de genes defeituosos ou prejudicados da beta-globina, o que pode melhorar a gravidade clínica dessas doenças. Níveis aumentados de HbF ou números de células F (eritrócitos contendo HbF) podem

melhorar a gravidade da doença das hemoglobinopatias, por exemplo, beta-talassemia maior e anemia falciforme.

[0531] Como foi surpreendentemente descoberto, níveis aumentados de HbF ou contagens de células F podem estar associados à formação de indel em uma ou mais regiões HPFH não deleção em células, por exemplo, HSPCs e/ou células diferenciadas de HSPCs (por exemplo, HSPCs modificadas por uma ou mais moléculas gRNA descrito aqui). Em uma modalidade, a célula é uma célula-tronco hemopoiética ou célula progenitora.

Doenças falciformes

[0532] A doença falciforme é um grupo de distúrbios que afeta a hemoglobina. As pessoas com esse distúrbio têm moléculas de hemoglobina atípicas (hemoglobina S), que podem distorcer os glóbulos vermelhos em uma forma de foice ou crescente. Características próprias deste distúrbio incluem um baixo número de glóbulos vermelhos (anemia), infecções repetidas e episódios periódicos de dor.

[0533] Mutações no gene HBB causam doença falciforme. O gene T e HBB fornece instruções para a produção de beta-globina. Várias versões da beta-globina resultam de diferentes mutações no gene HBB. Uma particular mutação do gene HBB produz uma versão anormal da beta-globina conhecida como hemoglobina S (HbS). Outras mutações no gene HBB levam a versões anormais adicionais da beta-globina, como hemoglobina C (HbC) e hemoglobina E (HbE). As mutações do gene HBB também podem resultar em um nível invulgarmente baixo de beta-globina, isto é, talassemia beta.

[0534] Em pessoas com doença falciforme, pelo menos, uma das subunidades da beta-globina na hemoglobina é substituída pela hemoglobina S. Na anemia falciforme, que é uma forma comum de doença falciforme, a hemoglobina S substitui as duas subunidades da beta-globina na hemoglobina. Em outros tipos de doença falciforme,

apenas uma subunidade da beta-globina na hemoglobina é substituída pela hemoglobina S. A outra subunidade beta-globina é substituída por uma variante anormal diferente, tal como a hemoglobina C. Por exemplo, pessoas com doença falciforme de hemoglobina C (HbSC) têm moléculas de hemoglobina com hemoglobina S e hemoglobina C em vez de beta-globina. Se as mutações que produzem hemoglobina S e beta-talassemia ocorrerem juntas, os indivíduos terão a doença da hemoglobina S-beta talassêmica (HbSBetaThal).

Talassemia beta

[0535] Talassemia beta é uma doença do sangue que reduz a produção de hemoglobina. Em pessoas com talassemia beta, baixos níveis de hemoglobina levam à falta de oxigênio em muitas partes do corpo. Os indivíduos afetados também têm uma escassez de glóbulos vermelhos (anemia), que podem causar pele pálida, fraqueza, fadiga e complicações mais sérias. Pessoas com talassemia beta correm um risco maior de desenvolver coágulos sanguíneos anormais.

[0536] A talassemia beta é classificada em dois tipos, dependendo da gravidade dos sintomas: talassemia maior (também conhecida como anemia de Cooley) e talassemia intermédia. Dos dois tipos, a talassemia maior é mais grave.

[0537] Mutações no gene HBB causam talassemia beta. O gene HBB fornece instruções para a produção de beta-globina. Algumas mutações no gene HBB impedem a produção de qualquer beta-globina. A ausência de beta-globina é denominada talassemia beta-zero (B^0). Outras mutações no gene HBB permitem a produção de alguma beta-globina, mas em quantidades reduzidas, isto é, talassemia beta-plus (B^+). Pessoas com ambos os tipos foram diagnosticadas com talassemia maior e talassemia intermédia.

[0538] Em uma modalidade, um complexo de molécula Cas9/molécula de gRNA com direcionamento em um primeiro gene ou

locus é utilizado para tratar um distúrbio caracterizado por um segundo gene, por exemplo, uma mutação em um segundo gene. A título de exemplo, o direcionamento do primeiro gene, por exemplo, por edição ou entrega de carga, pode compensar ou inibir danos adicionais do efeito de um segundo gene, por exemplo, um segundo gene mutante. Em uma modalidade, o(s) alelo(s) do primeiro gene transportado pelo sujeito não é causador do distúrbio. Por exemplo, como aqui mostrado, as moléculas de gRNA que induzem a formação de indel em uma região não deleção de HPFH, por exemplo, uma região promotora de HBG1 e/ou HBG2, podem resultar em regulação positiva de hemoglobina fetal em células eritroides diferenciadas de HSPCs modificadas (como aqui descrito), e sem estar limitado pela teoria, essa regulação positiva da hemoglobina fetal compensa e corrige o gene HBB portador de uma mutação falciforme.

[0539] Em um aspecto, a invenção refere-se ao tratamento de um mamífero, por exemplo, um ser humano, com necessidade de aumento da hemoglobina fetal (HbF).

[0540] Em um aspecto, a invenção refere-se ao tratamento de um mamífero, por exemplo, um ser humano, que foi diagnosticado com, ou está em risco de desenvolver, uma hemoglobinopatia.

[0541] Em um aspecto, a hemoglobinopatia é uma hemoglobinopatia β . Em um aspecto, a hemoglobinopatia é a doença falciforme. Em um aspecto, a hemoglobinopatia é talassemia beta.

Métodos de Tratamento de Hemoglobinopatias

[0542] Em outro aspecto, a invenção fornece métodos de tratamento. Em aspectos, as moléculas de gRNA, os sistemas CRISPR e/ou as células da invenção são utilizados para tratar um paciente com necessidade dos mesmos. Em aspectos, o paciente é um mamífero, por exemplo, um ser humano. Em aspectos, o paciente tem hemoglobinopatia. Em modalidades, o paciente tem doença falciforme.

Em modalidades, o paciente tem talassemia beta.

[0543] Em um aspecto, o método de tratamento compreende a administração a um mamífero, por exemplo, um ser humano, de uma ou mais moléculas de gRNA, por exemplo, uma ou mais moléculas de gRNA compreendendo um domínio-alvo descrito na Tabela 1 e uma ou mais moléculas Cas9 aqui descritas.

[0544] Em um aspecto, o método de tratamento compreende a administração a um mamífero uma população celular, em que a população celular é uma população celular de um mamífero, por exemplo, um ser humano, que foi administrada com uma ou mais moléculas de gRNA, por exemplo, uma ou mais moléculas de gRNA compreendendo um domínio-alvo descrito na Tabela 1 e uma ou mais moléculas Cas9 aqui descritas, por exemplo, um sistema CRISPR como aqui descrito. Em uma modalidade, a administração da uma ou mais moléculas de gRNA ou sistemas CRISPR à célula é realizada *in vivo*. Em uma modalidade, a administração da uma ou mais moléculas de gRNA ou sistemas CRISPR à célula é realizada *ex vivo*.

[0545] Em um aspecto, o método de tratamento compreende a administração ao mamífero, por exemplo, ser humano, de uma quantidade eficaz de uma população de células compreendendo células que compreendem ou uma vez compreenderam uma ou mais moléculas de gRNA, por exemplo, uma ou mais moléculas de gRNA compreendendo um domínio-alvo descrito na Tabela 1, e uma ou mais moléculas Cas9 aqui descritas ou a descendência das referidas células. Em uma modalidade, as células são alogênicas para o mamífero. Em uma modalidade, as células são autólogas ao mamífero. Em uma modalidade, as células são colhidas do mamífero, manipuladas *ex vivo* e devolvidas ao mamífero.

[0546] Em aspectos, as células compreendendo ou uma vez compreenderam uma ou mais moléculas de gRNA, por exemplo, uma

ou mais moléculas de gRNA compreendendo um domínio-alvo descrito na Tabela 1 e uma ou mais moléculas Cas9 aqui descritas, ou a descendência das referidas células, compreendem células-tronco ou células progenitoras. Em um aspecto, as células-tronco são células-tronco hematopoiéticas. Em um aspecto, as células progenitoras são células progenitoras hematopoiéticas. Em um aspecto, as células compreendem células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras hematopoiéticas, por exemplo, são HSPCs. Em um aspecto, as células compreendem, por exemplo, consistem em células CD34+. Em um aspecto, as células estão substancialmente isentas de células CD34-. Em um aspecto, as células compreendem, por exemplo, consistem em células-tronco CD34+/CD90+. Em um aspecto, as células compreendem, por exemplo, consistem em células CD34+/CD90-. Em um aspecto, as células são uma população compreendendo um ou mais dos tipos de células descritos acima ou aqui descritos.

[0547] Em uma modalidade, a divulgação fornece um método para o tratamento de uma hemoglobinopatia, por exemplo, doença falciforme ou beta-talassemia, ou um método para aumentar a expressão de hemoglobina fetal em um mamífero, por exemplo, um ser humano, em necessidade do mesmo, compreendendo o método:

- a) proporcionar, por exemplo, por colheita ou isolamento, uma população de HSPCs (por exemplo, células CD34+) de um mamífero;
- b) proporcionar as referidas células *ex vivo*, por exemplo, em um meio de cultura de células, opcionalmente na presença de uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo, pelo menos, um expansor de células-tronco, em que a referida população de HSPCs (por exemplo, células CD34+) se expande para um maior grau de uma população não tratada;
- c) contatar a população de HSPCs (por exemplo, células CD34+) com uma quantidade eficaz de: uma composição compreendendo, pelo

menos, uma molécula gRNA compreendendo um domínio-alvo descrito aqui, por exemplo, um domínio-alvo descrito na Tabela 1, ou um ácido nucleico que codifica a referida molécula de gRNA e, pelo menos, uma molécula Cas9, por exemplo, aqui descrita, ou um ácido nucleico que codifica a referida molécula Cas9, por exemplo, um ou mais RNPs como aqui descrito por exemplo, com um sistema CRISPR descrito aqui;

d) causar, pelo menos, uma modificação em, pelo menos, uma porção das células da população (por exemplo, pelo menos, uma porção de HSPCs, por exemplo, células CD34+, da população), pelo que, por exemplo, quando as referidas HSPCs são diferenciadas em células de uma linhagem eritroide, por exemplo, glóbulos vermelhos, a expressão de hemoglobina fetal é aumentada, por exemplo, relativamente a células não contatadas de acordo com o etapa c); e

f) o retorno de uma população de células compreendendo as referidas HSPCs modificadas (por exemplo, células CD34+) ao mamífero.

[0548] Em um aspecto, as HSPCs são alogênicas ao mamífero ao qual são retornadas. Em um aspecto, as HSPCs são autólogas ao mamífero ao qual são retornadas. Em aspectos, as HSPCs são isoladas da medula óssea. Em aspectos, as HSPCs são isoladas do sangue periférico, por exemplo, sangue periférico mobilizado. Em aspectos, o sangue periférico mobilizado é isolado de um sujeito a quem foi administrado um G-CSF. Em aspectos, o sangue periférico mobilizado é isolado de um sujeito a quem foi administrado um agente de mobilização diferente de G-CSF, por exemplo, Plerixafor® (AMD3100). Em outros aspectos, o sangue periférico mobilizado é isolado de um sujeito a quem foi administrado uma combinação de G-CSF e Plerixafor® (AMD3100). Em aspectos, as HSPCs são isoladas do sangue do cordão umbilical. Em modalidades, as células são derivadas de um paciente com hemoglobinopatia, por exemplo, um paciente com doença falciforme ou um paciente com talassemia, por exemplo,

talassemia beta.

[0549] Em outras modalidades do método, o método compreende ainda, depois de fornecer uma população de HSPCs (por exemplo, células CD34+), por exemplo, a partir de uma fonte acima descrita, o etapa de enriquecimento da população de células para HSPCs (por exemplo, células CD34+). Em modalidades do método, após o referido enriquecimento, a população de células, por exemplo, HSPCs, é substancialmente isenta de células CD34-.

[0550] Em modalidades, a população de células que é devolvida ao mamífero inclui, pelo menos, 70% de células viáveis. Em modalidades, a população de células que é devolvida ao mamífero inclui, pelo menos, 75% de células viáveis. Em modalidades, a população de células que é devolvida ao mamífero inclui, pelo menos, 80% de células viáveis. Em modalidades, a população de células que é devolvida ao mamífero inclui, pelo menos, 85% de células viáveis. Em modalidades, a população de células que é devolvida ao mamífero inclui, pelo menos, 90% de células viáveis. Em modalidades, a população de células que é devolvida ao mamífero inclui, pelo menos, 95% de células viáveis. Em modalidades, a população de células que é devolvida ao mamífero inclui, pelo menos, 99% de células viáveis. A viabilidade pode ser determinada por coloração de uma porção representativa da população de células para um marcador de viabilidade celular, por exemplo, como é conhecido na técnica.

[0551] Em uma outra modalidade, a divulgação fornece um método para o tratamento de uma hemoglobinopatia, por exemplo, doença falciforme ou beta-talassemia, ou um método para aumentar a expressão de hemoglobina fetal em um mamífero, por exemplo, um ser humano, em necessidade do mesmo, compreendendo o método, os etapas de:

a) proporcionar, por exemplo, por colheita ou isolamento, uma

população de HSPCs (por exemplo, células CD34+) de um mamífero, por exemplo, da medula óssea de um mamífero;

b) isolar as células CD34+ da população de células do etapa a);

c) proporcionar as referidas células CD34+ ex vivo, e cultivar as referidas células, por exemplo, em um meio de cultura de células, na presença de uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo, pelo menos, um expansor de células-tronco, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-yl)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, em uma concentração de cerca de 0,5 a cerca de 0,75 micromolar, pelo que a referida população de células CD34+ se expande em maior grau do que uma população não tratada;

d) introduzir nas células da população de células CD34+ uma quantidade eficaz de: uma composição compreendendo uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, e uma molécula de gRNA, por exemplo, como aqui descrito, por exemplo, opcionalmente onde a molécula Cas9 e a molécula de gRNA estão na forma de um RNP, por exemplo, como aqui descrito, e opcionalmente onde a referida introdução é por eletroporação, por exemplo, como aqui descrito, do referido RNP nas referidas células;

e) causar, pelo menos, uma modificação genética em, pelo menos, uma porção das células da população (por exemplo, pelo menos, uma porção de HSPCs, por exemplo, células CD34+, da população), pelo que uma indel, por exemplo, como descrito aqui, é criada em ou próximo do sítio genômico complementar ao domínio-alvo do gRNA introduzido na etapa d);

f) opcionalmente, cultivar adicionalmente as referidas células após a referida introdução, por exemplo, em um meio de cultura de células, na presença de uma quantidade eficaz de uma composição

compreendendo, pelo menos, um expensor de células-tronco, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, em uma concentração de cerca de 0,5 a cerca de 0,75 micromolar, tal que as células se expandem pelo menos 2 vezes, por exemplo, pelo menos 4 vezes, por exemplo, pelo menos 5 vezes;

g) criopreservar as referidas células; e

h) retornar as células ao mamífero, em que,

as células devolvidas ao mamífero compreendem células que 1) mantêm a capacidade de se diferenciarem em células da linhagem eritroide, por exemplo, glóbulos vermelhos; 2) quando diferenciadas em glóbulos vermelhos, produzem um nível aumentado de hemoglobina fetal, por exemplo, relativamente a células não modificadas pelo gRNA da etapa e), por exemplo, produzem, pelo menos, 6 picogramas de hemoglobina fetal por célula.

[0552] Em um aspecto, as HSPCs são alogênicas ao mamífero ao qual são retornadas. Em um aspecto, as HSPCs são autólogas ao mamífero ao qual são retornadas. Em aspectos, as HSPCs são isoladas da medula óssea. Em aspectos, as HSPCs são isoladas do sangue periférico, por exemplo, sangue periférico mobilizado. Em aspectos, o sangue periférico mobilizado é isolado de um sujeito a quem foi administrado um G-CSF. Em aspectos, o sangue periférico mobilizado é isolado de um sujeito a quem foi administrado um agente de mobilização diferente de G-CSF, por exemplo, Plerixafor® (AMD3100). Em outros aspectos, o sangue periférico mobilizado é isolado de um sujeito a quem foi administrado uma combinação de G-CSF e Plerixafor® (AMD3100). Em aspectos, as HSPCs são isoladas do sangue do cordão umbilical. Em modalidades, as células são derivadas de um paciente com hemoglobinopatia, por exemplo, um paciente com

doença falciforme ou um paciente com talassemia, por exemplo, talassemia beta.

[0553] Em modalidades do método acima, a etapa recitado b) resulta em uma população de células que é substancialmente isenta de células CD34-.

[0554] Noutras modalidades do método, o método compreende ainda, depois de fornecer uma população de HSPCs (por exemplo, células CD34+), por exemplo, a partir de uma fonte acima descrita, a população de células enriquecida para HSPCs (por exemplo, células CD34+).

[0555] Em modalidades adicionais destes métodos, a população de HSPCs modificados (por exemplo, células-tronco CD34+) que tem a capacidade de diferenciar a expressão aumentada de hemoglobina fetal é criopreservada e armazenada antes de ser reintroduzida no mamífero. Em modalidades, a população criopreservada de HSPCs tendo a capacidade de se diferenciar em células da linhagem eritroide, por exemplo, glóbulos vermelhos e/ou quando diferenciadas em células da linhagem eritroide, por exemplo, glóbulos vermelhos, produz um nível aumentado de hemoglobina fetal, sendo descongelada e depois reintroduzida no mamífero. Em uma modalidade adicional destes métodos, o método compreende quimioterapia e/ou terapia de radiação para remover ou reduzir o progenitor hematopoiético endógeno ou células-tronco no mamífero. Em uma modalidade adicional destes métodos, o método não compreende uma etapa de quimioterapia e/ou terapia de radiação para remover ou reduzir o progenitor hematopoiético endógeno ou células-tronco no mamífero. Em uma modalidade adicional destes métodos, o método compreende quimioterapia e/ou terapia de radiação para reduzir parcialmente (por exemplo, a linfodepleção parcial) o progenitor hematopoiético endógeno ou células-tronco no mamífero. Em modalidades, o paciente é tratado com uma

dose totalmente de linfodepleção de bussulfano antes da reintrodução das HSPCs modificadas no mamífero. Em modalidades, o doente é tratado com uma dose parcialmente de linfodepleção de bussulfano antes da reintrodução das HSPC modificadas no mamífero.

[0556] Em modalidades, as células são postas em contato com RNP compreendendo uma molécula Cas9, por exemplo, como aqui descrito, complexado com um gRNA para uma região de HPFH não deleção, por exemplo, como aqui descrito (por exemplo, compreendendo um domínio-alvo listado na Tabela 1).

[0557] Em modalidades, o expansor de células-tronco é o Composto 1. Em modalidades, o expansor de células-tronco é o Composto 2. Em modalidades, o expansor de células-tronco é o Composto 3. Em modalidades, o expansor de células-tronco é (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol. Em modalidades, o expansor de células-tronco é (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol e está presente a uma concentração de 2-0,1 micromolar, por exemplo, 1-0,25 micromolar, por exemplo, 0,75-0,5 micromolar. Em modalidades, o expansor de células-tronco é uma molécula descrita em WO2010/059401 (por exemplo, a molécula descrita no Exemplo 1 de WO2010/059401).

[0558] Em modalidades, as células, por exemplo, HSPCs, por exemplo, como aqui descritas, são cultivadas *ex vivo* durante um período de cerca de 1 hora a cerca de 15 dias, por exemplo, um período de cerca de 12 horas a cerca de 12 dias, por exemplo, um período de cerca de 12 horas a 4 dias, por exemplo, um período de cerca de 1 dia a cerca de 4 dias, por exemplo, um período de cerca de 1 dia a cerca de 2 dias, por exemplo, um período de cerca de 1 dia ou um período de cerca de 2 dias antes da etapa de contatar as células com um sistema CRISPR, por exemplo, aqui descrito. Em modalidades, a referida

cultura, antes da referida etapa de contato é em uma composição (por exemplo, um meio de cultura celular), que compreende um expansor de células-tronco, por exemplo, aqui descrito, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(11H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(11H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol a uma concentração de cerca de 0,25 uM a cerca de 1 uM, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(11H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol a uma concentração de cerca de 0,75-0,5 micromolar. Em modalidades, as células são cultivadas *ex vivo* por um período não superior a cerca de 1 dia, por exemplo, não mais que cerca de 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 hora(s) após o etapa de colocar as células em contato com um sistema CRISPR, por exemplo, aqui descrito, por exemplo, em um meio de cultura de células que compreende um expansor de células-tronco, por exemplo, descrito aqui, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(11H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol a uma concentração de cerca de 0,25 uM a cerca de 1 uM, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol a uma concentração de cerca de 0,75-0,5 micromolar. Noutras modalidades, as células são cultivadas *ex vivo* durante um período de cerca de 1 hora a cerca de 15 dias, por exemplo, um período de cerca de 12 horas a cerca de 10 dias, por exemplo, um período de cerca de 1 dia a cerca de 10 dias, por exemplo, um período de cerca de 1 dia a cerca de 5 dias, por exemplo, um período de cerca de 1 dia a cerca de 4 dias, por exemplo, um período de cerca de 2 dias a cerca de 4 dias, por exemplo, um período de cerca de 2 dias, cerca de 3 dias ou cerca de 4 dias, após a etapa de contatar as células com um sistema CRISPR, por exemplo, aqui descrito, em um meio de cultura celular, por exemplo, que compreende um expansor de células-

tronco, por exemplo, aqui descrito, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(11H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol a uma concentração de cerca de 0,25 mM a cerca de 1 mM, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(11H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol a uma concentração de cerca de 0,75-0,5 micromolar. Em modalidades, as células são cultivadas *ex vivo* (por exemplo, cultivadas antes da referida etapa de contato e/ou cultivadas após o referido etapa de contato) durante um período de cerca de 1 hora a cerca de 20 dias, por exemplo, um período de cerca de 6 a 12 dias, por exemplo, um período de cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 11 ou cerca de 12 dias.

[0559] Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, cerca de 1 milhão de células (por exemplo, pelo menos, cerca de 1 milhão de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, cerca de 2 milhões de células (por exemplo, pelo menos, cerca de 2 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, cerca de 3 milhões de células (por exemplo, pelo menos, cerca de 3 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvido ao mamífero compreende, pelo menos, cerca de 4 milhões de células (por exemplo, pelo menos, cerca de 4 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, cerca de 5 milhões de células (por exemplo, pelo menos, cerca de 5 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células

compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, cerca de 6 milhões de células (por exemplo, pelo menos, cerca de 6 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, 1 milhão de células (por exemplo, pelo menos, 1 milhão de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, 2 milhões de células (por exemplo, pelo menos, 2 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, 3 milhões de células (por exemplo, pelo menos, 3 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, 4 milhões de células (por exemplo, pelo menos, 4 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, 5 milhões de células (por exemplo, pelo menos, 5 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, 6 milhões de células (por exemplo, pelo menos, 6 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, cerca de 1 milhão de células (por exemplo, pelo menos, cerca de 1 milhão de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, cerca de 2 milhões de células (por exemplo, pelo menos, cerca de 2 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de

células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, cerca de 3 milhões de células (por exemplo, pelo menos, cerca de 3 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, cerca de 4 milhões de células (por exemplo, pelo menos, cerca de 4 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, cerca de 5 milhões de células (por exemplo, pelo menos, cerca de 5 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende, pelo menos, cerca de 6 milhões de células (por exemplo, pelo menos, cerca de 6 milhões de células CD34+) por kg. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende cerca de 2×10^6 células (por exemplo, cerca de 2×10^6 células CD34+) por kg de peso corporal do paciente. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende pelo menos 2×10^6 células (por exemplo, cerca de 2×10^6 células CD34+) por kg de peso corporal do paciente. Em modalidades, a população de células compreendendo as HSPCs modificadas devolvidas ao mamífero compreende entre 2×10^6 células (por exemplo, cerca de 2×10^6 CD34+ células) por kg de peso corporal do paciente e 10×10^6 células (por exemplo, cerca de 2×10^6 células CD34+) por kg de peso corporal do paciente. Em modalidades, as células que compreendem as células modificadas são infundidas no paciente. Em modalidades, antes das células que compreendem as HSPCs modificadas serem infundidas no paciente, o paciente é tratado com uma terapia de linfodepleção, por exemplo, tratado com busulfan, por exemplo, tratado com um regime de busulphan completo de

linfodepleção ou, por exemplo, tratado com um regime de busulfan de intensidade reduzida de linfodepleção.

[0560] Em modalidades, é resultado de qualquer um dos métodos descritos acima o paciente possuir, pelo menos, 80% das suas células CD34+ circulantes compreendendo uma indel em ou próximo do sítio genômico complementar ao domínio-alvo da molécula de gRNA usada no método, por exemplo, como medido, pelo menos 15 dias, por exemplo, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50 ou pelo menos 60 dias após a reintrodução das células no mamífero. Sem estar limitado pela teoria, foi surpreendentemente descoberto aqui que os padrões indel e indel (incluindo grandes deleções) observados quando sistemas de edição genética, por exemplo, sistemas CRISPR, por exemplo, sistemas CRISPR compreendendo uma molécula de gRNA direcionando para a região HBG1 e/ou HBG2, por exemplo, como descrito aqui, são introduzidos em HSPCs, e essas células são transplantadas para organismos, certos gRNAs produzem células compreendendo indels e padrões indel (incluindo grandes indels) que permanecem detectáveis na população de células editadas e sua descendência, no organismo, e persistem por mais de 8 semanas, 12 semanas, 16 semanas ou 20 semanas. Sem estar limitado pela teoria, uma população de células que compreende um padrão indel ou indel particular (incluindo deleção grande) que persiste dentro de uma população de células detectável, por exemplo, mais de 16 semanas ou mais de 20 semanas após a introdução em um organismo (por exemplo, paciente), poderia ser benéfico para produzir uma melhoria de longo prazo de uma doença ou afeição, por exemplo, aqui descrita (por exemplo, uma hemoglobinopatia, por exemplo, doença falciforme ou uma talassemia) do que as células (ou a sua descendência) que, após a introdução em um organismo ou paciente, perdem um ou mais indels (incluindo deleções grandes). Em modalidades, o indel ou padrão de

indel persistente está associado com a hemoglobina fetal regulada positivamente (por exemplo, em descendência eritroide das referidas células). Assim, em modalidades, a presente divulgação proporciona populações de células, por exemplo, HSPCs, por exemplo, tal como aqui descritos, que compreendem um ou mais indels (incluindo grandes deleções) que persistem (por exemplo, permanecem detectáveis, por exemplo, em uma população de células ou a sua descendência) no sangue e/ou na medula óssea por mais de 8 semanas, mais de 12 semanas, mais de 16 semanas ou mais de 20 semanas após a introdução em um organismo, por exemplo, paciente.

[0561] Em modalidades, é resultado de qualquer um dos métodos descritos acima o paciente possuir, pelo menos, 20% das suas células CD34+ da medula óssea compreendendo uma indel em ou próximo do sítio genômico complementar ao domínio-alvo da molécula de gRNA usada no método, por exemplo, como medido, pelo menos 15 dias, por exemplo, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50 ou pelo menos 60 dias após a reintrodução das células no mamífero.

[0562] Em modalidades, as HSPCs que são reintroduzidas no mamífero são capazes de diferenciar *in vivo* em células da linhagem eritroide, por exemplo, glóbulos vermelhos, e as referidas células diferenciadas exibem níveis aumentados de hemoglobina fetal, por exemplo, produzem pelo menos 6 picogramas de hemoglobina fetal por célula, por exemplo, pelo menos 7 picogramas de hemoglobina fetal por célula, pelo menos 8 picogramas de hemoglobina fetal por célula, pelo menos 9 picogramas de hemoglobina fetal por célula, pelo menos 10 picogramas de hemoglobina fetal por célula, por exemplo, entre cerca de 9 e cerca de 10 picogramas de hemoglobina fetal por célula, por exemplo, tal que a hemoglobinopatia é tratada no mamífero.

[0563] Será entendido que quando uma célula é caracterizada como tendo hemoglobina fetal aumentada, isso inclui modalidades nas

quais uma descendência, por exemplo, uma descendência diferenciada, dessa célula exibe hemoglobina fetal aumentada. Por exemplo, nos métodos aqui descritos, a célula CD34+ alterada ou modificada (ou população celular) pode não expressar hemoglobina fetal aumentada, mas quando diferenciada em células da linhagem eritroide, por exemplo, glóbulos vermelhos, as células expressam hemoglobina fetal aumentada, por exemplo, hemoglobina fetal aumentada em relação a uma célula não modificada ou inalterada sob condições similares.

XII. Métodos de Cultura e Métodos de Produção de Células

[0564] A descrição proporciona métodos de cultura de células, por exemplo, HSPCs, por exemplo, células-tronco hematopoiéticas, por exemplo, células CD34+ modificadas, ou a serem modificadas, com as moléculas de gRNA aqui descritas.

Inibidores da via de reparação de DNA

[0565] Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que o padrão de indels produzido por uma dada molécula de gRNA em uma sequência-alvo particular seja um produto de cada um dos mecanismos de reparação de DNA ativos dentro da célula (por exemplo, união de extremidade não-homóloga, união de extremidade mediada por micro-homologia, etc.). Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que uma indel particularmente favorável pode ser selecionada para ou enriquecida por colocar as células a serem editadas em contato com um inibidor de uma via de reparação de DNA que não produz a indel desejada. Assim, as moléculas de gRNA, sistemas CRISPR, métodos e outros aspectos da invenção podem ser realizados em combinação com tais inibidores. Exemplos de tais inibidores incluem os descritos em, por exemplo, WO2014/130955, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade. Em modalidade, o inibidor é um inibidor de DNAPKc, por exemplo, NU7441.

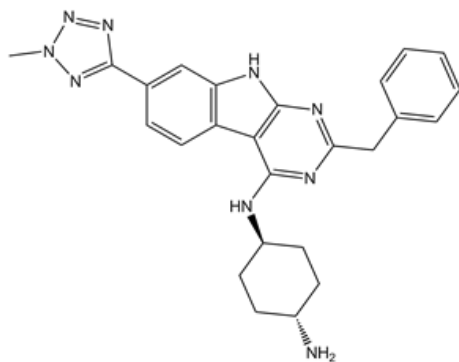
Expansores de Células-Tronco

[0566] Em um aspecto, a invenção refere-se a cultivar as células, por exemplo, HSPCs, por exemplo, células CD34+ modificadas, ou a serem modificadas, com as moléculas de gRNA aqui descritas, com um ou mais agentes que resultam em uma taxa de expansão aumentada, nível de expansão aumentado, ou aumento do enxerto em relação às células não tratadas com o agente. Tais agentes são aqui referidos como expansores de células-tronco.

[0567] Em um aspecto, o um ou mais agentes que resultam em uma taxa de expansão aumentada ou em um nível de expansão aumentado, relativamente às células não tratadas com o agente, por exemplo, o expansor de células-tronco, compreende um agente que é um inibidor da via do receptor de hidrocarboneto de arila (AHR). Em aspectos, o expansor de células-tronco é um composto descrito em WO2013/110198 ou um composto descrito em WO2010/059401, cujos conteúdos são incorporados por referência na sua totalidade.

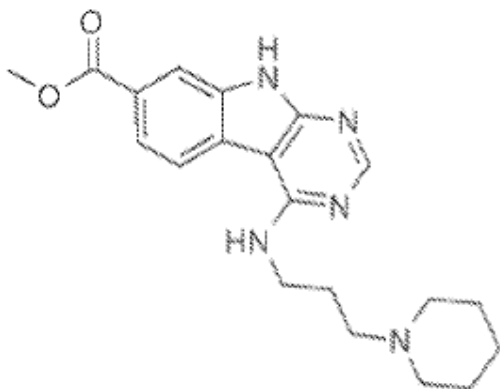
[0568] Em um aspecto, o um ou mais agentes que resulta em um aumento da taxa de expansão ou aumento do nível de expansão, relativamente às células não tratadas com o agente, é um derivado de pirimido[4,5-b]indol, por exemplo, como divulgado no documento WO2013/110198, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade. Em uma modalidade, o agente é o composto 1 ((1r,4r)-N¹-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina):

Composto 1



[0569] Em outro aspecto, o agente é o Composto 2 (metil 4-(3-piperidin-1-ilpropilamina)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato):

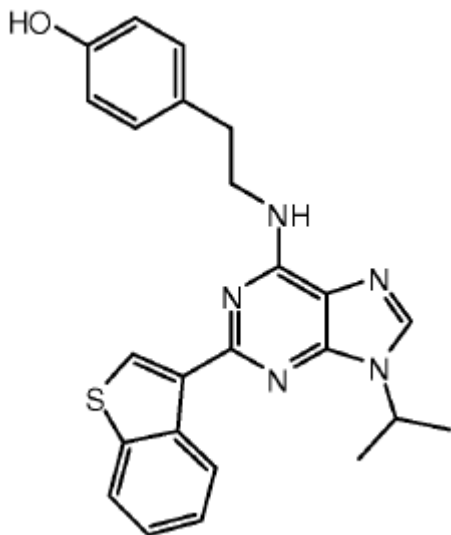
Composto 2:



[0570] Em um outro aspecto, o um ou mais agentes que resultam em um aumento da taxa de expansão ou aumento do nível de expansão, relativamente às células não tratadas com o agente, é um agente divulgado no documento WO2010/059401, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

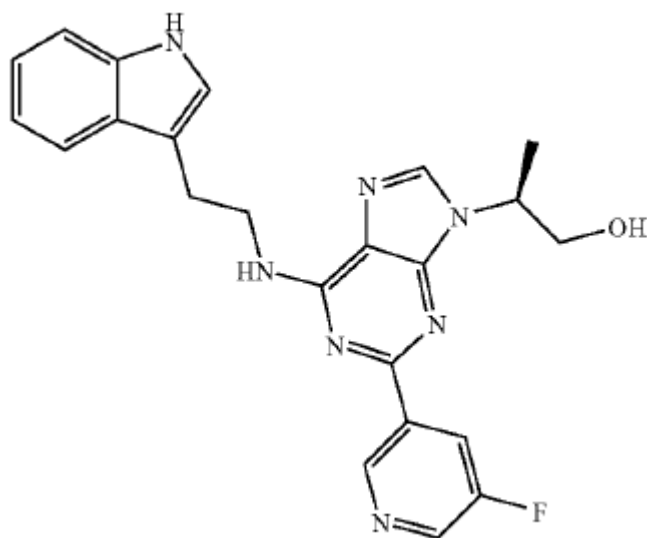
[0571] Em uma modalidade, o expansor de células-tronco é o composto 3: 4-(2-(2-(benzo[b]tiofeno-3-il)-9-isopropil-9H-purin-6-ilamino)etil)fenol, ou seja, o composto é do exemplo 1 de WO2010/059401, com a seguinte estrutura:

Composto 3:



[0572] Em outro aspeto, o expansor de células-tronco é o (S)-2-(6-(2-(11H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol ((S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, isto é, é o composto 157S de acordo com WO2010/059401), possuindo a seguinte estrutura:

(S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol:



[0573] Em modalidades, a população de HSPCs é colocada em contato com o expansor de células-tronco, por exemplo, composto 1, composto 2, composto 3, (S)-2-(6-(2-(11H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, ou suas combinações (por exemplo, uma combinação do composto 1 e (S)-2-(6-(2-(11H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol) antes da introdução do sistema CRISPR (por exemplo, molécula de gRNA e/ou molécula Cas9 da invenção) nas referidas HSPCs. Em modalidades, a população de HSPCs é colocada em contato com o expansor de células-tronco, por exemplo, composto 1, composto 2, composto 3, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, ou suas combinações (por exemplo, uma combinação do composto 1 e (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-

9H-purin-9-il)propan-1-ol), após a introdução do sistema CRISPR (por exemplo, molécula de gRNA e/ou molécula Cas9 da invenção) nas referidas HSPCs. Em modalidades, a população de HSPCs é colocada em contato com o expansor de células-tronco, por exemplo, composto 1, composto 2, composto 3, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, ou suas combinações (por exemplo, uma combinação do composto 1 e (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol), ambos antes e após a introdução do sistema CRISPR (por exemplo, molécula de gRNA e/ou molécula Cas9 da invenção) nas referidas HSPCs.

[0574] Em modalidades, o expansor de células-tronco está presente em uma quantidade eficaz para aumentar o nível de expansão das HSPCs, em relação a HSPCs no mesmo meio, mas para a ausência do expansor de células-tronco. Em modalidades, o expansor de células-tronco está presente em uma concentração que varia de cerca de 0,01 a cerca de 10 uM, por exemplo, de cerca de 0,1 uM a cerca de 1 uM. Em modalidades, o expansor de células-tronco está presente no meio de cultura de células a uma concentração de cerca de 1 uM, cerca de 950 nM, cerca de 900 nM, cerca de 850 nM, cerca de 800 nM, cerca de 750 nM, cerca de 700 nM, cerca de 650 nM, cerca de 600 nM, cerca de 550 nM, cerca de 500 nM, cerca de 450 nM, cerca de 400 nM, cerca de 350 nM, cerca de 300 nM, cerca de 250 nM, cerca de 200 nM, cerca de 150 nM, cerca de 100 nM, cerca de 50 nM, cerca de 25 nM ou cerca de 10 nM. Em modalidades, o expansor de células-tronco está presente em uma concentração que varia de cerca de 500 nM a cerca de 750 nM.

[0575] Em modalidades, o expansor de células-tronco é (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, o qual está presente no meio de cultura de células em uma concentração variando entre cerca de 0,01 e cerca de 10 micromolar (uM). Em modalidades, o expansor de células-tronco é (S)-2-(6-(2-(1H-

indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, o qual está presente no meio de cultura de células em uma concentração variando entre cerca de 0,1 e cerca de 1 micromolar (uM). Em modalidades, o expensor de células-tronco é (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, o qual está presente no meio de cultura de células em uma concentração de cerca de 0,75 micromolar (uM). Em modalidades, o expensor de células-tronco é (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, o qual está presente no meio de cultura de células em uma concentração de cerca de 0. 5 micromolar (uM). Em modalidades de qualquer uma das anteriores, o meio de cultura de células compreende adicionalmente o composto 1.

[0576] Em modalidades, o expensor de células-tronco é uma mistura do composto 1 e (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol.

[0577] Em modalidades, as células da invenção são colocadas em contato com uma ou mais moléculas expansoras de células-tronco durante um tempo suficiente e em uma quantidade suficiente para provocar uma expansão de 2 a 10.000 vezes de células CD34+, por exemplo, uma expansão de 2-1000 vezes de células CD34+, por exemplo, uma expansão de 2-100 vezes de células CD34+, por exemplo, uma expansão de 20-200 vezes de células CD34+. Como aqui descrito, o contato com o um ou mais expansores de células-tronco pode ser antes das células serem contatadas com um sistema CRISPR, por exemplo, como aqui descrito, depois das células serem contatadas com um sistema CRISPR, por exemplo, como aqui descrito, ou combinação destes. Em uma modalidade, as células são contatadas com uma ou mais moléculas expansoras de células-tronco, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, durante um tempo suficiente e em uma

quantidade suficiente para causar, pelo menos, uma expansão de 2 vezes de células CD34+, por exemplo, células CD34+ compreendendo um indel em ou próximo do sítio-alvo possuindo complementaridade com o domínio-alvo do gRNA do sistema CRISPR/Cas9 introduzido na referida célula. Em uma modalidade, as células são contatadas com uma ou mais moléculas expansoras de células-tronco, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, durante um tempo suficiente e em uma quantidade suficiente para causar, pelo menos, uma expansão de 4 vezes de células CD34+, por exemplo, células CD34+ compreendendo um indel em ou próximo do sítio-alvo possuindo complementaridade com o domínio-alvo do gRNA do sistema CRISPR/Cas9 introduzido na referida célula. Em uma modalidade, as células são contatadas com uma ou mais moléculas expansoras de células-tronco, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, durante um tempo suficiente e em uma quantidade suficiente para causar, pelo menos, uma expansão de 5 vezes de células CD34+, por exemplo, células CD34+ compreendendo um indel em ou próximo do sítio-alvo possuindo complementaridade com o domínio-alvo do gRNA do sistema CRISPR/Cas9 introduzido na referida célula. Em uma modalidade, as células são colocadas em contato com uma ou mais moléculas expansoras de células-tronco durante um tempo suficiente e em uma quantidade suficiente para provocar, pelo menos, uma expansão de 10 vezes de células CD34+. Em uma modalidade, as células são colocadas em contato com uma ou mais moléculas expansoras de células-tronco durante um tempo suficiente e em uma quantidade suficiente para provocar, pelo menos, uma expansão de 20 vezes de células CD34+. Em uma modalidade, as células são colocadas em contato com uma ou mais moléculas expansoras de células-tronco durante um tempo suficiente e em uma quantidade suficiente para

provocar, pelo menos, uma expansão de 30 vezes de células CD34+. Em uma modalidade, as células são colocadas em contato com uma ou mais moléculas expansoras de células-tronco durante um tempo suficiente e em uma quantidade suficiente para provocar, pelo menos, uma expansão de 40 vezes de células CD34+. Em uma modalidade, as células são colocadas em contato com uma ou mais moléculas expansoras de células-tronco durante um tempo suficiente e em uma quantidade suficiente para provocar, pelo menos, uma expansão de 50 vezes de células CD34+. Em uma modalidade, as células são colocadas em contato com uma ou mais moléculas expansoras de células-tronco durante um tempo suficiente e em uma quantidade suficiente para provocar, pelo menos, uma expansão de 60 vezes de células CD34+. Em modalidades, as células são colocadas em contato com um ou mais expansores de células-tronco durante um período de cerca de 1-60 dias, por exemplo, cerca de 1-50 dias, por exemplo, cerca de 1-40 dias, por exemplo, cerca de 1-30 dias, por exemplo, 1-20 dias, por exemplo, cerca de 1-10 dias, por exemplo, cerca de 7 dias, por exemplo, cerca de 1-5 dias, por exemplo, cerca de 2-5 dias, por exemplo, cerca de 2-4 dias, por exemplo, cerca de 2 dias ou, por exemplo, cerca de 4 dias.

[0578] Em modalidades, as células, por exemplo, HSPCs, por exemplo, como aqui descritas, são cultivadas *ex vivo* durante um período de cerca de 1 hora a cerca de 10 dias, por exemplo, um período de cerca de 12 horas a cerca de 5 dias, por exemplo, um período de cerca de 12 horas a 4 dias, por exemplo, um período de cerca de 1 dia a cerca de 4 dias, por exemplo, um período de cerca de 1 dia a cerca de 2 dias, por exemplo, um período de cerca de 1 dia ou um período de cerca de 2 dias antes do etapa de colocar as células em contato com um sistema CRISPR, por exemplo, aqui descrito. Em modalidades, a referida cultura, antes do referido etapa de contato é em uma composição (por exemplo, um meio de cultura celular), que compreende

um expensor de células-tronco, por exemplo, aqui descrito, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol a uma concentração de cerca de 0,25 uM a cerca de 1 uM, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol a uma concentração de cerca de 0,75-0,5 micromolar. Em modalidades, as células são cultivadas *ex vivo* por um período não superior a cerca de 1 dia, por exemplo, não mais que cerca de 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 hora(s) após a etapa de colocar as células em contato com um sistema CRISPR, por exemplo, aqui descrito, por exemplo, em um meio de cultura de células que compreende um expensor de células-tronco, por exemplo, descrito aqui, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol a uma concentração de cerca de 0,25 uM a cerca de 1 uM, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol a uma concentração de cerca de 0,75-0,5 micromolar. Noutras modalidades, as células são cultivadas *ex vivo* durante um período de cerca de 1 hora a cerca de 14 dias, por exemplo, um período de cerca de 12 horas a cerca de 10 dias, por exemplo, um período de cerca de 1 dia a cerca de 10 dias, por exemplo um período de cerca de 1 dia a cerca de 5 dias, por exemplo, um período de cerca de 1 dia a cerca de 4 dias, por exemplo, um período de cerca de 2 dias a cerca de 4 dias, por exemplo, um período de cerca de 2 dias, cerca de 3 dias ou cerca de 4 dias, após o etapa de contatar as células com um sistema CRISPR, por exemplo, aqui descrito, em um meio de cultura celular, por exemplo, que compreende um expensor de células-tronco, por exemplo, aqui descrito, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-

9H-purin-9-il)propan-1-ol, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol a uma concentração de cerca de 0,25 mM a cerca de 1 mM, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol a uma concentração de cerca de 0,75-0,5 micromolar.

[0579] Em modalidades, o meio de cultura de células é um meio quimicamente definido. Em modalidades, o meio de cultura de células pode conter adicionalmente, por exemplo, StemSpan SFEM (StemCell Technologies; Cat no. 09650). Em modalidades, o meio de cultura celular pode, em alternativa ou adicionalmente, conter, por exemplo, fermentado de HSC, GMP (Miltenyi). Em modalidades, o meio de cultura de células é isento de soro. Em modalidades, o meio pode ser suplementado com trombopoietina (TPO), ligante de Flt3 humano (Flt-3L), fator de célula-tronco humana (SCF), interleucina-6 humana, L-glutamina e/ou penicilina/estreptomicina. Em modalidades, o meio é suplementado com trombopoietina (TPO), ligante de Flt3 humano (Flt-3L), fator de célula-tronco humana (SCF), interleucina-6 humana e L-glutamina. Em outras modalidades, o meio é suplementado com trombopoietina (TPO), ligante de Flt3 humano (Flt-3L), fator de célula-tronco humana (SCF) e interleucina-6 humana. Em outras modalidades, o meio é suplementado com trombopoietina (TPO), ligante de Flt3 humano (Flt-3L) e fator de célula-tronco humana (SCF), mas não interleucina-6 humana. Em outras modalidades, o meio é suplementado com ligando humano de Flt3 (Flt-3L), fator de células-tronco humanas (SCF), mas não trombopoietina humana (TPO) ou a interleucina-6 humana. Quando presente no meio, a trombopoietina (TPO), o ligante de Flt3 humano (Flt-3L), o fator de célula-tronco humano (SCF), a interleucina-6 humana e/ou L-glutamina está cada um presente em uma concentração variando de cerca de 1 ng/mL a cerca de 1000 ng/mL, por exemplo, uma concentração variando de cerca de 10 ng/mL a cerca de

500 ng/mL, por exemplo, uma concentração variando de cerca de 10 ng/mL a cerca de 100 ng/mL, por exemplo, uma concentração variando de cerca de 25 ng/mL a cerca de 75 ng/mL, por exemplo, uma concentração de cerca de 50 ng/mL. Em modalidades, cada um dos componentes suplementados está na mesma concentração. Em outras modalidades, cada um dos componentes suplementados está em uma concentração diferente. Em uma modalidade, o meio compreende StemSpan SFEM (StemCell Technologies; Cat n.º 09650), 50 ng/mL de trombopoietina (Tpo), 50 ng/mL de ligante de Flt3 humano (Flt-3L), 50 ng/mL de fator de célula-tronco humana (SCF) e 50 ng/mL de interleucina-6 humana (IL-6). Em uma modalidade, o meio compreende StemSpan SFEM (StemCell Technologies; Cat n.º 09650), 50 ng/mL de trombopoietina (Tpo), 50 ng/mL de ligante de Flt3 humano (Flt-3L), 50 ng/mL de fator de célula-tronco humana (SCF) e não compreende IL-6. Em modalidades, o meio compreende ainda um expansor de células-tronco, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, por exemplo, ((S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, em uma concentração de 0,75 µM. Em modalidades, o meio compreende ainda um expansor de células-tronco, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, por exemplo, ((S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol, em uma concentração de 0,5 µM. Em modalidades, os meios compreendem ainda 1% de L-glutamina e 2% de penicilina/estreptomicina. Em modalidades, o meio de cultura de células é isento de soro.

XII. Terapia de Combinação

[0580] A presente divulgação contempla a utilização das moléculas de gRNA aqui descritas, ou células (por exemplo, células-tronco hematopoiéticas, por exemplo, células CD34+) modificadas com as

moléculas de gRNA aqui descritas, em combinação com uma ou mais outras modalidades terapêuticas e/ou agentes agentes. Assim, para além da utilização das moléculas de gRNA ou células modificadas com as moléculas de gRNA aqui descritas, pode-se também administrar ao sujeito uma ou mais terapias "padrão" para o tratamento de hemoglobinopatias.

[0581] A uma ou mais terapias adicionais para o tratamento de hemoglobinopatias podem incluir, por exemplo, transplante adicional de células-tronco, por exemplo, transplante de células-tronco hematopoiéticas. O transplante de células-tronco pode ser alogênico ou autólogo.

[0582] A uma ou mais terapias adicionais para o tratamento de hemoglobinopatias podem incluir, por exemplo, transfusão de sangue e/ou terapia de quelação de ferro (por exemplo, remoção). Agentes de quelação de ferro conhecidos incluem, por exemplo, deferoxamina e deferassirox.

[0583] A uma ou mais terapias adicionais para o tratamento de hemoglobinopatias podem incluir, por exemplo, suplementos de ácido fólico ou hidroxureia (por exemplo, 5-hidroxureia). A uma ou mais terapias adicionais para tratamento de hemoglobinopatias pode ser hidroxureia. Em modalidades, a hidroxureia pode ser administrada a uma dose de, por exemplo, 10-35 mg/kg por dia, por exemplo, 10-20 mg/kg por dia. Em modalidades, a hidroxureia é administrada a uma dose de 10 mg/kg por dia. Em modalidades, a hidroxureia é administrada a uma dose de 10 mg/kg por dia. Em modalidades, a hidroxureia é administrada a uma dose de 20 mg/kg por dia. Em modalidades, a hidroxureia é administrada antes e/ou depois da célula (ou população de células), por exemplo, células CD34+ (ou população de células) da invenção, por exemplo, como aqui descrito.

[0584] O um ou mais agentes terapêuticos adicionais podem incluir,

por exemplo, um anticorpo anti-p-selectina, por exemplo, SelG1 (Selexys). Os anticorpos para p-selectina são descritos, por exemplo, na publicação PCT WO1993/021956, publicação PCT WO1995/034324, publicação PCT WO2005/100402, publicação PCT WO2008/069999, publicação de pedido de patente dos EUA US2011/0293617, patente US N.º 5800815, Patente US N.º 6667036, Patente US N.º 8945565, Patente US N.º 8377440 e Patente US N.º 9068001, cujo conteúdo é aqui incorporado na sua totalidade.

[0585] O um ou mais agentes adicionais podem incluir, por exemplo, uma molécula pequena que regula positivamente a hemoglobina fetal. Exemplos de tais moléculas incluem TN1 (por exemplo, como descrito em Nam, T. et al., ChemMedChem 2011, 6, 777-780, DOI: 10.1002/cmdc.201000505, aqui incorporado por referência).

[0586] A uma ou mais terapias adicionais podem também incluir irradiação ou outra terapêutica de ablação da medula óssea conhecida na técnica. Um exemplo de tal terapia é o bussulfano. Tal terapia adicional pode ser realizada antes da introdução das células da invenção no sujeito. Em uma modalidade, os métodos de tratamento aqui descritos (por exemplo, os métodos de tratamento que incluem a administração de células (por exemplo, HSPCs) modificadas pelos métodos aqui descritos (por exemplo, modificadas com um sistema CRISPR aqui descrito, por exemplo, para aumentar a produção de HbF)), o método não inclui o etapa de ablação da medula óssea. Em modalidades, os métodos incluem um etapa de ablação parcial da medula óssea.

[0587] As terapias aqui descritas (por exemplo, compreendendo a administração de uma população de HSPCs, por exemplo, HSPCs modificadas utilizando um sistema CRISPR aqui descrito) podem também ser combinadas com um agente terapêutico adicional. Em uma

modalidade, o agente terapêutico adicional é um inibidor de HDAC, por exemplo, panobinostat. Em uma modalidade, o agente terapêutico adicional é um composto descrito na Publicação PCT N.º WO2014/150256, por exemplo, um composto descrito na Tabela 1 de WO2014/150256, por exemplo, GBT440. Outros exemplos de inibidores de HDAC incluem, por exemplo, ácido de suberoilanolida hidroxâmico (SAHA). O um ou mais agentes adicionais podem incluir, por exemplo, um inibidor de metilação do DNA. Foi demonstrado que tais agentes aumentam a indução de HbF em células com atividade de BCL11a reduzida (por exemplo, Jian Xu et al., *Science* 334, 993 (2011); DOI: 0.1126/science.1211053, aqui incorporado por referência). Outros inibidores de HDAC incluem qualquer inibidor de HDAC conhecido na técnica, por exemplo, tricotatina A, toxina HC, DACI-2, FK228, DACI-14, despudicina, DACI-16, tubacina, NK57, MAZ1536, NK125, Scriptaid, Piroxamida, MS-275, ITF-2357, MCG-D0103, CRA-024781, CI-994 e LBH589 (ver, por exemplo, Bradner JE, et al., *PNAS*, 2010 (vol. 107:28), 12617-12622, incorporado aqui por referência na sua totalidade).

[0588] As moléculas de gRNA aqui descritas, ou células (por exemplo, células-tronco hematopoiéticas, por exemplo, células CD34+) modificadas com as moléculas de gRNA aqui descritas, e o agente co-terapêutico ou co-terapia podem ser administrados na mesma formulação ou separadamente. No caso de administração separada, as moléculas de gRNA aqui descritas, ou células modificadas com as moléculas de gRNA aqui descritas, podem ser administradas antes, após ou concorrentemente com o co-terapêutico ou co-terapia. Um agente pode preceder ou seguir a administração do outro agente em intervalos que variam de minutos a semanas. Em modalidades em que dois ou mais tipos diferentes de agentes terapêuticos são aplicados separadamente a um sujeito, pode-se geralmente assegurar que um período significativo de tempo não expirou entre o tempo de cada

entrega, de tal modo que estes diferentes tipos de agentes ainda seriam capazes de exercer um efeito vantajosamente combinado nos tecidos ou células-alvo.

XIII. Nucleosídeos, Nucleotídeos e Ácidos Nucleicos Modificados

[0589] Os nucleosídeos modificados e nucleotídeos modificados podem estar presentes em ácidos nucleicos, por exemplo, particularmente gRNA, mas também outras formas de RNA, por exemplo, mRNA, RNAi ou siRNA. Como aqui descrito, "nucleosídeo" é definido como um composto contendo uma molécula de açúcar com cinco átomos de carbono (uma pentose ou ribose) ou seu derivado, e uma base orgânica, purina ou pirimidina, ou um seu derivado. Como aqui descrito, "nucleotídeo" é definido como um nucleosídeo compreendendo ainda um grupo fosfato.

[0590] Nucleosídeos e nucleotídeos modificados podem incluir um ou mais de:

- (i) alteração, por exemplo, substituição de um ou ambos os oxigênios de fosfato não ligantes e/ou de um ou mais dos oxigênios de fosfato ligantes na ligação do esqueleto de fosfodiéster;
- (ii) alteração, por exemplo, substituição, de um constituinte do açúcar ribose, por exemplo, de hidroxila 2' no açúcar ribose;
- (iii) substituição total da fração fosfato por ligantes "defosfo";
- (iv) alteração ou substituição de uma nucleobase que ocorre naturalmente, incluindo com uma nucleobase não canônica;
- (v) substituição ou modificação do esqueleto de ribose-fosfato;
- (vi) modificação da extremidade 3 ou da extremidade 5 do oligonucleotídeo, por exemplo, remoção, substituição ou modificação de um grupo fosfato terminal ou conjugação de uma fração, cap ou ligante;
- e
- (vii) modificação ou substituição do açúcar.

[0591] As modificações listadas acima podem ser combinadas para

fornecer nucleosídeos e nucleotídeos modificados que podem ter duas, três, quatro ou mais modificações. Por exemplo, um nucleosídeo ou nucleotídeo modificado pode ter um açúcar modificado e uma nucleobase modificada. Em uma modalidade, cada base de um gRNA é modificada, por exemplo, todas as bases têm um grupo fosfato modificado, por exemplo, todos são grupos fosforotioato. Em uma modalidade, todos ou substancialmente todos dos grupos fosfato de uma molécula de gRNA unimolecular ou modular são substituídos com grupos fosforotioato. Em modalidades, uma ou mais das cinco bases 3'-terminais e/ou uma ou mais das cinco bases 5'-terminais do gRNA são modificadas com um grupo fosforotioato.

[0592] Em uma modalidade, os nucleotídeos modificados, por exemplo, nucleotídeos com modificações como aqui descritas, podem ser incorporados em um ácido nucleico, por exemplo, um "ácido nucleico modificado". Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos modificados compreendem um, dois, três ou mais nucleotídeos modificados. Em algumas modalidades, pelo menos 5% (por exemplo, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, ou cerca de 100%) das posições em um ácido nucleico modificado são um nucleotídeos modificados.

[0593] Os ácidos nucleicos não modificados podem ser propensos à degradação por, por exemplo, nucleases celulares. Por exemplo, as nucleases podem hidrolisar ligações fosfodiéster de ácido nucleico. Por conseguinte, em um aspecto, os ácidos nucleicos modificados aqui

descritos podem conter um ou mais nucleosídeos ou nucleotídeos modificados, por exemplo, para introduzir estabilidade em relação às nucleases.

[0594] Em algumas modalidades, os nucleosídeos modificados, nucleotídeos modificados e ácidos nucleicos modificados aqui descritos podem exibir uma resposta imunitária inata reduzida quando introduzidos em uma população de células, tanto *in vivo* como *ex vivo*. O termo "resposta imunológica inata" inclui uma resposta celular a ácidos nucleicos exógenos, incluindo ácidos nucleicos de cadeia simples, geralmente de origem viral ou bacteriana, que envolve a indução da expressão e liberação de citocinas, particularmente os interferons e morte celular. Em algumas modalidades, os nucleosídeos modificados, nucleotídeos modificados e ácidos nucleicos modificados aqui descritos podem interromper a ligação de um parceiro que interage com o sulco principal com o ácido nucleico. Em algumas modalidades, os nucleosídeos modificados, nucleotídeos modificados e ácidos nucleicos modificados aqui descritos podem exibir uma resposta imunitária inata reduzida quando introduzidos em uma população de células, tanto *in vivo* como *ex vivo* e também interromper a ligação de um parceiro que interage com o sulco principal com o ácido nucleico.

Definições de Grupos Químicos

[0595] Tal como aqui utilizado, "alquila" pretende referir-se a um grupo hidrocarboneto saturado que é de cadeia linear ou ramificada. Exemplos de grupos alquila incluem metila (Me), etila (Et), propila (por exemplo, n-propila e isopropila), butila (por exemplo, n-butila, isobutila, t-butila), pentila (por exemplo, n-pentila, isopentila, neopentila) e semelhantes. Um grupo alquila pode conter de 1 a cerca de 20, de 2 a cerca de 20, de 1 a cerca de 12, de 1 a cerca de 8, de 1 a cerca de 6, de 1 a cerca de 4 ou de 1 a cerca de 3 átomos de carbono.

[0596] Como aqui utilizado, "arila" refere-se a hidrocarbonetos

aromáticos monocíclicos ou policíclicos (por exemplo, tendo 2, 3 ou 4 anéis fundidos) tais como, por exemplo, fenila, naftila, antracenila, fenantrenila, indanila, indenila e semelhantes. Em algumas modalidades, os grupos arila têm de 6 a cerca de 20 átomos de carbono.

[0597] Como aqui utilizado, "alquenila" refere-se a um grupo alifático contendo, pelo menos, uma ligação dupla. Como aqui utilizado, "alquinila" refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto linear ou ramificada contendo 2-12 átomos de carbono e caracterizada por ter uma ou mais ligações triplas. Exemplos de grupos alquinila incluem, mas não estão limitados a, etinila, propargila e 3-hexinila.

[0598] Como aqui utilizado, "arilalquila" ou "aralquila" refere-se a uma fração alquila em que um átomo de hidrogênio de alquila é substituído por um grupo arila. Aralquila inclui grupos nos quais mais de um átomo de hidrogênio foi substituído por um grupo arila. Exemplos de "arilalquila" ou "aralquila" incluem os grupos benzila, 2-feniletila, 3-fenilpropila, 9-fluorenila, benzidril e tritila.

[0599] Como aqui utilizado, "cicloalquila" refere-se a grupos hidrocarboneto não aromáticos cíclicos, bicíclicos, tricíclicos ou policíclicos tendo 3 a 12 carbonos. Exemplos de frações cicloalquila incluem, mas não estão limitados a, ciclopropila, ciclopentila e ciclohexila.

[0600] Como aqui utilizado, "heterociclila" refere-se a um radical monovalente de um sistema de anel heterocíclico. As heterociclilas representativas incluem, sem limitação, tetra-hidrofuranila, tetra-hidrotienila, pirrolidinila, pirrolidonila, piperidinila, pirrolinila, piperazinila, dioxanila, dioxolanila, diazepinila, oxazepinila, tiazepinila e morfolinila.

[0601] Como aqui utilizado, "heteroarila" refere-se a um radical monovalente de um sistema de anel heteroaromático. Exemplos de frações heteroarila incluem, mas não se limitam a, imidazolila, oxazolila, tiazolila, triazolila, pirrolila, furanila, indolila, tiofenilpirazolila, piridinila,

pirazinila, piridazinila, pirimidinila, indolizinila, purinila, naftiridinila, quinolila e pteridinila.

Modificações do Esqueleto de fosfato

O Grupo Fosfato

[0602] Em algumas modalidades, o grupo fosfato de um nucleotídeo modificado pode ser modificado através da substituição de um ou mais dos oxigênios por um substituinte diferente. Além disso, o nucleotídeo modificado, por exemplo, nucleotídeo modificado presente em um ácido nucleico modificado, pode incluir a substituição total de uma fração de fosfato não modificada com um fosfato modificado como aqui descrito. Em algumas modalidades, a modificação do esqueleto de fosfato pode incluir alterações que resultam em um ligante não carregado ou um ligante carregado com distribuição de carga não simétrica.

[0603] Exemplos de grupos fosfato modificados incluem fosforotioato, fosforosselenatos, fosfatos de borano, fosfato ésteres de borano, fosfonatos de hidrogênio, fosforoamidatos, fosfonatos de alquila ou de arila e fosfotriésteres. Em algumas modalidades, um dos átomos de oxigênio fosfato não ponte na fração de esqueleto de fosfato pode ser substituído por qualquer um dos seguintes grupos: enxofre (S), selênio (Se), BR_3 (em que R pode ser, por exemplo, hidrogênio, alquila ou arila), C (por exemplo, um grupo alquila, um grupo arila e semelhantes), H, NR_2 (em que R pode ser, por exemplo, hidrogênio, alquila ou arila), ou OR (em que R pode ser, por exemplo, alquila ou arila). O átomo fosfórico em um grupo fosfato não modificado é aquiral. No entanto, a substituição de um dos oxigênios não ligantes com um dos átomos ou grupos de átomos acima pode tornar o átomo de fósforo quiral; isto é, um átomo fosfórico em um grupo fosfato modificado desta maneira é um centro estereogênico. O átomo fosfórico estereogênico pode possuir a configuração "R" (aqui Rp) ou a configuração "S" (aqui Sp).

[0604] Os fosforoditioatos têm ambos os oxigênios não ligantes substituídos por enxofre. O centro de fósforo nos fosforoditioatos é aquiral, que impede a formação de diastereoisômeros oligorribonucleotídicos. Em algumas modalidades, modificações a um ou ambos os oxigênios não-ponte também podem incluir a substituição dos oxigênios não-ponte com um grupo independentemente selecionado a partir de S, Se, B, C, H, N, e OR (R pode ser, por exemplo, alquila ou arila).

[0605] O ligante fosfato pode também ser modificado por substituição de um oxigênio em ponte, (isto é, o oxigênio que liga o fosfato ao nucleósido), com nitrogênio (fosforamidatos em ponte), enxofre (fosforotioatos em ponte) e carbono (metilenofosfonatos em ponte). A substituição pode ocorrer tanto no oxigênio de ligação ou em ambos os oxigênios de ligação.

Substituição do Grupo Fosfato

[0606] O grupo fosfato pode ser substituído por conectores não contendo fósforo. Em algumas modalidades, o grupo fosfato de carga pode ser substituído por uma fração neutra.

[0607] Exemplos de frações que podem substituir o grupo fosfato podem incluir, sem limitação, por exemplo, fosfonato de metila, hidroxilamina, siloxano, carbonato, carboximetila, carbamato, amida, tioéter, ligante de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenoimina, metilenometilimina, metileno-hidrazo, metilenodimetil-hidrazo e metilenoximetilimina.

Substituição do Esqueleto do Ribofosfato

[0608] Moldes que podem imitar ácidos nucleicos podem também ser construídos em que o ligante fosfato e o açúcar ribose são substituídos por substitutos de nucleosídeos ou nucleotídeos resistentes à nuclease. Em algumas modalidades, as nucleobases podem ser presas por um esqueleto substituto. Os exemplos podem

incluir, sem limitação, os substitutos de nucleósidos morfolino, ciclobutila, pirrolidina e ácido nucleico peptídico (PNA).

Modificações de Açúcar

[0609] Os nucleosídeos modificados e nucleotídeos modificados podem incluir uma ou mais modificações no grupo de açúcar. Por exemplo, o grupo hidroxila 2' (OH) pode ser modificado ou substituído por vários substituintes "oxi" ou "desoxi" diferentes. Em algumas modalidades, as modificações no grupo hidroxila 2' podem aumentar a estabilidade do ácido nucleico uma vez que a hidroxila já não pode ser desprotonada para formar um ião 2'-alcóxido. O 2'-alcóxido pode catalisar a degradação por ataque nucleofílico intramolecular sobre o átomo de fósforo ligante.

[0610] Exemplos de modificações do grupo hidroxila "oxi"-2' podem incluir alcóxi ou arilóxi (OR, em que "R" pode ser, por exemplo, alquila, cicloalquila, arila, aralquila, heteroarila ou um açúcar); polietilenoglicóis (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ em que R pode ser, por exemplo, H ou alquila opcionalmente substituída, e n pode ser um número inteiro de 0 a 20 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 8, de 0 a 10, de 0 a 16, de 1 a 4, de 1 a 8, de 1 a 10, de 1 a 16, de 1 a 20, de 2 a 4, de 2 a 8, de 2 a 10, de 2 a 16, de 2 a 20, de 4 a 8, de 4 a 10, de 4 a 16 e de 4 a 20). Em algumas modalidades, a modificação do grupo hidroxila "óxi"-2' pode incluir ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) em que a hidroxila 2' pode ser ligada, por exemplo, por uma ponte alquileno $Ci-6$ ou heteroalquileno $Cj-6$, ao carbono 4' do mesmo açúcar ribose, em que pontes exemplificativas podem incluir pontes de metileno, propileno, éter ou amina; O-amina (em que amina pode ser, por exemplo, NH_2 ; alquilamina, dialquilamina, heterociclila, arilamina, diarilamina, heteroarilamina ou di-heteroarilamina, etilenodiamina ou poliamina) e aminoalcóxi, $O(CH_2)_n$ -amina, (em que amina pode ser, por exemplo, NH_2 , alquilamina, dialquilamina, heterociclila, arilamina, diarilamina,

heteroarilamina ou di-heteroarilamina, etilenodiamina ou poliamina). Em algumas modalidades, a modificação do grupo hidroxila "óxi" -2' pode incluir o grupo metoxietila (MOE), ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, por exemplo, um derivado de PEG).

[0611] Modificações "Deóxi" podem incluir hidrogênio (isto é, açúcares desoxirribose, por exemplo, nas porções *overhang* do RNA parcialmente ds); halo (por exemplo, bromo, cloro, flúor ou iodo); amina (em que amina pode ser, por exemplo, NH_2 ; alquilamina, dialquilamina, heterociclila, arilamina, diarilamina, heteroarilamina, di-heteroarilamina ou aminoácido); amina $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (em que amina pode ser, por exemplo, como aqui descrito), $\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ (em que R pode ser, por exemplo, alquila, cicloalquila, arila, aralquila, heteroarila ou açúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquila; tioalcóxi; e alquila, cicloalquila, arila, alquenila e alquinila, que podem estar opcionalmente substituídos com, por exemplo, uma amina como aqui descrito.

[0612] O grupo açúcar também pode conter um ou mais carbonos que possuem a configuração estereoquímica oposta à do carbono correspondente na ribose. Assim, um ácido nucleico modificado pode incluir nucleotídeos contendo, por exemplo, arabinose, como o açúcar. O "monômero" de nucleotídeos pode ter uma ligação alfa na posição Γ no açúcar, por exemplo, alfa-nucleosídeos. Os ácidos nucleicos modificados também podem incluir açúcares "abásicos", que não possuem uma nucleobase em C-. Estes açúcares abásicos podem também ser adicionalmente modificados em um ou mais dos átomos de açúcar constituintes. Os ácidos nucleicos modificados podem também incluir um ou mais açúcares que estão na forma L, por exemplo, L-nucleosídeos.

[0613] Geralmente, o RNA inclui o grupo de açúcar ribose, que é um anel de 5 membros com um oxigênio. Os nucleosídeos modificados e os nucleotídeos modificados exemplificativos podem incluir, sem

limitação, a substituição do oxigênio na ribose (por exemplo, com enxofre (S), selênio (Se) ou alquilenos, tal como, por exemplo, metileno ou etileno); adição de uma ligação dupla (por exemplo, para substituir a ribose por ciclopentenila ou ciclo-hexenila); contração do anel da ribose (por exemplo, para formar um anel de 4 membros de ciclobutano ou oxetano); expansão do anel da ribose (por exemplo, para formar um anel de 6 ou 7 membros tendo um carbono ou heteroátomo adicional, tal como por exemplo, anidro-hexitol, altritrol, manitol, ciclo-hexanila, ciclo-hexenila e morfolino que também tem um esqueleto de fosforamidato). Em algumas modalidades, os nucleotídeos modificados podem incluir formas multicíclicas (por exemplo, triciclo; formas e "desbloqueadas", tais como ácido nucleico glicol (GNA) (por exemplo, R-GNA ou S-GNA, onde a ribose é substituída por unidades glicol ligadas a ligações fosfodiéster), ácido nucleico treose (TNA, onde a ribose é substituída por α -L-treofuranosil-(3'→2')).

Modificações na Nucleobase

[0614] Os nucleosídeos modificados e nucleotídeos modificados aqui descritos, que podem ser incorporados em um ácido nucleico modificado, podem incluir uma nucleobase modificada. Exemplos de nucleobases incluem, mas não estão limitados a, adenina (A), guanina (G), citosina (C) e uracila (U). Estas nucleobases podem ser modificadas ou completamente substituídas para fornecer nucleosídeos modificados e nucleotídeos modificados que podem ser incorporados em ácidos nucleicos modificados. A nucleobase do nucleotídeo pode ser independentemente selecionada a partir de um análogo de purina, pirimidina, purina ou pirimidina. Em algumas modalidades, a nucleobase pode incluir, por exemplo, derivados sintéticos e de ocorrência natural de uma base.

Uracila

[0615] Em algumas modalidades, a nucleobase modificada é uma

uracila modificada. Nucleobases e nucleosídeos exemplificativos com uma uracila modificada incluem, sem limitação, pseudouridina (ψ), ribonucleosídeo piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 6-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-uridina (s_2U), 4-tio-uridina (s_4U), 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidróxi-uridina (ho^5U), 5-aminoalil-uridina, 5-halo-uridina (por exemplo, 5-iodo-uridina ou 5-bromo-uridina), 3-metil-uridina (m^3U), 5-metóxi-uridina (mo^5U), ácido 5-oxiacético de uridina (cmo^5U), éster metílico do ácido 5-oxi-acético de uridina ($mcmo^5U$), 5-carboximetil-uridina (cm^5U), 1-carbóximetil-pseudouridina, 5-carbóxi-hidroximetil-uridina (chm^5U), éster metílico de 5-carbóxi-hidroximetil-uridina ($mchm^5U$), 5-metoxycarbonilmetil-uridina (mcm^5U), 5-metoxycarbonilmetil-2-tio-uridina (mcm^5s_2U), 5-aminometil-2-tio-uridina (nm^5s_2U), 5-metilaminometil-uridina (nmn^5U), 5-metilaminometil-2-tio-uridina (nmn^5s_2U), 5-metilaminometil-2-seleno-uridina (nmn^5se^2U), 5-carbamoylmetil-uridina (ncm^5U), 5-carboximetilaminometil-uridina ($cmnm^5U$), 5-carboximetilaminometil-2-tio-uridina ($cmnm^5s_2U$), 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-aurinometil-uridina (xcm^5U), 1-aurinometil-pseudouridina, 5-aurinometil-2-tio-uridina (Trn^5s_2U), 1-aurinometil-4-tio-pseudouridina, 5-metil-uridina (m^5U , ou seja, tendo a nucleobase desoxitimidina), 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$), 5-metil-2-tio-uridina (m^5s_2U), 1-metil-4-tio-pseudouridina ($m^1s_4\psi$), 4-tio-1-metil-pseudouridina, 3-metil-pseudouridina ($m^3\psi$), 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, di-hidroundina (D), di-hidropseudoundina, 5,6-di-hidrouridina, 5-metil-di-hidrouridina (m^5D), 2-tio-di-hidrouridina, 2-tio-di-hidropseudouridina, 2-metóxi-uridina, 2-metóxi-4-tio-uridina, 4-metóxi-pseudouridina, 4-metóxi-2-tio-pseudouridina, N 1-metil-pseudouridina, 3-(3-amina-3-carboxipropil)uridina (acp^3U), 1-metil-3-(3-amina-3-carboxipropil)pseudouridina 5-(isopentenilaminometil)uridina (inm^5U), 5-(isopentenilaminometil)-2-tio-uridina (inm^5s_2U), a-tio-uridina, 2'-O-metil-

uridina (Urn), 5,2'-O-dimetil-uridina (m^5Um), 2'-O-metil-pseudouridina ($\psi\pi\pi$), 2-tio-2'-O-metil-uridina ($s2Um$), 5-metoxycarbonilmetil-2'-O-metil-uridina (mcm^5Um), 5-carbamoylmetil-2'-O-metil-uridina (ncm^5Um), 5-carboximetilaminometil-2'-O-metil-uridina ($cmnm^5Um$), 3,2'-O-dimetil-uridina (m^3Um), 5-(isopentenilaminometil)-2'-O-metil-uridina (inm^5Um), 1-tio-uridina, deoxitimidina, 2'-F-ara-uridina, 2'-F-uridina, 2'-OH-ara-uridina, 5-(2-carbometoxivinil)uridina, 5-[3-(1-E-propenilamino)uridina, pirazolo[3,4-d]pirimidinas, xantina e hipoxantina.

Citosina

[0616] Em algumas modalidades, a nucleobase modificada é uma citosina modificada. Exemplos de nucleobases e nucleosídeos possuindo uma citosina modificada incluem, sem limitação, 5-azacitidina, 6-azacitidina, pseudo-isocitidina, 3-metil-citidina (m^3C), N4-acetil-citidina(act), 5-formil-citidina(f^5C), N4-metil-citidina(m^4C), 5-metil-citidina(m^5C), 5-halo-citidina(por exemplo, 5-iodo-citidina), 5-hidroximetil-citidina(hm^5C), 1-metil-pseudo-isocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudo-isocitidina, 2-tio-citidina($s2C$), 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudo-isocitidina, 4-tio-1-metil-pseudo-isocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudo-isocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudo-isocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metóxi-citidina, 2-metóxi-5-metil-citidina, 4-metóxi-pseudo-isocitidina, 4-metóxi-1-metil-pseudo-isocitidina, lisidina (k^2C), a-tio-citidina, 2'-O-metil-citidina(Cm), 5,2'-O-dimetil-citidina(m^5Cm), N4-acetil-2'-O-metil-citidina(ac^4Cm), N4,2'-O-dimetil-citidina(m^4Cm), 5-formil-2'-O-metil-citidina(f^5Cm), N4,N4,2'-O-trimetil-citidina(m^4_2Cm), 1-tio-citidina, 2'-F-ara-citidina, 2'-F-citidina e 2'-OH-ara-citidina.

Adenina

[0617] Em algumas modalidades, a nucleobase modificada é uma adenina modificada. Nucleobases e nucleosídeos exemplificativos com

uma adenina modificada incluem sem limitação 2-amina-purina, 2,6-diaminapurina, 2-amina-6-halo-purina (por exemplo, 2-amina-6-cloropurina), 6-halo-purina (por exemplo, 6-cloropurina), 2-amina-6-metilpurina, 8-azido-adenosina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-amina-purina, 7-deaza-8-aza-2-amina-purina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metil-adenosina (m⁶A), 2-metil-adenina (m⁶A), N6-metil-adenosina (m⁶A), 2-metiltio-N6-metil-adenosina (ms²m⁶A), N6-isopentenil-adenosina (i⁶A), 2-metiltio-N6-isopentenil-adenosina (ms²i⁶A), N6-(cis-hidróxi-isopentenil)adenosina (io⁶A), 2-metiltio-N6-(cis-hidróxi-isopentenil)adenosina (ms²io⁶A), N6-glicinilcarbamoil-adenosina (g⁶A), N6-treonilcarbamoil-adenosina (t⁶A), N6-metil-N6-treonilcarbamoil-adenosina (m⁶t⁶A), 2-metiltio-N6-treonilcarbamoil-adenosina (ms²g⁶A), N6,N6-dimetil-adenosina (m⁶₂A), N6-hidroxinorvalilcarbamoil-adenosina (hn⁶A), 2-metiltio-N6-hidroxinorvalilcarbamoil-adenosina (ms²hn⁶A), N6-acetil-adenosina (ac⁶A), 7-metil-adenina, 2-metiltio-adenina, 2-metóxi-adenina, a-tio-adenosina, 2'-O-metil-adenosina (Am), N⁶,2'-O-dimetil-adenosina (m⁵Am), N⁶-Metil-2'-deoxiadenosina, N6,N6,2'-O-trimetil-adenosina (m⁶₂Am), 1,2'-O-dimetil-adenosina (m¹Am), 2'-O-ribosiladenosina (fosfato) (Ar(p)), 2-amina-N6-metil-purina, 1-tio-adenosina, 8-azido-adenosina, 2'-F-ara-adenosina, 2'-F-adenosina, 2'-OH-ara-adenosina e N6-(19-amina-pentaoxonadecil)-adenosina.

Guanina

[0618] Em algumas modalidades, a nucleobase modificada é uma guanina modificada. Nucleobases e nucleosídeos exemplificativos com uma guanina modificada incluem, sem limitação, inosina (I), 1-metilinosina (m¹I), wiosina (imG), metilwiosina (mimG), 4-demetil-wiosina (imG-14), isowiosina (imG2), wibutosina (yW), peroxiwibutosina (o₂yW), hidroxiwibutosina (OHyW), hidróxiwibutosina sub-modificada (OHyW*), 7-deaza-guanosina, queuosina (Q), epoxiqueuosina (oQ), galactosil-

queuosina (galQ), mannosil-queuosina (manQ), 7-ciano-7- deaza-guanosina (preQ₀), 7-aminometil-7-deaza-guanosina (preQi), archaeosina (G⁺), 7-deaza- 8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina (m⁷G), 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metil-inosina, 6-metóxi-guanosina, 1-metil-guanosina (m'G), N2-metil-guanosina (m²G), N2,N2-dimetil-guanosina (m² 2G), N2,7-dimetil-guanosina (m²,7G), N2, N2,7-dimetil-guanosina (m²,2,7G), 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metiltio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina, N2,N2- dimetil-6-tio-guanosina, a-tio-guanosina, 2'-0-metil-guanosina (Gm), N2-metil-2'-0-metil-guanosina (m³/₄m), N2,N2-dimetil-2'-0-metil-guanosina (m² 2Gm), 1 -metil-2'-0- metil-guanosina (m'Gm), N2,7-dimetil-2'-0-metil-guanosina (m²,7Gm), 2'-0-metil- inosina (Im), 1 ,2'-0-dimetil-inosina (m'Im), 0⁶-fenil-2'-deoxi-inosina, 2'-0-ribosilguanosina (fosfato) (Gr(p)), 1 -tio-guanosina, 0⁶-metil]-guanosina, 0⁶-Metil-2'-deoxiguanosina, 2'- F-ara-guanosina e 2'-F-guanosina.

gRNAs modificados

[0619] Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos modificados podem ser gRNAs modificados. Em algumas modalidades, os gRNAs podem ser modificados na extremidade 3'. Nesta modalidade, os gRNAs podem ser modificados na ribose U do terminal 3'. Por exemplo, os dois grupos hidroxila terminais da ribose U podem ser oxidados em grupos aldeído e em uma abertura concomitante do anel de ribose para proporcionar um nucleosídeo modificado, em que U pode ser uma uridina não modificada ou modificada.

[0620] Noutra modalidade, o terminal U em 3' pode ser modificado com um fosfato cíclico 2' 3', em que U pode ser uma uridina não modificada ou modificada. Em algumas modalidades, as moléculas de gRNA podem conter nucleotídeos 3' que podem ser estabilizados contra a degradação, por exemplo, incorporando um ou mais dos nucleotídeos

modificados aqui descritos. Nesta modalidade, por exemplo, as uridinas podem ser substituídas por uridinas modificadas, por exemplo, 5-(2-amino)propil-uridina e 5-bromo-uridina, ou com qualquer uma das uridinas modificadas aqui descritas; adenosinas e guanosinas podem ser substituídas por adenosinas e guanosinas modificadas, por exemplo, com modificações na posição 8, por exemplo, guanosina 8-bromo, ou com qualquer uma das adenosinas ou guanosinas modificadas aqui descritas. Em algumas modalidades, os nucleotídeos deaza, por exemplo, 7-deaza-adenosina, podem ser incorporados no gRNA. Em algumas modalidades, os nucleotídeos O- e N-alquilados, por exemplo, adenosina N6-metila, podem ser incorporados no gRNA. Em algumas modalidades, os ribonucleotídeos modificados com açúcar podem ser incorporados, por exemplo, em que o grupo OH- 2' é substituído por um grupo selecionado de H, -OR, -R (em que R pode ser, por exemplo, metila, alquila, cicloalquila, arila, aralquila, heteroarila ou açúcar), halo, -SH, -SR (em que R pode ser, por exemplo, alquila, cicloalquila, arila, aralquila, heteroarila ou açúcar), amina (em que amina pode ser, por exemplo NH₂; alquilamina, dialquilamina, heterociclila, arilamina, diarilamina, heteroarilamina, di-heteroarilamina ou aminoácido); ou ciano (-CN). Em algumas modalidades, o esqueleto de fosfato pode ser modificado como aqui descrito, por exemplo, com um grupo fosfotioato. Em algumas modalidades, os nucleotídeos na região *overhang* do gRNA podem ser cada um independentemente um nucleotídeo modificado ou não modificado, incluindo, mas não se limitando a 2'-açúcar modificado, tal como, 2-F 2'-O-metila, timidina (T), 2'-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2'-O-metoxietiladenosina (Aeo), 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina (m5Ceo) e quaisquer combinações dos mesmos.

[0621] Em uma modalidade, um ou mais ou todos os nucleotídeos *overhang* de cadeia simples de uma molécula de RNA, por exemplo,

uma molécula de gRNA, são desoxinucleotídeos.

Composições Farmacêuticas

[0622] As composições farmacêuticas da presente invenção podem compreender uma molécula de gRNA aqui descrita, por exemplo, uma pluralidade de moléculas de gRNA, tal como aqui descritas, ou uma célula (por exemplo, uma população de células, por exemplo, uma população de células-tronco hematopoiéticas, por exemplo, células CD34+) compreendendo uma ou mais células modificadas com uma ou mais moléculas de gRNA aqui descritas, em combinação com um ou mais veículos, diluentes ou excipientes farmacêuticamente ou fisiologicamente aceitáveis. Tais composições podem compreender tampões, tais como solução salina tamponada neutra, solução salina tamponada com fosfato e semelhantes; carboidratos, tais como glucose, manose, sacarose ou dextranos, manitol; proteínas; polipeptídeos ou aminoácidos como a glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tais como EDTA ou glutathione; adjuvantes (por exemplo, hidróxido de alumínio); e conservantes. As composições da presente invenção estão em um aspecto formuladas para administração intravenosa.

[0623] As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas de uma maneira apropriada à doença a ser tratada (ou prevenida). A quantidade e a frequência da administração serão determinadas por fatores como a condição do paciente e o tipo e a gravidade da doença do paciente, embora dosagens apropriadas possam ser determinadas por ensaios clínicos.

[0624] Em uma modalidade, a composição farmacêutica é substancialmente isenta de, por exemplo, não existem níveis detectáveis de um contaminante, por exemplo, selecionado do grupo consistindo de endotoxina, micoplasma, anticorpos de camundongo, soro humano reunido, albumina de soro bovino, soro de bovino, componentes do meio de cultura, componentes indesejados do sistema

CRISPR, uma bactéria e um fungo. Em uma modalidade, a bactéria é, pelo menos, uma selecionada a partir do grupo que consiste de *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* do grupo A.

[0625] A administração das presentes composições pode ser efetuada de qualquer maneira conveniente, incluindo por inalação de aerossol, injeção, ingestão, transfusão, implante ou transplante. As composições aqui descritas podem ser administradas a um paciente transarterialmente, subcutaneamente, intradermicamente, intratumoralmente, intranodalmente, intramedularmente, intramuscularmente, por injeção intravenosa (i.v.) ou intraperitonealmente. Em um aspecto, as composições da presente invenção são administradas a um doente por injeção intradérmica ou subcutânea. Em um aspecto, as composições celulares da presente invenção são administradas por injeção IV.

[0626] A dosagem dos tratamentos acima a serem administrados a um doente variará com a natureza exata da afeção a ser tratada e com o receptor do tratamento. O escalonamento de dosagens para administração humana pode ser realizado de acordo com práticas aceitas na técnica.

Células

[0627] A invenção também se refere a células compreendendo uma molécula de gRNA da invenção, ou ácido nucleico que codifica as referidas moléculas de gRNA.

[0628] Em um aspecto, as células são células feitas por um processo aqui descrito.

[0629] Em modalidades, as células são células-tronco hematopoiéticas (por exemplo, células-tronco hematopoiéticas e

progenitoras; HSPCs), por exemplo, células-tronco CD34+. Em modalidades, as células são células-tronco CD34+/CD90+. Em modalidades, as células são células-tronco CD34+/CD90-. Em modalidades, as células são células-tronco hematopoiéticas humanas. Em modalidades, as células são autólogas. Em modalidades, as células são alogênicas.

[0630] Em modalidades, as células são derivadas da medula óssea, por exemplo, medula óssea autóloga. Em modalidades, as células são derivadas de sangue periférico, por exemplo, sangue periférico mobilizado, por exemplo, sangue periférico mobilizado autólogo. Em modalidades que utilizam sangue periférico mobilizado, as células são isoladas a partir de pacientes que tenham sido administrados com um agente de mobilização. Em modalidades, o agente de mobilização é o G-CSF. Em modalidades, o agente de mobilização é o Plerixafor® (AMD3100). Em modalidades, o agente de mobilização compreende uma combinação de G-CSF e Plerixafor® (AMD3100). Em modalidades, as células são derivadas do sangue do cordão umbilical, por exemplo, sangue do cordão umbilical alogênico. Em modalidades, as células são derivadas de um paciente com hemoglobinopatia, por exemplo, um paciente com doença falciforme ou um paciente com talassemia, por exemplo, talassemia beta.

[0631] Em modalidades, as células são de mamíferos. Em modalidades, as células são humanas. Em modalidades, as células são derivadas de um paciente com hemoglobinopatia, por exemplo, um paciente com doença falciforme ou um paciente com talassemia, por exemplo, talassemia beta.

[0632] Em um aspecto, a invenção proporciona uma célula compreendendo uma modificação ou alteração, por exemplo, um indel em ou próximo de (por exemplo, dentro de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 nucleotídeos de) uma sequência

de ácido nucleico possuindo complementaridade com uma molécula de gRNA ou moléculas de gRNA, por exemplo, como aqui descrito, introduzidas nas referidas células, por exemplo, como parte de um sistema CRISPR como descrito aqui. Em modalidades, a célula é uma célula CD34+. Em modalidades, a célula alterada ou modificada, por exemplo, célula CD34+, mantém a capacidade de se diferenciar em células de múltiplas linhagens, por exemplo, mantém a capacidade de se diferenciar em células da linhagem eritroide. Em modalidades, a célula alterada ou modificada, por exemplo, células CD34+, sofreu ou é capaz de passar por, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9 ou pelo menos 10 ou mais duplicações em cultura, por exemplo, em cultura compreendendo um expansor de células-tronco, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol. Em modalidades, a célula alterada ou modificada, por exemplo, célula CD34+, sofreu ou é capaz de sofrer, pelo menos 5, por exemplo, cerca de 5 duplicações em cultura, por exemplo, em cultura compreendendo uma molécula expansora de células-tronco, por exemplo, como aqui descrito, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol. Em modalidades, a célula alterada ou modificada, por exemplo, célula CD34+, exibe e/ou é capaz de se diferenciar em uma célula, por exemplo, em uma célula da linhagem eritroide, por exemplo, em um glóbulo vermelho, que exibe um aumento no nível de hemoglobina fetal (por exemplo, nível de expressão e/ou nível de proteína), por exemplo, pelo menos um aumento de 20% no nível de proteína de hemoglobina fetal, em relação a uma célula similar não modificada ou inalterada. Em modalidades, a célula alterada ou modificada, por exemplo, célula CD34+, exibe e/ou é capaz de se diferenciar em uma célula, por exemplo, em uma célula da linhagem eritroide, por exemplo, em um

glóbulo vermelho, que exibe um aumento no nível de hemoglobina fetal (por exemplo, nível de expressão e/ou nível de proteína), em relação a uma célula similar não modificada ou inalterada, por exemplo, produz pelo menos 6 picogramas, por exemplo, pelo menos 7 picogramas, pelo menos 8 picogramas, pelo menos 9 picogramas, ou pelo menos 10 picogramas de hemoglobina fetal. Em modalidades, a célula alterada ou modificada, por exemplo, célula CD34+, exibe e/ou é capaz de se diferenciar em uma célula, por exemplo, em uma célula da linhagem eritroide, por exemplo, em um glóbulo vermelho, que exibe um aumento no nível de hemoglobina fetal (por exemplo, nível de expressão e/ou nível de proteína), em relação a uma célula similar não modificada ou inalterada, por exemplo, produz cerca de 6 a cerca de 12, cerca de 6 a cerca de 7, cerca de 7 a cerca de 8, cerca de 8 a cerca de 9, cerca de 9 a cerca de 10, cerca de 10 a cerca de 11 ou cerca de 11 a cerca de 12 picogramas de hemoglobina fetal.

[0633] Em um aspecto, a invenção proporciona uma população de células compreendendo células tendo uma modificação ou alteração, por exemplo, um indel em ou próximo de (por exemplo, dentro de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 nucleotídeos de) uma sequência de ácido nucleico possuindo complementaridade com uma molécula de gRNA ou moléculas de gRNA, por exemplo, como aqui descrito, introduzidas nas referidas células, por exemplo, como parte de um sistema CRISPR como descrito aqui. Em modalidades, pelo menos 50%, por exemplo, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou pelo menos 90% das células da população têm a modificação ou alteração (por exemplo, têm pelo menos uma modificação ou alteração), por exemplo, conforme medido por NGS, por exemplo, como aqui descrito, por exemplo, no dia dois após a introdução do gRNA e/ou sistema CRISPR da invenção. Em modalidades, pelo menos 90%, por exemplo, pelo menos 91%, pelo

menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% das células da população têm a modificação ou alteração (por exemplo, têm pelo menos uma modificação ou alteração), por exemplo, conforme medido por NGS, por exemplo, como aqui descrito, por exemplo, no dia dois após a introdução de gRNA e/ou sistema CRISPR da invenção. Em modalidades, a população de células compreende células CD34+, por exemplo, compreende pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 98% de células CD34+. Em modalidades, a população de células compreendendo as células alteradas ou modificadas, por exemplo, células CD34+, mantém a capacidade de produzir, por exemplo, diferenciar em, células de múltiplas linhagens, por exemplo, mantém a capacidade de produzir, por exemplo, diferenciar em, células da linhagem eritroide. Em modalidades, a população de células, por exemplo, células CD34+, sofreu ou é capaz de passar por, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9 ou pelo menos 10 ou mais duplicações de populações em cultura, por exemplo, em cultura compreendendo um expansor de células-tronco, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol. Em modalidades, a população de células alteradas ou modificadas, por exemplo, população de células CD34+, sofreu ou é capaz de sofrer, pelo menos 5, por exemplo, cerca de 5 duplicações de população em cultura, por exemplo, em cultura compreendendo uma molécula expansora de células-tronco, por exemplo, como aqui descrito, por exemplo, (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol. Em modalidades, a população de células compreendendo células alteradas ou modificadas, por exemplo, células CD34+, exibe e/ou é

capaz de se diferenciar em uma população de células, por exemplo, em uma população de células da linhagem eritroide, por exemplo, em uma população de glóbulos vermelhos, que exibe um aumento no nível de hemoglobina fetal (por exemplo, nível de expressão e/ou nível de proteína), por exemplo, pelo menos um aumento de 20% no nível de proteína de hemoglobina fetal, em relação a uma célula similar não modificada ou inalterada. Em modalidades, a população de células alteradas ou modificadas, por exemplo, células CD34+, exibe e/ou é capaz de se diferenciar em uma população de células, por exemplo, em uma população de células da linhagem eritroide, por exemplo, em uma população de glóbulos vermelhos, que exibe um aumento no nível de hemoglobina fetal (por exemplo, nível de expressão e/ou nível de proteína), em relação a células similares não modificadas ou inalteradas, por exemplo, compreende células que produzem pelo menos 6 picogramas, por exemplo, pelo menos 7 picogramas, pelo menos 8 picogramas, pelo menos 9 picogramas, ou pelo menos 10 picogramas de hemoglobina fetal por célula. Em modalidades, a população de células alteradas ou modificadas, por exemplo, células CD34+, exibe e/ou é capaz de se diferenciar em uma população de células, por exemplo, em uma população de células da linhagem eritroide, por exemplo, em uma população de glóbulos vermelhos, que exibe um aumento no nível de hemoglobina fetal (por exemplo, nível de expressão e/ou nível de proteína), em relação a uma célula similar não modificada ou inalterada, por exemplo, compreende células que produzem cerca de 6 a cerca de 12, cerca de 6 a cerca de 7, cerca de 7 a cerca de 8, cerca de 8 a cerca de 9, cerca de 9 a cerca de 10, cerca de 10 a cerca de 11 ou cerca de 11 a cerca de 12 picogramas de hemoglobina fetal por célula.

[0634] Em modalidades, a população de células, por exemplo, como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e3$ células. Em

modalidades, a população de células, por exemplo, como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e4$ células. Em modalidades, a população de células, por exemplo, como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e5$ células. Em modalidades, a população de células, por exemplo, como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e6$ células. Em modalidades, a população de células, por exemplo, como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e7$ células. Em modalidades, a população de células, por exemplo, como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e8$ células. Em modalidades, a população de células, por exemplo, como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e9$ células. Em modalidades, a população de células, por exemplo, como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e10$ células. Em modalidades, a população de células, por exemplo, como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e11$ células. Em modalidades, a população de células, por exemplo, como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e12$ células. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e13$ células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e6$ células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $2e6$ células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $3e6$ células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $4e6$ células

por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 5×10^6 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 6×10^6 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 7×10^6 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 8×10^6 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 9×10^6 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 1×10^7 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 2×10^7 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 3×10^7 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 4×10^7 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 5×10^7 células

por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 6×10^7 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 7×10^7 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 8×10^7 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 9×10^7 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 1×10^8 células por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em qualquer uma das modalidades acima mencionadas, a população de células pode compreender, pelo menos, cerca de 50% (por exemplo, pelo menos, cerca de 60%, pelo menos, cerca de 70%, pelo menos, cerca de 80%, pelo menos, cerca de 90%, pelo menos, cerca de 95% ou, pelo menos, cerca de 99%) de HSPCs, por exemplo, células CD34+. Em qualquer uma das modalidades acima mencionadas, a população de células pode compreender cerca de 60% de HSPCs, por exemplo, células CD34+. Em uma modalidade, a população de células, por exemplo, como aqui descrita, compreende cerca de 3×10^7 células e compreende cerca de 2×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+. Conforme usado ao longo deste pedido, a notação científica [número]e[número] é dado o seu significado comum. Assim, por exemplo, 2×10^6 é equivalente a 2×10^6 ou 2.000.000.

[0635] Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal

como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1e6$ HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $1.5e6$ HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $2e6$ HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $3e6$ HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $4e6$ HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $5e6$ HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $6e6$ HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $7e6$ HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de $8e6$ HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do

paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 9×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 1×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 2×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 3×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 4×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 5×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 6×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 7×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende,

pelo menos, cerca de 8×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 9×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 1×10^8 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 2×10^8 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 3×10^8 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 4×10^8 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende, pelo menos, cerca de 5×10^8 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas.

[0636] Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 1×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 1.5×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso

corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 2×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 3×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 4×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 5×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 6×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 7×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 8×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 9×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 1×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso

corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 2×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 3×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 4×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 5×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 6×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 7×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 8×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 9×10^7 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 1×10^8 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso

corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 2×10^8 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 3×10^8 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 4×10^8 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende cerca de 5×10^8 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas.

[0637] Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende a partir de cerca de 2×10^6 a cerca de 10×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas. Em modalidades, a população de células, por exemplo, tal como aqui descrita, compreende a partir de 2×10^6 a 10×10^6 HSPCs, por exemplo, células CD34+, por quilograma de peso corporal do paciente ao qual elas devem ser administradas.

[0638] As células da invenção podem compreender uma molécula de gRNA da presente invenção, ou ácido nucleico que codifica a referida molécula de gRNA e uma molécula Cas9 da presente invenção, ou ácido nucleico que codifica a referida molécula Cas9. Em uma modalidade, as células da invenção podem compreender um complexo de proteína ribonuclear (RNP) que compreende uma molécula de gRNA da invenção e uma molécula Cas9 da invenção.

[0639] As células da invenção são, preferencialmente, modificadas para compreender uma molécula de gRNA da invenção ex vivo, por exemplo, através de um modo aqui descrito, por exemplo, por eletroporação ou por TRIAMF (como descrito no pedido de patente PCT/US2017/54110, aqui incorporado por referência na sua totalidade).

[0640] As células da invenção incluem células nas quais a expressão de um ou mais genes foi alterada, por exemplo, reduzida ou inibida, por introdução de um sistema CRISPR compreendendo um gRNA da invenção. Por exemplo, as células da presente invenção podem ter um nível reduzido de expressão de globina beta (por exemplo, hemoglobina beta compreendendo uma mutação falciforme) em relação a células não modificadas. Como outro exemplo, as células da presente invenção podem ter um nível aumentado de expressão de hemoglobina fetal em relação a células não modificadas. Alternativamente, ou adicionalmente, uma célula da invenção pode dar origem, por exemplo, diferenciar-se em outro tipo de célula, por exemplo, um eritrócito, que tem um nível aumentado de expressão de hemoglobina fetal relativamente a células diferenciadas de células não modificadas. Em modalidades, o aumento no nível de hemoglobina fetal é pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40% ou pelo menos cerca de 50%. Alternativamente, ou adicionalmente, uma célula da invenção pode dar origem, por exemplo, diferenciar-se a outro tipo de célula, por exemplo, um eritrócito, que tem um nível reduzido de expressão de globina beta (por exemplo, hemoglobina beta compreendendo uma mutação falciforme, também referida para aqui como globina beta falciforme) em relação a células diferenciadas das células não modificadas. Em modalidades, a diminuição do nível de globina beta falciforme é de pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40% ou pelo menos cerca de 50%.

[0641] As células da invenção incluem células nas quais a expressão de um ou mais genes foi alterada, por exemplo, reduzida ou inibida, por introdução de um sistema CRISPR compreendendo um gRNA da invenção. Por exemplo, as células da presente invenção podem ter um nível reduzido de expressão de hemoglobina beta, por exemplo uma hemoglobina beta mutada ou de tipo selvagem, em relação a células não modificadas. Em outro aspecto, a invenção proporciona células que são derivadas de, por exemplo, diferenciadas de células nas quais um sistema CRISPR compreendendo um gRNA da invenção foi introduzido. Em tais aspectos, as células nas quais o sistema CRISPR compreendendo o gRNA da invenção foi introduzido podem não exibir o nível reduzido de hemoglobina beta, por exemplo, uma hemoglobina beta mutada ou de tipo selvagem, mas as células derivadas de, por exemplo, diferenciadas das referidas células exibem o nível reduzido de hemoglobina beta, por exemplo, uma hemoglobina beta de tipo selvagem ou mutada. Em modalidades, a derivação, por exemplo, diferenciação, é realizada in vivo (por exemplo, em um paciente, por exemplo, em um paciente com hemoglobinopatia, por exemplo, em um paciente com doença falciforme ou talassemia, por exemplo, talassemia beta). Em modalidades, as células nas quais foi introduzido o sistema CRISPR compreendendo o gRNA da invenção, são células CD34+ e as células derivadas, por exemplo, diferenciadas, daí são da linhagem eritroide, por exemplo, glóbulos vermelhos.

[0642] As células da invenção incluem células nas quais a expressão de um ou mais genes foi alterada, por exemplo, aumentada ou promovida, pela introdução de um sistema CRISPR compreendendo um gRNA da invenção. Por exemplo, as células da presente invenção podem ter um nível aumentado de expressão de hemoglobina fetal em relação a células não modificadas. Em outro aspecto, a invenção proporciona células que são derivadas de, por exemplo, diferenciadas

de células nas quais um sistema CRISPR compreendendo um gRNA da invenção foi introduzido. Nestes aspectos, as células nas quais o sistema CRISPR compreendendo o gRNA da invenção foi introduzido podem não exibir o nível aumentado de hemoglobina fetal, mas as células derivadas de, por exemplo, diferenciadas das referidas células exibem o nível aumentado de hemoglobina fetal. Em modalidades, a derivação, por exemplo, diferenciação, é realizada in vivo (por exemplo, em um paciente, por exemplo, em um paciente com hemoglobinopatia, por exemplo, em um paciente com doença falciforme ou talassemia, por exemplo, talassemia beta). Em modalidades, as células nas quais foi introduzido o sistema CRISPR compreendendo o gRNA da invenção, são células CD34+ e as células derivadas, por exemplo, diferenciadas, daí são da linhagem eritroide, por exemplo, glóbulos vermelhos.

[0643] Em outro aspecto, a invenção refere-se a células que incluem um indel em (por exemplo, dentro) ou próximo de (por exemplo, dentro de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 nucleotídeos de) uma sequência de ácido nucleico tendo complementaridade com a molécula de gRNA (por exemplo, a sequência-alvo da molécula de gRNA) ou moléculas de gRNA introduzidas nas referidas células. Em modalidades, a indel é uma indel de deslocamento do quadro de leitura. Em modalidades, a célula inclui uma grande deleção, por exemplo, uma deleção de 1 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb ou mais. Em modalidades, a grande deleção compreende ácidos nucleicos dispostos entre dois sítios de ligação para a molécula de gRNA ou moléculas de gRNA introduzidas nas referidas células. Em modalidades, a deleção compreende, por exemplo, consiste em, cerca de 4900 nt dispostos entre a sequência-alvo de um gRNA aqui descrito disposto na região promotora de HBG1 e a sequência-alvo de um gRNA aqui descrito disposto na região promotora de HBG2. Em modalidades, o indel, por exemplo, a deleção, não compreende um nucleotídeo

disposto entre 5,250,092 e 5,249,833, - cadeia (hg38).

[0644] Em um aspecto, a invenção refere-se a uma população de células (por exemplo, como aqui descrito), por exemplo, uma população de HSPCs, que compreende células que incluem um indel em ou próximo de (por exemplo, dentro de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 nucleotídeos de) uma sequência de ácido nucleico possuindo complementaridade com uma molécula de gRNA ou moléculas de gRNA, por exemplo, como aqui descrito, introduzidas nas referidas células, por exemplo, como descrito aqui. Em modalidades, a indel é uma indel de deslocação do quadro de leitura. Em modalidades, a população de células inclui células que compreendem uma deleção grande, por exemplo, uma deleção de 1 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb ou mais. Em modalidades, a grande deleção compreende ácidos nucleicos dispostos entre dois sítios de ligação para a molécula de gRNA ou moléculas de gRNA introduzidas nas referidas células. Em modalidades, a deleção compreende, por exemplo, consiste em, cerca de 4900 nt dispostos entre a sequência-alvo de um gRNA aqui descrito disposto na região promotora de HBG1 e a sequência-alvo de um gRNA aqui descrito disposto na região promotora de HBG2. Em modalidades, menos de 1%, 0,5%, 0,1% ou 0,001% das células da população (por exemplo, nenhuma célula da população) compreende uma deleção de um nucleotídeo disposto entre 5,250,092 e 5,249,833, - cadeia (hg38). Em modalidades, 20%-100% das células da população incluem a referida deleção grande, indel ou indels. Em modalidades, 30%-100% das células da população incluem a referida deleção grande, indel ou indels. Em modalidades, 40%-100% das células da população incluem a referida deleção grande, indel ou indels. Em modalidades, 50%-100% das células da população incluem a referida deleção grande, indel ou indels. Em modalidades, 60%-100% das células da população incluem a referida deleção grande, indel ou indels. Em modalidades,

70%-100% das células da população incluem a referida deleção grande, indel ou indels. Em modalidades, 80%-100% das células da população incluem a referida deleção grande, indel ou indels. Em modalidades, 90%-100% das células da população incluem a referida deleção grande, indel ou indels. Em modalidades, a população de células retém a capacidade de se diferenciar em vários tipos de células, por exemplo, mantém a capacidade de se diferenciar em células de linhagem eritroide, por exemplo, glóbulos vermelhos, por exemplo, em um sujeito, por exemplo, um ser humano. Em modalidades, as células editadas (por exemplo, células HSPC, por exemplo, células CD34+, por exemplo, qualquer subpopulação de células CD34+, por exemplo, como aqui descrito) mantêm a capacidade (e/ou) de proliferar, por exemplo, em cultura celular, por exemplo, proliferam pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 15 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 25 vezes, pelo menos 30 vezes, pelo menos 35 vezes, pelo menos 40 vezes, pelo menos 45 vezes, pelo menos 50 vezes ou mais, por exemplo, após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou mais dias (por exemplo, após cerca de 1 ou cerca de 2 dias) em cultura celular, por exemplo, em um meio de cultura de células aqui descrito, por exemplo, um meio de cultura de células compreendendo um ou mais expansores de células-tronco, por exemplo, composto 4. Em modalidades, as células editadas e diferenciadas (por exemplo, glóbulos vermelhos) mantêm a capacidade de proliferar, por exemplo, proliferam pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 15 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 25 vezes, pelo menos 30 vezes, pelo menos 35 vezes, pelo menos 40 vezes, pelo menos 45 vezes, pelo menos 50 vezes ou mais após 7 dias em meio de diferenciação eritroide (EDM), por exemplo, conforme descrito nos Exemplos, e/ou proliferam, pelo menos 30 vezes, pelo menos 35 vezes, pelo menos 40 vezes, pelo menos 45 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 55 vezes, pelo menos 60 vezes, pelo

menos 65 vezes, pelo menos 70 vezes, pelo menos 75 vezes, pelo menos 80 vezes, pelo menos 85 vezes, pelo menos 90 vezes, pelo menos 95 vezes, pelo menos 100 vezes, pelo menos 110 vezes, pelo menos 120 vezes, pelo menos 130 vezes, pelo menos 140 vezes, pelo menos 150 vezes, pelo menos 200 vezes, pelo menos 300 vezes, pelo menos 400 vezes, pelo menos 500 dobrar, pelo menos 600 vezes, pelo menos 700 vezes, pelo menos 800 vezes, pelo menos 900 vezes, pelo menos 1000 vezes, pelo menos 1100 vezes, pelo menos 1200 vezes, pelo menos 1300 vezes, pelo menos 1400 vezes, pelo menos 1500 vezes ou mais após 21 dias, por exemplo, em meio de diferenciação eritroide (EDM), por exemplo, como descrito nos Exemplos, ou em um sujeito (por exemplo, um mamífero, por exemplo, um ser humano).

[0645] Em uma modalidade, a invenção proporciona uma população de células, por exemplo, células CD34+, das quais pelo menos 90%, por exemplo, pelo menos 95%, por exemplo, pelo menos 98%, das células da população compreendem uma deleção grande ou um ou mais indels, por exemplo, como aqui descrito. Sem estar ligado por teoria, acredita-se que a introdução de uma molécula de gRNA ou sistema CRISPR como aqui descrito em uma população de células produz um padrão de indels e/ou grandes deleções na referida população, e assim, cada célula da população que compreende um indel e/ou grande deleção pode não exibir o mesmo indel e/ou grande deleção. Em modalidades, o indel e/ou grande deleção compreende um ou mais ácidos nucleicos em ou perto de um sítio complementar ao domínio-alvo de uma molécula gRNA aqui descrita; as células mantêm a capacidade de se diferenciar em células de uma linhagem eritroide, por exemplo, glóbulos vermelhos; e/ou em que as referidas células diferenciadas da população de células têm um nível aumentado de hemoglobina fetal (por exemplo, a população tem uma maior % de células F) em relação às células diferenciadas de uma população

semelhante de células não modificadas. Em modalidades, a população de células sofreu pelo menos uma expansão de 2 vezes ex vivo, por exemplo, nos meios compreendendo um ou mais expansores de células-tronco, por exemplo, compreendendo (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol. Em

modalidades, a população de células sofreu pelo menos uma expansão de 5 vezes ex vivo, por exemplo, nos meios compreendendo um ou mais expansores de células-tronco, por exemplo, compreendendo (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol.

[0646] Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 50 nucleotídeos, por exemplo, inferior a cerca de 45, inferior a cerca de 40, inferior a cerca de 35, inferior a cerca de 30 ou inferior a cerca de 25 nucleotídeos. Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 25 nucleotídeos. Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 20 nucleotídeos. Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 15 nucleotídeos. Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 10 nucleotídeos. Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 9 nucleotídeos. Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 9 nucleotídeos. Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 7 nucleotídeos. Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 6 nucleotídeos. Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 5 nucleotídeos. Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 4 nucleotídeos. Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 3 nucleotídeos. Em modalidades, a indel é inferior a cerca de 2 nucleotídeos. Em qualquer das modalidades acima mencionadas, a indel é, pelo menos, 1 nucleotídeo. Em modalidades, a indel é 1 nucleotídeo. Em modalidades, a grande deleção compreende cerca de 1 kb de DNA. Em modalidades, a grande deleção compreende cerca de 2 kb de DNA. Em modalidades, a grande deleção compreende cerca de

3 kb de DNA. Em modalidades, a grande deleção compreende cerca de 4 kb de DNA. Em modalidades, a grande deleção compreende cerca de 5 kb de DNA. Em modalidades, a grande deleção compreende cerca de 6 kb de DNA. Em modalidades, a grande deleção compreende cerca de 4,9 kb de DNA, por exemplo, dispostos entre uma sequência-alvo na região promotora de HBG1 e uma sequência-alvo na região promotora de HBG2.

[0647] Em modalidades, uma população de células (por exemplo, tal como aqui descrito) compreende um padrão de indels e/ou grandes deleções compreendendo qualquer 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dos indels mais frequentemente detectados associados com um sistema de CRISPR compreendendo uma molécula de gRNA aqui descrita, por exemplo, compreende 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dos indels e grandes deleções descritas na Tabela 7-2 (por exemplo, compreende 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dos indels e grandes deleções detectados em ou perto da sequência-alvo de HBG1 e/ou compreendem 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dos indels e grandes deleções detectados em ou perto da sequência-alvo de HBG2). Em modalidades, os indels e/ou grandes deleções são detectados por um método aqui descrito, por exemplo, por NGS ou qPCR.

[0648] Em um aspecto, a célula ou população de células (por exemplo, como aqui descrito) não compreende um indel ou grande deleção em um sítio fora do alvo, por exemplo, como detectado por um método aqui descrito.

[0649] Em modalidades, a descendência, por exemplo, descendência diferenciada, por exemplo, descendência eritroide (por exemplo, glóbulos vermelhos) da célula ou população de células aqui descritas (por exemplo, derivada de um paciente com doença falciforme) produz um nível inferior de globina beta falciforme e/ou um nível mais elevado de globina gama do que as células não modificadas. Em modalidades, a descendência, por exemplo, descendência

diferenciada, por exemplo, descendência eritroide (por exemplo, glóbulos vermelhos) da célula ou população de células aqui descritas (por exemplo, derivada de um paciente com doença falciforme) produz um nível inferior de globina beta falciforme e um nível mais elevado de globina gama do que as células não modificadas. Em modalidades, a globina beta falciforme é produzida a um nível pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40% ou pelo menos cerca de 50% inferior às células não modificadas. Em modalidades, a globina gama é produzida a um nível pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60% ou pelo menos cerca de 70% superior às células não modificadas.

[0650] Em um aspecto, a invenção proporciona uma população de HSPCs modificadas ou células eritroides diferenciadas das referidas HSPCs (por exemplo, diferenciadas *ex vivo* ou em um paciente), por exemplo, como aqui descrito, em que pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% das células são células F. Em modalidades, a população de células contém (ou é capaz de se diferenciar, por exemplo, *in vivo*, em uma população de eritrócitos que contém) uma maior percentagem de células F do que uma população semelhante de células que não teve uma molécula de gRNA ou moléculas de gRNA, por exemplo, como aqui descrito, introduzida nas referidas células. Em modalidades, a população de células tem (ou é capaz de se diferenciar, por exemplo, *in vivo*, em uma população de eritrócitos que tem), pelo menos, um aumento de 20%, por exemplo, pelo menos um aumento de 21%, pelo menos um aumento de 22%, pelo menos um aumento de 23%, pelo menos um aumento de

24%, pelo menos um aumento de 25%, pelo menos um aumento de 26%, pelo menos um aumento de 27%, pelo menos um aumento de 28% ou pelo menos um aumento de 29%, nas células F em relação à população similar de células, que não teve uma molécula de gRNA ou moléculas de gRNA, por exemplo, como aqui descrito, introduzida nas referidas células. Em modalidades, a população de células tem (ou é capaz de se diferenciar, por exemplo, *in vivo*, em uma população de eritrócitos que tem), pelo menos um aumento de 30%, por exemplo, pelo menos um aumento de 35%, pelo menos um aumento de 40%, pelo menos um aumento de 45%, pelo menos um aumento de 50%, pelo menos um aumento de 55%, pelo menos um aumento de 60%, pelo menos um aumento de 65%, pelo menos um aumento de 70%, pelo menos um aumento de 75%, pelo menos um aumento de 80%, pelo menos um aumento de 85%, pelo menos um aumento de 90% ou pelo menos um aumento de 95%, nas células F em relação à população similar de células, que não teve uma molécula de gRNA ou moléculas de gRNA, por exemplo, como aqui descrito, introduzida nas referidas células. Em modalidades, a população de células tem (ou é capaz de diferenciar, por exemplo, *in vivo*, em uma população de eritrócitos que tem) um aumento de 10-90%, 20%-80%, 20%-70%, 20%-60%, 20%-50%, 20%-40%, 20%-30%, 25%-80%, 25%-70%, 25%-60%, 25%-50%, 25%-40%, 25%-35%, 25%-30%, 30%-80%, 30%-70%, 30%-60%, 30%-50%, 30%-40% ou 30%-35% em células F em relação à população semelhante de células que não teve uma molécula de gRNA ou moléculas de gRNA, por exemplo, como aqui descrito, introduzida nas referidas células. Em modalidades, a população de células, por exemplo, como produzida por um método aqui descrito, compreende um número de células suficiente e/ou um aumento suficiente na % de células F para tratar uma hemoglobinopatia, por exemplo, como aqui descrito, por exemplo, doença falciforme e/ou beta-talassemia, em um

doente que dela necessite quando introduzida no referido paciente, por exemplo, em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Em modalidades, o aumento em células F é como medido em um ensaio de diferenciação eritroide, por exemplo, como aqui descrito.

[0651] Em modalidades, incluindo em qualquer das modalidades e aspectos aqui descritos, a invenção refere-se a uma célula, por exemplo, uma população de células, por exemplo, como modificada por qualquer de gRNA, métodos e/ou sistemas de CRISPR aqui descritos, compreendendo células F que produzem pelo menos 6 picogramas de hemoglobina fetal por célula. Em modalidades, as células F produzem pelo menos 7 picogramas de hemoglobina fetal por célula. Em modalidades, as células F produzem pelo menos 8 picogramas de hemoglobina fetal por célula. Em modalidades, as células F produzem pelo menos 9 picogramas de hemoglobina fetal por célula. Em modalidades, as células F produzem pelo menos 10 picogramas de hemoglobina fetal por célula. Em modalidades, as células F produzem uma média entre 6,0 e 7,0 picogramas, entre 7,0 e 8,0, entre 8,0 e 9,0, entre 9,0 e 10,0, entre 10,0 e 11,0, ou entre 11,0 e 12,0 picogramas de hemoglobina fetal por célula.

[0652] Em modalidades, uma célula ou população de células, por exemplo, tal como aqui descrito (por exemplo, compreendendo um indel, por exemplo, uma grande deleção ou indel descrito na Tabela 7-2) (ou a sua descendência), é detectável nas células de um sujeito ao qual é introduzido, por exemplo, permanece detectável detectando o indel, por exemplo, utilizando um método aqui descrito. Em modalidades, a célula ou população de células (ou a sua descendência) é detectável em um sujeito ao qual é introduzido durante pelo menos 10 semanas, pelo menos 14 semanas, pelo menos 16 semanas, pelo menos 18 semanas, pelo menos 20 semanas, pelo menos 30 semanas, pelo menos 40 semanas, pelo menos 50 semanas ou mais depois da

referida célula ou população de células ser introduzida no referido sujeito.

[0653] Em modalidades, um ou mais indels (por exemplo, uma grande deleção ou indel descrito na Tabela 7-2), é detectável nas células (por exemplo, as células, por exemplo, células CD34+, da medula óssea e/ou sangue periférico) de um sujeito ao qual as células ou população de células aqui descritas foram introduzidas, por exemplo, permanece detectável por um método aqui descrito, por exemplo, NGS. Em modalidades, o um ou mais indels é detectável nas células (por exemplo, as células, por exemplo, células CD34+, de medula óssea e/ou sangue periférico) de um sujeito ao qual foram introduzidas as células ou população de células aqui descritas durante pelo menos 10 semanas, pelo menos 14 semanas, pelo menos 16 semanas, pelo menos 18 semanas, pelo menos 20 semanas, pelo menos 30 semanas, pelo menos 40 semanas, pelo menos 50 semanas ou mais após a célula ou população de células descritas aqui serem introduzidas no referido sujeito. Em modalidades, o nível de detecção do referido um ou mais indels não diminui ao longo do tempo, ou uma redução de menos do que 5%, menos do que 10%, menos do que 15%, menos do que 20%, menos do que 30%, menos do que 40 % ou menos do que 50% (por exemplo, em relação ao nível de detecção de indel pré-transplante ou relativo ao nível de detecção na semana 2 pós-transplante ou na semana 8 pós-transplante), por exemplo, quando medido na semana 20 pós-transplante em relação ao nível de detecção (por exemplo, percentagem de células compreendendo o um ou mais indels) medido antes do transplante ou medido na semana 2 após o transplante ou na semana 8 após o transplante.

[0654] Em modalidades, incluindo qualquer das modalidades acima mencionadas, a célula e/ou população de células da invenção inclui, por exemplo, consiste em, células que não compreendem o ácido nucleico

que codifica uma molécula Cas9.

Métodos de Tratamento

Tempo de entrega

[0655] Em uma modalidade, uma ou mais moléculas de ácido nucleico (por exemplo, moléculas de DNA), com exceção dos componentes de um sistema de Cas, por exemplo, o componente da molécula Cas9 e/ou o componente de molécula de gRNA aqui descritos, são entregues. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico é entregue ao mesmo tempo que um ou mais componentes do sistema Cas são entregues. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico é entregue antes ou depois (por exemplo, menos do que cerca de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 6 horas, 9 horas, 12 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 1 semana, 2 semanas ou 4 semanas) de um ou mais componentes do sistema Cas serem entregues. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico é entregue por um meio diferente do que um ou mais dos componentes do sistema de Cas, por exemplo, o componente molécula Cas9 e/ou o componente de molécula de gRNA, são entregues. A molécula de ácido nucleico pode ser entregue por qualquer um dos modos de entrega aqui descritos. Por exemplo, a molécula de ácido nucleico pode ser administrada por um vetor viral, por exemplo, um lentivírus deficiente em integração, e o componente da molécula Cas9 e/ou o componente da molécula de gRNA podem ser administrados por eletroporação, por exemplo, a toxicidade causada por ácidos nucleicos (por exemplo, DNAs) pode ser reduzida. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico codifica uma proteína terapêutica, por exemplo, uma proteína aqui descrita. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico codifica uma molécula de RNA, por exemplo, uma molécula de RNA aqui descrita.

Entrega Bi-modal ou Diferencial de Componentes

[0656] A entrega separada dos componentes de um sistema Cas,

por exemplo, o componente da molécula Cas9 e o componente da molécula de gRNA e, mais particularmente, a entrega dos componentes por modos diferentes, pode melhorar o desempenho, por exemplo, melhorando a especificidade e segurança do tecido. Em uma modalidade, a molécula Cas9 e a molécula de gRNA são entregues por modos diferentes, ou como por vezes aqui referidos, como modos diferenciais. Modos diferentes ou diferenciais, como aqui utilizados, referem-se a modos de entrega que conferem propriedades farmacodinâmicas ou farmacocinéticas diferentes na molécula componente objeto, por exemplo, uma molécula Cas9, molécula de gRNA, ácido nucleico molde ou carga. Por exemplo, os modos de entrega podem resultar em distribuição tecidual diferente, meia-vida diferente ou distribuição temporal diferente, por exemplo, em um compartimento, tecido ou órgão selecionado.

[0657] Alguns modos de entrega, por exemplo, entrega por um vetor de ácido nucleico que persiste em uma célula, ou em descendência de uma célula, por exemplo, por replicação autônoma ou inserção em ácido nucleico celular, resultam em uma expressão mais persistente da presença de um componente. Exemplos incluem entrega viral, por exemplo, vírus adeno-associados ou lentivírus.

[0658] A título exemplificativo, os componentes, por exemplo, uma molécula Cas9 e uma molécula de gRNA, podem ser entregues por modos que diferem em termos da meia-vida resultante ou persistentes do componente entregue no corpo, ou em um compartimento particular, tecido ou órgão. Em uma modalidade, uma molécula de gRNA pode ser entregue por esses modos. O componente da molécula Cas9 pode ser entregue por um modo que resulte em menor persistência ou menor exposição do mesmo ao corpo ou a um compartimento ou tecido ou órgão específico.

[0659] Mais geralmente, em uma modalidade, um primeiro modo de

entrega é utilizado para entregar um primeiro componente e um segundo modo de entrega é utilizado para entregar um segundo componente. O primeiro modo de entrega confere uma primeira propriedade farmacodinâmica ou farmacocinética. A primeira propriedade farmacodinâmica pode ser, por exemplo, distribuição, persistência ou exposição, do componente, ou de um ácido nucleico que codifica o componente, no corpo, em um compartimento, tecido ou órgão. O segundo modo de entrega confere uma segunda propriedade farmacodinâmica ou farmacocinética. A segunda propriedade farmacodinâmica pode ser, por exemplo, distribuição, persistência ou exposição, do componente, ou de um ácido nucleico que codifica o componente, no corpo, em um compartimento, tecido ou órgão.

[0660] Em uma modalidade, a primeira propriedade farmacodinâmica ou farmacocinética, por exemplo, distribuição, persistência ou exposição, é mais limitada do que a segunda propriedade farmacodinâmica ou farmacocinética.

[0661] Em uma modalidade, o primeiro modo de entrega é selecionado para otimizar, por exemplo, minimizar, uma propriedade farmacodinâmica e farmacocinética, por exemplo, distribuição, persistência ou exposição.

[0662] Em uma modalidade, o segundo modo de entrega é selecionado para otimizar, por exemplo, maximizar, uma propriedade farmacodinâmica e farmacocinética, por exemplo, distribuição, persistência ou exposição.

[0663] Em uma modalidade, o primeiro modo de distribuição compreende a utilização de um elemento relativamente persistente, por exemplo, um ácido nucleico, por exemplo, um plasmídeo ou vetor viral, por exemplo, um AAV ou um lentivírus. Como tais vetores são relativamente persistentes, produto transcrito a partir dele, seria relativamente persistente.

[0664] Em uma modalidade, o segundo modo de entrega compreende um elemento relativamente transiente, por exemplo, um RNA ou proteína.

[0665] Em uma modalidade, o primeiro componente compreende gRNA, e o modo de entrega é relativamente persistente, por exemplo, o gRNA é transcrito de um plasmídeo ou vetor viral, por exemplo, um AAV ou lentivírus. A transcrição desses genes seria de pouca consequência fisiológica, porque os genes não codificam para um produto proteico, e os gRAs são incapazes de agir isoladamente. O segundo componente, uma molécula Cas9, é distribuído de uma maneira transiente, por exemplo como mRNA ou como proteína, garantindo que o complexo completo de molécula Cas9/molécula de gRNA está presente e ativo apenas por um curto período de tempo.

[0666] Além disso, os componentes podem ser entregues em diferentes formas moleculares ou com diferentes vetores de entrega que se complementam para aumentar a segurança e a especificidade dos tecidos.

[0667] O uso de modos de entrega diferenciais pode melhorar o desempenho, segurança e eficácia. Por exemplo, a probabilidade de uma eventual modificação fora do alvo pode ser reduzida. Entrega de componentes imunogênicos, por exemplo, moléculas Cas9, por modos menos persistentes podem reduzir a imunogenicidade, como peptídeos da enzima Cas derivada de bactérias são apresentados na superfície da célula por moléculas MHC. Um sistema de entrega de duas partes pode aliviar essas desvantagens.

[0668] Os modos de entrega diferencial podem ser usados para fornecer componentes para regiões alvo diferentes, mas sobrepostas. O complexo ativo de formação é minimizado fora da sobreposição das regiões alvo. Assim, em uma modalidade, um primeiro componente, por exemplo, uma molécula de gRNA, é entregue por um primeiro modo de

entrega que resulta em uma primeira distribuição espacial, por exemplo, de tecido. Um segundo componente, por exemplo, uma molécula Cas9, é entregue por um segundo modo de entrega que resulta em uma segunda distribuição espacial, por exemplo, de tecido. Em uma modalidade, o primeiro modo compreende um primeiro elemento selecionado a partir de um lipossoma, de nanopartícula, por exemplo, de nanopartícula polimérica e um ácido nucleico, por exemplo, vetor viral. O segundo modo compreende um segundo elemento selecionado do grupo. Em uma modalidade, o primeiro modo de entrega compreende um primeiro elemento de direcionamento, por exemplo, um receptor celular específico ou um anticorpo, e o segundo modo de entrega não inclui esse elemento. Em uma modalidade, o segundo modo de entrega compreende um segundo elemento de direcionamento, por exemplo, um segundo receptor celular específico ou segundo anticorpo.

[0669] Quando a molécula Cas9 é entregue em um vetor de entrega de vírus, lipossoma ou nanopartícula polimérica, existe o potencial para entrega e atividade terapêutica em múltiplos tecidos, quando pode ser desejável que apenas um único tecido seja atingido. Um sistema de entrega em duas partes pode resolver esse desafio e melhorar a especificidade do tecido. Se a molécula de gRNA e a molécula Cas9 forem empacotadas em veículos de entrega separados com tropismo de tecido distinto mas sobreposto, o complexo totalmente funcional só será formado no tecido que é alvo de ambos os vetores.

[0670] As moléculas Cas candidatas, por exemplo, moléculas Cas9, moléculas candidatas de gRNA, complexos candidatos de moléculas Cas9/gRNA e sistemas CRISPR candidatos, podem ser avaliadas por modos conhecidos na técnica ou como aqui descrito. Por exemplo, os métodos exemplificativos para avaliar a atividade de endonuclease da molécula Cas9 são descritos, por exemplo, em Jinek et al, SCIENCE

2012; 337(6096):8 16-821.

[0671] Aspectos adicionais são descritos nas modalidades enumeradas, abaixo.

[0672] Modalidades:

[0673] 1. Molécula de gRNA compreendendo tracr e crRNA, em que o crRNA compreende um domínio-alvo que:

a) é complementar com uma sequência-alvo de uma região HFPH não deleção (por exemplo, uma região HPFH não deleção humana);

b) é complementar com uma sequência-alvo na sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,249,833 a Chr11:5,250,237, - cadeia, hg38;

c) é complementar com uma sequência-alvo na sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,254,738 a Chr11:5,255,164, - cadeia, hg38;

d) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,250,094-5,250,237, - cadeia, hg38;

e) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,255,022-5,255,164, - cadeia, hg38;

f) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11: 5,249,833-5,249,927, - cadeia, hg38;

g) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11: 5,254,738-5,254,851, - cadeia, hg38;

h) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,250,139-5,250,237, - cadeia, hg38; ou

i) suas combinações.

[0674] 2. A molécula de gRNA da modalidade 1, em que o domínio-alvo compreende, por exemplo, consiste em, qualquer uma de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 72, ou um seu fragmento.

[0675] 3. A molécula de gRNA da modalidade 2, em que o domínio-alvo compreende, por exemplo, consiste em, qualquer uma de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67, ou um seu fragmento.

[0676] 4. A molécula de gRNA da modalidade 2, em que o domínio-alvo compreende, por exemplo, consiste em, qualquer uma de
a) SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 67, ou um seu fragmento; ou
b) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 54, ou um seu fragmento.

[0677] 5. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 2-4, em que o domínio-alvo compreende, por exemplo, consiste em, 17, 18, 19 ou 20 ácidos nucleicos consecutivos de qualquer uma das sequências de domínio-alvo recitadas.

[0678] 6. A molécula de gRNA da modalidade 5, em que os 17, 18, 19 ou 20 ácidos nucleicos consecutivos de qualquer uma das sequências de domínio-alvo recitadas são os 17, 18, 19 ou 20 ácidos nucleicos consecutivos dispostos na extremidade 3' da sequência de domínio-alvo recitada.

[0679] 7. A molécula de gRNA da modalidade 5, em que os 17, 18, 19 ou 20 ácidos nucleicos consecutivos de qualquer uma das sequências de domínio-alvo recitadas são os 17, 18, 19 ou 20 ácidos nucleicos consecutivos dispostos na extremidade 5' da sequência de

domínio-alvo recitada.

[0680] 8. A molécula de gRNA da modalidade 5, em que os 17, 18, 19 ou 20 ácidos nucleicos consecutivos de qualquer uma das sequências de domínio-alvo recitadas não compreendem o ácido nucleico 5' ou 3' da sequência de domínio-alvo recitada.

[0681] 9. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 2-8, em que o domínio-alvo consiste na sequência de domínio-alvo recitada.

[0682] 10. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades anteriores, em que uma porção do crRNA e uma porção do tracr hibridizam para formar um mastro compreendendo SEQ ID NO: 182 ou 183.

[0683] 11. A molécula de gRNA da modalidade 10, em que o mastro compreende adicionalmente uma primeira extensão do mastro, localizada 3' em relação à porção de crRNA do mastro, em que a referida primeira extensão do mastro compreende SEQ ID NO: 184.

[0684] 12. A molécula de gRNA da modalidade 10 ou 11, em que o mastro compreende adicionalmente uma segunda extensão do mastro localizada 3' em relação à porção de crRNA do mastro e, se presente, a primeira extensão do mastro, em que a referida segunda extensão do mastro compreende SEQ ID NO: 185.

[0685] 13. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-12, em que o tracr compreende SEQ ID NO: 224, ou uma SEQ ID NO: 225.

[0686] 14. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-13, em que o tracr compreende SEQ ID NO: 232, opcionalmente compreendendo adicionalmente, na extremidade 3', 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U) adicionais.

[0687] 15. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-14, em que o crRNA compreende, de 5' a 3', [domínio-alvo]-:

- a) SEQ ID NO: 182;
- b) SEQ ID NO: 183;
- c) SEQ ID NO: 199;
- d) SEQ ID NO: 200;
- e) SEQ ID NO: 201;
- f) SEQ ID NO: 202; ou
- g) SEQ ID NO: 226.

[0688] 16. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-9 ou 15, em que o tracr compreende, de 5' a 3':

- a) SEQ ID NO: 187;
- b) SEQ ID NO: 188;
- c) SEQ ID NO: 203;
- d) SEQ ID NO: 204;
- e) SEQ ID NO: 224;
- f) SEQ ID NO: 225;
- g) SEQ ID NO: 232;
- h) SEQ ID NO: 227;
- i) (SEQ ID NO: 228;
- j) SEQ ID NO: 229;
- k) qualquer um de a) a j), acima, compreendendo adicionalmente, na extremidade 3', pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U), p.ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U);
- l) qualquer um de a) a k), acima, compreendendo adicionalmente, na extremidade 3', pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A), p.ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A); ou
- m) qualquer um de a) a l), acima, compreendendo adicionalmente, na extremidade 5' (p.ex., no terminal 5'), pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A), p.ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de adenina (A).

[0689] 17. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades

1-9, em que o domínio-alvo e o tracr estão dispostos em moléculas de ácido nucleico separadas e em que a molécula de ácido nucleico compreendendo o domínio-alvo compreende SEQ ID NO: 201, opcionalmente disposto imediatamente 3' em relação ao domínio-alvo, e a molécula de ácido nucleico compreendendo o tracr compreende, p.ex., consiste em, SEQ ID NO: 224.

[0690] 18. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 13-14, em que a porção de crRNA do mastro compreende SEQ ID NO: 201, ou uma SEQ ID NO: 202.

[0691] 19. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-12, em que o tracr compreende SEQ ID NO: 187 ou 188 e, opcionalmente, se uma primeira extensão do mastro estiver presente, uma primeira extensão de tracr, disposta em 5' em relação a SEQ ID NO: 187 ou 188, compreendendo a referida primeira extensão de tracr SEQ ID NO: 189.

[0692] 20. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-19, em que o domínio-alvo e o tracr estão dispostos em moléculas de ácido nucleico separadas.

[0693] 21. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-19, em que o domínio-alvo e o tracr estão dispostos em uma única molécula de ácido nucleico e em que o tracr está disposto 3' em relação ao domínio-alvo.

[0694] 22. A molécula de gRNA da modalidade 21, compreendendo adicionalmente uma alça, disposta 3' em relação ao domínio-alvo e 5' em relação ao tracr.

[0695] 23. A molécula de gRNA da modalidade 22, em que a alça compreende SEQ ID NO: 186.

[0696] 24. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-9, compreendendo, de 5' a 3', [domínio-alvo]-:

(a) SEQ ID NO: 195;

(b) SEQ ID NO: 196;

(c) SEQ ID NO: 197;

(d) SEQ ID NO: 198;

(e) SEQ ID NO: 231; ou

(f) qualquer um de (a) a (e), acima, compreendendo adicionalmente, na extremidade 3', 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U).

[0697] 25. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-9 ou 21-24, em que o domínio-alvo e o tracr estão dispostos em uma única molécula de ácido nucleico e em que a referida molécula de ácido nucleico compreende o, p.ex., consiste no, referido domínio-alvo e SEQ ID NO: 231, opcionalmente disposto imediatamente 3' em relação ao referido domínio-alvo.

[0698] 26. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-25, em que uma, ou opcionalmente mais do que uma, das moléculas de ácido nucleico compreendendo a molécula de gRNA compreende:

a) uma ou mais, p.ex., três, modificações de fosforotioato na extremidade 3' da referida molécula ou moléculas de ácido nucleico;

b) uma ou mais, p.ex., três, modificações de fosforotioato na extremidade 5' da referida molécula ou moléculas de ácido nucleico;

c) uma ou mais, p.ex., três, modificações de 2'-O-metila na extremidade 3' da referida molécula ou moléculas de ácido nucleico;

d) uma ou mais, p.ex., três, modificações de 2'-O-metila na extremidade 5' da referida molécula ou moléculas de ácido nucleico;

e) uma modificação de 2' O-metila em cada um dos 4º, 3º e 2º resíduos em relação ao terminal 3' da referida molécula ou moléculas de ácido nucleico;

f) uma modificação de 2' O-metila em cada um dos 4º, 3º e 2º resíduos em relação ao terminal 5' da referida molécula ou moléculas de ácido nucleico; ou

f) qualquer combinação das mesmas.

[0699] 27. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

- (a) SEQ ID NO: 74;
- (b) SEQ ID NO: 75; ou
- (c) SEQ ID NO: 76.

[0700] 28. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

- (a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 77 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 77 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 78 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 78 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0701] 29. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

- (a) SEQ ID NO: 79;
- (b) SEQ ID NO: 80; ou
- (c) SEQ ID NO: 81.

[0702] 30. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

- (a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 82 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID

NO: 82 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 83 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 83 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0703] 31. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 84;

(b) SEQ ID NO: 85; ou

(c) SEQ ID NO: 86.

[0704] 32. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 87 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 87 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 88 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 88 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0705] 33. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 89;

(b) SEQ ID NO: 90; ou

(c) SEQ ID NO: 91.

[0706] 34. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 92 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 92 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 93 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 93 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0707] 35. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 94;

(b) SEQ ID NO: 95; ou

(c) SEQ ID NO: 96.

[0708] 36. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 97 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 97 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID

NO: 98 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 98 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0709] 37. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 99;

(b) SEQ ID NO: 100; ou

(c) SEQ ID NO: 101.

[0710] 38. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 102 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 102 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 103 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 103 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0711] 39. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 104;

(b) SEQ ID NO: 105; ou

(c) SEQ ID NO: 106.

[0712] 40. Uma molécula de gRNA da modalidade 1,

compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 107 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 107 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 108 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 108 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0713] 41. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 109;

(b) SEQ ID NO: 110; ou

(c) SEQ ID NO: 111.

[0714] 42. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 112 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 112 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 113 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID

NO: 113 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0715] 43. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

- (a) SEQ ID NO: 114;
- (b) SEQ ID NO: 115; ou
- (c) SEQ ID NO: 116.

[0716] 44. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

- (a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 117 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 117 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 118 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 118 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0717] 45. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

- (a) SEQ ID NO: 119;
- (b) SEQ ID NO: 120; ou
- (c) SEQ ID NO: 121.

[0718] 46. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

- (a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 122 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ

ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 122 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 123 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 123 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0719] 47. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 124;

(b) SEQ ID NO: 125; ou

(c) SEQ ID NO: 126.

[0720] 48. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 127 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 127 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 128 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 128 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0721] 49. Uma molécula de gRNA da modalidade 1,

compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

- (a) SEQ ID NO: 129;
- (b) SEQ ID NO: 130; ou
- (c) SEQ ID NO: 131.

[0722] 50. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

- (a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 132 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 132 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 133 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 133 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0723] 51. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

- (a) SEQ ID NO: 134;
- (b) SEQ ID NO: 135; ou
- (c) SEQ ID NO: 136.

[0724] 52. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

- (a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 137 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 137 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ

ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 138 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 138 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0725] 53. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 139;

(b) SEQ ID NO: 140; ou

(c) SEQ ID NO: 141.

[0726] 54. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 142 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 142 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 143 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 143 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0727] 55. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 144;

(b) SEQ ID NO: 145; ou

(c) SEQ ID NO:146.

[0728] 56. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 147 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 147 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 148 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 148 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0729] 57. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 149;

(b) SEQ ID NO: 150; ou

(c) SEQ ID NO: 151.

[0730] 58. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 152 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 152 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 153 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ

ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 153 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0731] 59. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 154;

(b) SEQ ID NO: 155; ou

(c) SEQ ID NO: 156.

[0732] 60. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 157 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 157 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 158 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 158 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0733] 61. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 159;

(b) SEQ ID NO: 160; ou

(c) SEQ ID NO: 161.

[0734] 62. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 162 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 162 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 163 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 163 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0735] 63. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

(a) SEQ ID NO: 164;

(b) SEQ ID NO: 165; ou

(c) SEQ ID NO: 166.

[0736] 64. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 167 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 167 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 168 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 168 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ

ID NO: 73.

[0737] 65. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

- (a) SEQ ID NO: 169;
- (b) SEQ ID NO: 170; ou
- (c) SEQ ID NO: 171.

[0738] 66. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

- (a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 172 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;
- (b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 172 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;
- (c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 173 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou
- (d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 173 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0739] 67. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo na, sequência:

- (a) SEQ ID NO: 174;
- (b) SEQ ID NO: 175; ou
- (c) SEQ ID NO: 176.

[0740] 68. Uma molécula de gRNA da modalidade 1, compreendendo, por exemplo, consistindo em:

- (a) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 177 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 177 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 178 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 178 e um tracr compreendendo, por exemplo, consistindo em, SEQ ID NO: 73.

[0741] 69. Uma molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-68, em que

a) quando um sistema CRISPR (por exemplo, um RNP como descrito aqui) compreendendo uma molécula de gRNA é introduzido em uma célula, uma indel é formada na ou próximo da sequência-alvo complementar ao domínio-alvo da molécula de gRNA; e/ou

b) quando um sistema CRISPR (por exemplo, um RNP como aqui descrito) compreendendo a molécula de gRNA é introduzido em uma célula, é criada uma deleção compreendendo a sequência, por exemplo, compreendendo substancialmente toda a sequência, entre uma sequência complementar ao domínio-alvo de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora HBG1 e uma sequência complementar ao domínio-alvo de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora HBG2.

[0742] 70. A molécula de gRNA da modalidade 69, em que o indel não compreende um nucleotídeo disposto entre 5.250.092 e 5.249.833, - cadeia (hg38), opcionalmente em que o indel não compreende um nucleotídeo de um sítio de ligação do fator de transcrição ou HPFH não

deleção.

[0743] 71. Uma molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-70, em que, quando um sistema CRISPR (p.ex., um RNP como descrito aqui) compreendendo a molécula de gRNA é introduzido em uma população de células, um indel é formado na ou próximo da sequência-alvo complementar ao domínio-alvo da molécula de gRNA em pelo menos cerca de 15%, por exemplo, pelo menos cerca de 17%, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, por exemplo, pelo menos cerca de 30%, por exemplo, pelo menos cerca de 40%, por exemplo, pelo menos cerca de 50%, por exemplo, pelo menos cerca de 55%, por exemplo, pelo menos cerca de 60%, por exemplo, pelo menos cerca de 70%, por exemplo, pelo menos cerca de 75%, por exemplo, pelo menos cerca de 80%, por exemplo, pelo menos cerca de 85%, por exemplo, pelo menos cerca de 90%, por exemplo, pelo menos cerca de 95%, das células da população.

[0744] 72. Uma molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 69-71, em que o indel compreende, pelo menos, um nucleotídeo de uma região promotora de HBG1 ou pelo menos um nucleotídeo de uma região promotora de HBG2.

[0745] 73. Uma molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 71-72, em que pelo menos cerca de 15% das células da população compreende um indel que compreende, pelo menos, um nucleotídeo de uma região promotora HBG1 e um indel que compreende, pelo menos, um nucleotídeo de uma região promotora HBG2.

[0746] 74. Uma molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 71-73, em que a percentagem das células da população, que compreendem um indel que compreende, pelo menos, um nucleotídeo de uma região promotora HBG1 difere da percentagem das células da população que compreendem um indel que compreende pelo

menos um nucleotídeo de uma região promotora de HBG2 em, pelo menos, cerca de 5%, por exemplo, pelo menos cerca de 10%, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, por exemplo, pelo menos cerca de 30%.

[0747] 75. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 69-74, em que o indel é como medido por sequenciamento de próxima geração (NGS).

[0748] 76. Uma molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-75, em que, quando um sistema CRISPR (p.ex., um RNP como descrito aqui) compreendendo a molécula de gRNA é introduzido em uma célula, a expressão de hemoglobina fetal é aumentada na referida célula ou sua descendência, p.ex., sua descendência eritroide, p.ex., sua descendência de glóbulos vermelhos.

[0749] 77. Uma molécula de gRNA da modalidade 76, em que quando um sistema CRISPR (por exemplo, uma RNP, tal como aqui descrito), compreendendo a molécula de gRNA, é introduzido em uma população de células, a percentagem de células F na referida população, ou população da sua descendência, por exemplo, a sua descendência eritroide, por exemplo, a sua descendência de glóbulos vermelhos é aumentada em, pelo menos, cerca de 15%, por exemplo, pelo menos cerca de 17%, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, por exemplo, pelo menos cerca de 25%, por exemplo, pelo menos cerca de 30%, por exemplo, pelo menos cerca de 35%, por exemplo, pelo menos cerca de 40%, relativamente à percentagem de células F em uma população de células à qual a molécula de gRNA não foi introduzida ou uma população da sua descendência, por exemplo, a sua descendência eritroide, por exemplo, a sua descendência de glóbulos vermelhos.

[0750] 78. Uma molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 76, em que referida célula ou sua descendência, p.ex., sua descendência eritroide, p.ex., sua descendência de glóbulos vermelhos,

produz pelo menos cerca de 6 picogramas (p.ex., pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal por célula.

[0751] 79. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-78, em que, quando um sistema CRISPR (p.ex., um RNP como descrito aqui) compreendendo a molécula de gRNA é introduzido em uma célula, nenhuma indels fora do alvo são formadas na referida célula, por exemplo, não se formam indels fora do alvo fora das regiões promotoras de HBG1 e/ou HBG2, por exemplo, como detectável por sequenciamento de próxima geração e/ou um ensaio de inserção de nucleotídeos.

[0752] 80. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 1-78, em que, quando um sistema CRISPR (p.ex., um RNP como descrito aqui) compreendendo a molécula de gRNA é introduzido em uma população de células, nenhum indel fora do alvo, por exemplo, nenhum indel fora do alvo fora das regiões promotoras de HBG1 e/ou HBG2, é detectado em mais do que cerca de 5%, p.ex., mais do que cerca de 1%, p.ex., mais do que cerca de 0,1%, p.ex., mais do que cerca de 0,01%, das células da população de células, p.ex., como detectável por sequenciamento de próxima geração e/ou um ensaio de inserção de nucleotídeos.

[0753] 81. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 69-80, em que a célula é (ou população de células compreende) uma célula de mamífero, primata ou humana, p.ex., é uma célula humana.

[0754] 82. A molécula de gRNA da modalidade 81, em que a célula é (ou população de células compreende) uma HSPC.

[0755] 83. A molécula de gRNA da modalidade 82, em que a HSPC é CD34+.

[0756] 84. A molécula de gRNA da modalidade 83, em que a HSPC é CD34+CD90+.

[0757] 85. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 69-84, em que a célula é autóloga no que diz respeito a um paciente a ser administrado a referida célula.

[0758] 86. A molécula de gRNA de qualquer uma das modalidades 69-84, em que a célula é alogênica no que diz respeito a um paciente a ser administrado a referida célula.

[0759] 87. Composição compreendendo:

1) uma ou mais moléculas de gRNA (incluindo uma primeira molécula de gRNA), de qualquer uma das modalidades 1-86, e uma molécula Cas9;

2) uma ou mais moléculas de gRNA (incluindo uma primeira molécula de gRNA), de qualquer uma das modalidades 1-86, e ácido nucleico codificando uma molécula Cas9;

3) ácido nucleico codificando uma ou mais moléculas de gRNA (incluindo uma primeira molécula de gRNA), de qualquer uma das modalidades 1-86, e uma molécula Cas9;

4) ácido nucleico codificando uma ou mais moléculas de gRNA (incluindo uma primeira molécula de gRNA), de qualquer uma das modalidades 1-86, e ácido nucleico codificando uma molécula Cas9; ou

5) qualquer um de 1) a 4), acima, e um ácido nucleico molde; ou

6) qualquer um de 1) a 4) acima, e ácido nucleico compreendendo sequência codificando um ácido nucleico modelo.

[0760] 88. Uma composição compreendendo uma primeira molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-86, opcionalmente compreendendo adicionalmente uma molécula Cas9.

[0761] 89. A composição da modalidade 87 ou 88, em que a molécula Cas9 é uma Cas9 de *S. pyogenes* ativa ou inativa.

[0762] 90. A composição da modalidade 87-89, em que a molécula

Cas9 compreende SEQ ID NO: 205.

[0763] 91. A composição da modalidade 87-89, em que a molécula Cas9 compreende, p.ex., consiste em:

- (a) SEQ ID NO: 233;
- (b) SEQ ID NO: 234;
- (c) SEQ ID NO: 235;
- (d) SEQ ID NO: 236;
- (e) SEQ ID NO: 237;
- (f) SEQ ID NO: 238;
- (g) SEQ ID NO: 239;
- (h) SEQ ID NO: 240;
- (i) SEQ ID NO: 241;
- (j) SEQ ID NO: 242;
- (k) SEQ ID NO: 243; ou
- (l) SEQ ID NO: 244.

[0764] 92. A composição de qualquer uma das modalidades 88-91, em que a primeira molécula de gRNA e a molécula Cas9 estão presentes em um complexo de proteína ribonuclear (RNP).

[0765] 93. A composição de qualquer uma das modalidades 87-92, compreendendo adicionalmente uma segunda molécula de gRNA; uma segunda molécula de gRNA e uma terceira molécula de gRNA; ou uma segunda molécula de gRNA, opcionalmente, uma terceira molécula de gRNA e, opcionalmente, uma quarta molécula de gRNA, em que a segunda molécula de gRNA, a terceira molécula de gRNA opcional e a quarta molécula de gRNA opcional são uma molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-68, e em que cada molécula de gRNA da composição é complementar com uma sequência-alvo diferente.

[0766] 94. A composição da modalidade 93, em que duas ou mais da primeira molécula de gRNA, da segunda molécula de gRNA, da terceira molécula de gRNA opcional e da quarta molécula de gRNA

opcional são complementares com sequências-alvo dentro do mesmo gene ou região.

[0767] 95. A composição da modalidade 93 ou 94, em que a primeira molécula de gRNA, a segunda molécula de gRNA, a terceira molécula de gRNA opcional e a quarta molécula de gRNA opcional são complementares com sequências-alvo separadas por não mais do que 6000, não mais do que 5000 nucleotídeos, não mais do que 500, não mais do que 400 nucleotídeos, não mais do que 300 nucleotídeos, não mais do que 200 nucleotídeos, não mais do que 100 nucleotídeos, não mais do que 90 nucleotídeos, não mais do que 80 nucleotídeos, não mais do que 70 nucleotídeos, não mais do que 60 nucleotídeos, não mais do que 50 nucleotídeos, não mais do que 40 nucleotídeos, não mais do que 30 nucleotídeos, não mais do que 20 nucleotídeos ou não mais do que 10 nucleotídeos.

[0768] 96. A composição da modalidade 93, em que duas ou mais da primeira molécula de gRNA, a segunda molécula de gRNA, a terceira molécula gRNA opcional e a quarta molécula de gRNA opcional compreendem, pelo menos, uma molécula de gRNA que compreende um domínio-alvo complementar a uma sequência-alvo de uma região promotora HBG1 e pelo menos uma molécula de gRNA que compreende um domínio-alvo complementar a uma sequência-alvo de uma região promotora HBG2.

[0769] 97. A composição de qualquer uma das modalidades 94-95, compreendendo uma primeira molécula de gRNA e uma segunda molécula de gRNA, em que a primeira molécula de gRNA e a segunda molécula de gRNA são:

- (a) independentemente selecionadas das moléculas de gRNA, conforme definido na modalidade 1, e são complementares com diferentes sequências-alvo;
- (b) independentemente selecionadas das moléculas de gRNA,

conforme definido na modalidade 2, e são complementares com diferentes sequências-alvo;

(c) independentemente selecionadas das moléculas de gRNA, conforme definido na modalidade 3, e são complementares com diferentes sequências-alvo; ou

(d) independentemente selecionadas das moléculas de gRNA, conforme definido na modalidade 4, e são complementares com diferentes sequências-alvo; ou

(e) independentemente selecionadas das moléculas de gRNA, de qualquer uma das modalidades 27-68 e são complementares com diferentes sequências-alvo.

[0770] 98. A composição de qualquer uma das modalidades 94-96, compreendendo uma primeira molécula de gRNA e uma segunda molécula de gRNA, em que:

a) a primeira molécula de gRNA é complementar a uma sequência-alvo compreendendo pelo menos 1 nucleotídeo (por exemplo, compreendendo 20 nucleotídeos consecutivos) em:

i) Chr11:5,249,833 a Chr11:5,250,237 (hg38);

ii) Chr11:5,250,094-5,250,237 (hg38);

iii) Chr11: 5,249,833-5,249,927 (hg38); ou

iv) Chr11:5,250,139-5,250,237 (hg38);

b) a segunda molécula de gRNA é complementar a uma sequência-alvo compreendendo pelo menos 1 nucleotídeo (por exemplo, compreendendo 20 nucleotídeos consecutivos) em:

i) Chr11:5,254,738 a Chr11:5,255,164 (hg38);

ii) Chr11:5,255,022-5,255,164 (hg38); ou

iii) Chr11: 5,254,738-5,254,851 (hg38).

[0771] 99. A composição de qualquer uma das modalidades 87-108, em que, no que diz respeito aos componentes da molécula de gRNA da composição, a composição consiste em uma primeira molécula de

gRNA e uma segunda molécula de gRNA.

[0772] 100. A composição de qualquer uma das modalidades 87-109, em que cada uma das referidas moléculas de gRNA está em um complexo de proteína ribonuclear (RNP) com uma molécula Cas9 descrita aqui, p.ex., uma molécula Cas9, de qualquer uma das modalidades 90 ou 91.

[0773] 101. A composição de qualquer uma das modalidades 87-100, compreendendo um ácido nucleico molde, em que o ácido nucleico molde compreende um nucleotídeo que corresponde a um nucleotídeo na ou próximo da sequência-alvo da primeira molécula de gRNA.

[0774] 102. A composição de qualquer uma das modalidades 101, em que o ácido nucleico molde compreende ácido nucleico codificando: (a) beta globina humana, p.ex., beta globina humana compreendendo uma ou mais das mutações G16D, E22A e T87Q ou seu fragmento; ou (b) gama globina humana ou seu fragmento.

[0775] 103. A composição de qualquer uma das modalidades 87-102, formulada em um meio adequado para eletroporação.

[0776] 104. A composição de qualquer uma das modalidades 87-103, em que cada uma das referidas moléculas de gRNA está em um RNP com uma molécula Cas9 descrita aqui e em que cada um dos referidos RNP está a uma concentração de menos do que cerca de 10 uM, por exemplo, menos do que cerca de 3 uM, por exemplo, menos do que cerca de 1 uM, por exemplo, menos do que cerca de 0,5 uM, por exemplo, menos do que cerca de 0,3 uM, por exemplo, menos do que cerca de 0,1 uM, opcionalmente em que a concentração do referido RNP é de cerca de 2 uM ou é cerca de 1 uM, opcionalmente em que a composição compreende ainda uma população de células, por exemplo, HSPCs.

[0777] 105. Uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma ou mais moléculas de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-68.

[0778] 106. A sequência de ácidos nucleicos da modalidade 105, em que o ácido nucleico compreende um promotor operacionalmente ligado à sequência que codifica a uma ou mais moléculas de gRNA.

[0779] 107. A sequência de ácidos nucleicos da modalidade 106, em que o promotor é um promotor reconhecido por uma RNA polimerase II ou RNA polimerase III.

[0780] 108. A sequência de ácidos nucleicos da modalidade 107, em que o promotor é um promotor U6 ou um promotor HI.

[0781] 109. A sequência de ácidos nucleicos de qualquer uma das modalidades 105-108, em que o ácido nucleico codifica adicionalmente uma molécula Cas9.

[0782] 110. A sequência de ácidos nucleicos da modalidade 109, em que a molécula Cas9 compreende qualquer de SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 ou SEQ ID NO: 244.

[0783] 111. A sequência de ácidos nucleicos de qualquer uma das modalidades 109-110, em que o referido ácido nucleico compreende um promotor operacionalmente ligado à sequência que codifica uma molécula Cas9.

[0784] 112. A sequência de ácidos nucleicos da modalidade 111, em que o promotor é um promotor EF-1, um promotor do gene IE do CMV, um promotor EF-1 α , um promotor da ubiquitina C ou um promotor da fosfoglicerato cinase (PGK).

[0785] 113. Um vetor compreendendo o ácido nucleico, de qualquer uma das modalidades 105-112.

[0786] 114. O vetor da modalidade 113, em que no vetor é selecionado do grupo consistindo em um vetor lentiviral, um vetor adenoviral, um vetor viral adenoassociado (AAV), um vetor do vírus do

herpes simples (HSV), um plasmídeo, um minicírculo, um nanoplasmídeo e um vetor de RNA.

[0787] 115. Método de alteração de uma célula (por exemplo, uma população de células), (por exemplo, alteração da estrutura (por exemplo, sequência) de ácido nucleico) em ou próximo de uma sequência-alvo dentro da referida célula, compreendendo contato da (por exemplo, introdução na) referida célula (por exemplo, população de células) com:

- 1) uma ou mais moléculas de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-68, e uma molécula Cas9;
- 2) uma ou mais moléculas de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-68, e ácido nucleico codificando uma molécula Cas9;
- 3) ácido nucleico codificando uma ou mais moléculas de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-68, e uma molécula Cas9;
- 4) ácido nucleico codificando uma ou mais moléculas de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-68, e ácido nucleico codificando uma molécula Cas9;
- 5) qualquer um de 1) a 4), acima, e um ácido nucleico molde;
- 6) qualquer um de 1) a 4) acima, e ácido nucleico compreendendo sequência codificando um ácido nucleico modelo;
- 7) a composição, de qualquer uma das modalidades 87-104; ou
- 8) o vetor, de qualquer uma das modalidades 113-114.

[0788] 116. O método da modalidade 115, em que a molécula de gRNA ou ácido nucleico codificado a molécula de gRNA, e a molécula Cas9 ou ácido nucleico codificando a molécula Cas9, são formuladas em uma única composição.

[0789] 117. O método da modalidade 115, em que a molécula de gRNA ou ácido nucleico codificando a molécula de gRNA, e a molécula Cas9 ou ácido nucleico codificando a molécula Cas9, são formuladas em mais do que uma composição.

[0790] 118. O método da modalidade 117, em que as mais do que uma composição são administradas simultaneamente ou sequencialmente.

[0791] 119. O método de qualquer uma das modalidades 115-118, em que a célula é uma célula animal.

[0792] 120. O método de qualquer uma das modalidades 115-118, em que a célula é uma célula de mamífero, primata ou humana.

[0793] 121. O método da modalidade 120, em que a célula é uma célula tronco hematopoiética ou célula tronco progenitora (HSPC) (p.ex., uma população de HSPCs).

[0794] 122. O método de qualquer uma das modalidades 115-121, em que a célula é uma célula CD34+.

[0795] 123. O método de qualquer uma das modalidades 115-122, em que a célula é uma célula CD34+CD90+.

[0796] 124. O método de qualquer uma das modalidades 115-123, em que a célula está disposta em uma composição compreendendo uma população de células que foi enriquecida quanto a células CD34+.

[0797] 125. O método de qualquer uma das modalidades 115-124, em que a célula (p.ex., população de células) foi isolada da medula óssea, sangue periférico mobilizado ou sangue do cordão umbilical.

[0798] 126. O método de qualquer uma das modalidades 115-125, em que a célula é autóloga ou alogênica em relação a um paciente a ser administrado com a referida célula, opcionalmente, em que o paciente é um paciente de hemoglobinopatia, opcionalmente, em que o paciente tem a doença das células falciformes ou uma talassemia, opcionalmente, talassemia beta.

[0799] 127. O método de qualquer uma das modalidades 115-126, em que:

(a) a alteração resulta em uma indel em ou próximo de uma sequência de DNA genômico complementar com o domínio-alvo da uma ou mais

moléculas de gRNA; e/ou

b) a alteração resulta em uma deleção compreendendo sequência, por exemplo, substancialmente toda a sequência, entre uma sequência complementar ao domínio-alvo de uma ou mais moléculas de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, completamente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG1 e uma sequência complementar ao domínio-alvo de uma ou mais moléculas de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG2, opcionalmente, em que a deleção não compreende um nucleotídeo disposto entre 5.250.092 e 5.249.833, - cadeia (hg38).

[0800] 128. O método da modalidade 127, em que o indel é uma inserção ou deleção de menos do que cerca de 40 nucleotídeos, p.ex., menos do que 30 nucleotídeos, p.ex., menos do que 20 nucleotídeos, p.ex., menos do que 10 nucleotídeos.

[0801] 129. O método da modalidade 128, em que o indel é uma deleção de nucleotídeo único.

[0802] 130. O método de qualquer uma das modalidades 127-129, em que o método resulta em uma população de células em que pelo menos cerca de 15%, por exemplo, pelo menos cerca de 17%, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, por exemplo, pelo menos cerca de 30%, por exemplo, pelo menos cerca de 40%, por exemplo, pelo menos cerca de 50%, por exemplo, pelo menos cerca de 55%, por exemplo, pelo menos cerca de 60%, por exemplo, pelo menos cerca de 70%, por exemplo, pelo menos cerca de 75%, por exemplo pelo menos cerca de 80%, por exemplo, pelo menos cerca de 85%, por exemplo, pelo menos cerca de 90%, por exemplo, pelo menos cerca de 95% da população foi alterada, por exemplo, compreendendo um indel, opcionalmente em que o indel é selecionado de um indel listado na Tabela 2-7,

opcionalmente, em que as células da população não compreendem uma deleção de um nucleotídeo disposto entre 5,250,092 e 5,249,833, - cadeia (hg38).

[0803] 131. O método de qualquer uma das modalidades 115-130, em que a alteração resulta em uma célula (p.ex., população de células) que é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada de uma linhagem eritroide (p.ex., um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada exibe um nível aumentado de hemoglobina fetal, p.ex., em relação a uma célula (p.ex., população de células) inalterada.

[0804] 132. O método de qualquer uma das modalidades 115-131, em que a alteração resulta em uma população de células que é capaz de se diferenciar em uma população de células diferenciadas, p.ex., uma população de células de uma linhagem eritroide (p.ex., uma população de glóbulos vermelhos) e em que a referida população de células diferenciadas tem uma percentagem aumentada de células F (p.ex., pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30% ou pelo menos cerca de 40% de percentagem mais elevada de células F), p.ex., em relação a uma população de células inalteradas.

[0805] 133. O método de qualquer uma das modalidades 115-131, em que a alteração resulta em uma célula que é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada, p.ex., uma célula de uma linhagem eritroide (p.ex., um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada produz pelo menos cerca de 6 picogramas (p.ex., pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal por célula.

[0806] 134. Um célula, alterada pelo método de qualquer uma das modalidades 115-133, ou uma célula obtenível pelo método, de

qualquer uma das modalidades 115-133.

[0807] 135. Célula, compreendendo um indel descrito na Tabela 7-2, opcionalmente, em que a célula não compreende uma deleção de um nucleotídeo disposto entre 5,250,092 e 5,249,833, - cadeia (hg38).

[0808] 136. Uma célula, compreendendo uma primeira célula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-68, ou uma composição, de qualquer uma das modalidades 87-104, um ácido nucleico, de qualquer uma das modalidades 105-112, ou um vetor, de qualquer uma das modalidades 113-114.

[0809] 137. A célula da modalidade 136, compreendendo uma molécula Cas9.

[0810] 138. A célula da modalidade 137, em que a molécula Cas9 compreende qualquer de SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 ou SEQ ID NO: 244.

[0811] 139. A célula de qualquer uma das modalidades 134-138, em que a célula compreende, compreendeu ou compreenderá uma segunda molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-68, ou um ácido nucleico codificando uma segunda molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-68, em que a primeira molécula de gRNA e a segunda molécula de gRNA compreendem domínios-alvo não idênticos.

[0812] 140. A célula de qualquer uma das modalidades 134-139, em que a expressão de hemoglobina fetal é aumentada na referida célula ou sua descendência (p.ex., sua descendência eritroide, p.ex., sua descendência de glóbulos vermelhos) em relação a uma célula ou sua descendência do mesmo tipo de célula que não foi modificada para compreender uma molécula de gRNA.

[0813] 141. A célula de qualquer uma das modalidades 134-139, em

que a célula é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada, p.ex., uma célula de uma linhagem eritroide (p.ex., um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada exibe um nível aumentado de hemoglobina fetal, p.ex., em relação a uma célula do mesmo tipo que não foi modificada para compreender uma molécula de gRNA.

[0814] 142. A célula de qualquer uma das modalidades 140-141, em que a célula diferenciada (p.ex., célula de uma linhagem eritroide, p.ex., glóbulo vermelho) produz pelo menos cerca de 6 picogramas (p.ex., pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal, p.ex., em relação a uma célula diferenciada do mesmo tipo que não foi modificada para compreender uma molécula de gRNA.

[0815] 143. A célula de qualquer uma das modalidades 134-142, que foi colocada em contato com um expansor de células-tronco.

[0816] 144. A célula da modalidade 143, em que o expansor de células-tronco é:

- a) (1r,4r)-N¹-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina;
- b) 4-(3-piperidin-1-ilpropilamina)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo;
- c) 4-(2-(2-(benzo[b]tiofen-3-il)-9-isopropil-9H-purin-6-ilamino)etil)fenol;
- d) (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol; ou
- e) suas combinações (por exemplo, uma combinação de (1r,4r)-N¹-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina e (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol).

[0817] 145. A célula da modalidade 144, em que o expansor de

células-tronco é (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol.

[0818] 146. Uma célula, por exemplo, a célula de qualquer uma das modalidades 134-145, compreendendo:

a) um indel em ou próximo de uma sequência de DNA genômico complementar com o domínio-alvo de uma molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-68; e/ou

b) uma deleção compreendendo sequência, por exemplo, substancialmente toda a sequência, entre uma sequência complementar ao domínio-alvo de uma molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-68, (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, completamente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG1 e uma sequência complementar ao domínio-alvo de uma molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-68, (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG2, opcionalmente em que a deleção não compreende um nucleotídeo disposto entre 5,250,092 e 5,249,833, - cadeia (hg38).

[0819] 147. A célula da modalidade 146, em que o indel é uma inserção ou deleção de menos do que cerca de 40 nucleotídeos, p.ex., menos do que 30 nucleotídeos, p.ex., menos do que 20 nucleotídeos, p.ex., menos do que 10 nucleotídeos.

[0820] 148. A célula de qualquer uma das modalidades 146-147, em que o indel é uma deleção de nucleotídeo único.

[0821] 149. A célula de qualquer uma das modalidades 134-148, em que a célula é uma célula animal.

[0822] 150. A célula da modalidade 149, em que a célula é uma célula de mamífero, primata ou humana.

[0823] 151. A célula de qualquer uma das modalidades 134-150, em

que a célula é uma célula tronco hematopoiética ou progenitora (HSPC) (p.ex., uma população de HSPCs).

[0824] 152. A célula de qualquer uma das modalidades 134-151, em que a célula é uma célula CD34+.

[0825] 153. A célula da modalidade 152, em que a célula é uma célula CD34+CD90+.

[0826] 154. A célula de qualquer uma das modalidades 134-153, em que a célula (p.ex., população de células) foi isolada da medula óssea, sangue periférico mobilizado ou sangue do cordão umbilical.

[0827] 155. A célula de qualquer uma das modalidades 134-154, em que a célula é autóloga em relação a um paciente a ser administrado com a referida célula, opcionalmente em que o paciente é um paciente de hemoglobinopatia, opcionalmente, em que os pacientes têm a doença das células falciformes ou uma talassemia, opcionalmente, talassemia beta.

[0828] 156. A célula de qualquer uma das modalidades 134-154, em que a célula é alogeneica no que diz respeito a um paciente a ser administrado a referida célula.

[0829] 157. Uma população de células compreendendo a célula, de qualquer uma das modalidades 134-156.

[0830] 158. A população de células da modalidade 157, em que pelo menos cerca de 50%, p.ex., pelo menos cerca de 60%, p.ex., pelo menos cerca de 70%, p.ex., pelo menos cerca de 80%, p.ex., pelo menos cerca de 90% (p.ex., pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99%) das células da população são uma célula, de qualquer uma das modalidades 134-156.

[0831] 159. A população de células de qualquer uma das modalidades 157-158, em que a população de células é capaz de se diferenciar em uma população de células diferenciadas, p.ex., uma

população de células de uma linhagem eritroide (p.ex., uma população de glóbulos vermelhos) e em que a referida população de células diferenciadas tem uma percentagem aumentada de células F (p.ex., pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 17%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30% ou pelo menos cerca de 40% de percentagem mais elevada de células F), p.ex., em relação a uma população de células não modificadas do mesmo tipo.

[0832] 160. A população de células da modalidade 159, em que as células F da população de células diferenciadas produzem uma média de pelo menos cerca de 6 picogramas (p.ex., pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal por célula.

[0833] 161. A população de células de qualquer uma das modalidades 157-160, compreendendo:

- 1) pelo menos 1×10^6 células CD34+/kg de peso corporal do paciente ao qual as células são para ser administradas;
- 2) pelo menos 2×10^6 células CD34+/kg de peso corporal do paciente ao qual as células são para ser administradas;
- 3) pelo menos 3×10^6 células CD34+/kg de peso corporal do paciente ao qual as células são para ser administradas;
- 4) pelo menos 4×10^6 células CD34+/kg de peso corporal do paciente ao qual as células são para ser administradas;
- 5) de 2×10^6 a 10×10^6 células CD34+/kg de peso corporal do paciente ao qual as células são para ser administradas.

[0834] 162. A população de células de qualquer uma das modalidades 157-161, em que pelo menos cerca de 40%, p.ex., pelo menos cerca de 50% (p.ex., pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 90%)

das células da população são células CD34+.

[0835] 163. A população de células da modalidade 162, em que pelo menos cerca de 10%, p.ex., pelo menos cerca de 15%, p.ex., pelo menos cerca de 20%, p.ex., pelo menos cerca de 30% das células da população são células CD34+CD90+.

[0836] 164. A população de células de qualquer uma das modalidades 157-163, em que a população de células é derivada de sangue do cordão umbilical, sangue periférico (por exemplo, sangue periférico mobilizado) ou medula óssea, por exemplo, é derivada da medula óssea.

[0837] 165. A população de células de qualquer uma das modalidades 157-164, em que a população de células compreende, por exemplo, consiste em, células de mamíferos, por exemplo, células humanas, opcionalmente em que a população de células é obtida a partir de um paciente que sofre de uma hemoglobinopatia, por exemplo, doença falciforme ou talassemia, por exemplo, beta-talassemia.

[0838] 166. A população de células de qualquer uma das modalidades 157-165, em que a população de células é (i) autóloga em relação a um paciente ao qual é para ser administrado, ou (ii) alogênica em relação a um paciente ao qual é para ser administrado.

[0839] 167. A população de células (por exemplo, células CD34+), por exemplo, de qualquer uma das modalidades 157-165, compreendendo um padrão indel como descrito na Tabela 7-2, opcionalmente em que os indels do padrão indel descrito na Tabela 7-2 são detectáveis em pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% das células da população.

[0840] 168. Uma composição compreendendo uma célula, de qualquer uma das modalidades 134-156, ou a população de células de qualquer uma das modalidades 157-167.

[0841] 169. A composição da modalidade 168, compreendendo um meio farmacêuticamente aceitável, p.ex., um meio farmacêuticamente aceitável adequado para criopreservação.

[0842] 170. Um método de tratamento de uma hemoglobinopatia, compreendendo administração a um paciente de uma célula, de qualquer uma das modalidades 134-156, uma população de células, de qualquer uma das modalidades 157-167, ou uma composição, de qualquer uma das modalidades 168-169.

[0843] 171. Um método de aumento da expressão de hemoglobina fetal em um mamífero, compreendendo administração a um paciente de uma célula, de qualquer uma das modalidades 134-156, uma população de células, de qualquer uma das modalidades 157-167, ou uma composição, de qualquer uma das modalidades 168-169.

[0844] 172. O método da modalidade 170, em que a hemoglobinopatia é beta-talassemia ou doença falciforme.

[0845] 173. Método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células) compreendendo:

(a) proporcionar uma célula (p.ex., uma população de células) (p.ex., uma HSPC (p.ex., uma população de HSPCs));

(b) cultivar a referida célula (p.ex., a referida população de células) *ex vivo* em um meio de cultura de células compreendendo um expansor de células-tronco; e

(c) introduzir na referida célula uma primeira molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-86, uma molécula de ácido nucleico codificando uma primeira molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-86, uma composição, de qualquer uma das modalidades 87-104 ou 168-169, um ácido nucleico, de qualquer uma das modalidades 105-112, ou um vetor, de qualquer uma das modalidades 113-114.

[0846] 174. O método da modalidade 173, em que, após a referida

introdução da etapa (c), a referida célula (por exemplo, população de células) é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada (por exemplo, população de células diferenciadas), por exemplo, uma célula de uma linhagem eritroide (por exemplo, população de células de uma linhagem eritroide), por exemplo, um glóbulo vermelho (por exemplo, uma população de glóbulos vermelhos) e em que a referida célula diferenciada (por exemplo, população de células diferenciadas) produz hemoglobina fetal aumentada, por exemplo, em relação à mesma célula que não foi sujeita à etapa (c).

[0847] 175. O método, de qualquer uma das modalidades 173-174, em que o expensor de células-tronco é:

- a) (1r,4r)-N1-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina;
- b) 4-(3-piperidin-1-ilpropilamina)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metilo;
- c) 4-(2-(2-(benzo[b]tiofen-3-il)-9-isopropil-9H-purin-6-ilamino)etil)fenol;
- d) (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol; ou
- e) suas combinações (por exemplo, uma combinação de (1r,4r)-N1-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina e (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol).

[0848] 176. O método da modalidade 175, em que o expensor de células-tronco é (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol.

[0849] 177. O método de qualquer uma das modalidades 173-176, em que o meio de cultura de células compreende trombopoietina (Tpo), ligante Flt3 (Flt-3L) e fator de células-tronco humanas (SCF).

[0850] 178. O método da modalidade 177, em que o meio de cultura de células compreende adicionalmente interleucina-6 (IL-6) humana.

[0851] 179. O método de qualquer uma das modalidades 177-178, em que o meio de cultura de células compreende trombopoietina (Tpo), ligante Flt3 (Flt-3L) e fator de células-tronco humanas (SCF) cada um a uma concentração variando de cerca de 10 ng/mL a cerca de 1000 ng/mL.

[0852] 180. O método da modalidade 179, em que o meio de cultura de células compreende trombopoietina (Tpo), ligante Flt3 (Flt-3L) e fator de células-tronco humanas (SCF) cada um a uma concentração de cerca de 50 ng/mL, p.ex., a uma concentração de 50 ng/mL.

[0853] 181. O método de qualquer uma das modalidades 178-180, em que o meio de cultura de células compreende interleucina-6 (IL-6) humana a uma concentração variando de cerca de 10 ng/mL a cerca de 1000 ng/mL.

[0854] 182. O método da modalidade 181, em que o meio de cultura de células compreende interleucina-6 (IL-6) humana a uma concentração de cerca de 50 ng/mL, p.ex., a uma concentração de 50 ng/mL.

[0855] 183. O método de qualquer uma das modalidades 173-182, em que o meio de cultura de células compreende um expansor de células-tronco a uma concentração variando de cerca de 1 nM a cerca de 1 mM.

[0856] 184. O método da modalidade 183, em que o meio de cultura de células compreende um expansor de células-tronco a uma concentração variando de cerca de 1 μ M a cerca de 100 μ M.

[0857] 185. O método da modalidade 184, em que o meio de cultura de células compreende um expansor de células-tronco a uma concentração variando de cerca de 500 nM a cerca de 750 nM.

[0858] 186. O método da modalidade 185, em que o meio de cultura de células compreende um expansor de células-tronco a uma concentração de cerca de 500 nM, p.ex., a uma concentração de 500

nM.

[0859] 187. O método da modalidade 186, em que o meio de cultura de células compreende um expensor de células-tronco a uma concentração de cerca de 750 nM, p.ex., a uma concentração de 750 nM.

[0860] 188. O método de qualquer uma das modalidades 173-187, em que a cultura do etapa (b) compreende um período de cultura antes da introdução do etapa (c).

[0861] 189. O método da modalidade 188, em que o período de cultura antes da introdução do etapa (c) é pelo menos 12 horas, por exemplo, é por um período de cerca de 1 dia a cerca de 12 dias, por exemplo, é por um período de cerca de 1 dia a cerca de 6 dias, por exemplo, por um período de cerca de 1 dia a cerca de 3 dias, por exemplo, é por um período de cerca de 1 dia a cerca de 2 dias, por exemplo, é por um período de cerca de 2 dias ou por um período de cerca de 1 dia.

[0862] 190. O método de qualquer uma das modalidades 173-189, em que a cultura da etapa (b) compreende um período de cultura após a introdução da etapa (c).

[0863] 191. O método da modalidade 190, em que o período de cultura após a introdução da etapa (c) é pelo menos 12 horas, p.ex., é durante um período de cerca de 1 dia a cerca de 12 dias, p.ex., é durante um período de cerca de 1 dia a cerca de 6 dias, p.ex., é durante um período de cerca de 2 dias a cerca de 4 dias, p.ex., é durante um período de cerca de 2 dias ou é durante um período de cerca de 3 dias ou é durante um período de cerca de 4 dias.

[0864] 192. O método de qualquer uma das modalidades 173-191, em que a população de células é expandida pelo menos 4 vezes, p.ex., pelo menos 5 vezes, p.ex., pelo menos 10 vezes, p.ex., em relação a células que não são cultivadas de acordo com a etapa (b).

[0865] 193. O método de qualquer uma das modalidades 173-192, em que a introdução da etapa (c) compreende uma eletroporação.

[0866] 194. O método da modalidade 193, em que a eletroporação compreende 1 a 5 pulsos, p.ex., 1 pulso, e em que cada pulso é uma voltagem de pulso variando de 700 volts a 2000 volts e tem uma duração de pulso variando de 10 ms a 100 ms.

[0867] 195. O método da modalidade 194, em que a eletroporação compreende 1 pulso.

[0868] 196. O método de qualquer uma das modalidades 194-195, em que a voltagem de pulso varia de 1500 a 1900 volts, p.ex., é 1700 volts.

[0869] 197. O método de qualquer uma das modalidades 194-196, em que a duração de pulso varia de 10 ms a 40 ms, p.ex., é 20 ms.

[0870] 198. O método de qualquer uma das modalidades 173-197, em que a célula (por exemplo, população de células) proporcionada na etapa (a) é uma célula humana (por exemplo, uma população de células humanas).

[0871] 199. O método da modalidade 198, em que a célula (por exemplo, população de células) proporcionada na etapa (a) é isolada da medula óssea, sangue periférico (por exemplo, sangue periférico mobilizado) ou sangue do cordão umbilical.

[0872] 200. O método da modalidade 199, em que

(i) a célula (por exemplo, população de células) fornecida na etapa (a) é isolada da medula óssea, por exemplo, é isolada da medula óssea de um paciente que sofre de hemoglobinopatia, opcionalmente em que a hemoglobinopatia é doença falciforme ou talassemia, opcionalmente, em que a talassemia é beta-talassemia; ou

(ii) a célula (por exemplo, população de células) fornecida na etapa (a) é isolada do sangue periférico, por exemplo, é isolada do sangue periférico de um paciente que sofre de hemoglobinopatia,

opcionalmente em que a hemoglobinopatia é doença falciforme ou talassemia , opcionalmente, em que a talassemia é beta-talassemia; opcionalmente em que o sangue periférico é mobilizado sangue periférico, opcionalmente em que o sangue periférico mobilizado é mobilizado utilizando Plerixafor, G-CSF ou uma combinação destes.

[0873] 201. O método de qualquer uma das modalidades 173-200, em que a população de células fornecida na etapa (a) é enriquecida quanto a células CD34+.

[0874] 202. O método de qualquer uma das modalidades 173-201, em que, subsequente à introdução da etapa (c), a célula (por exemplo, população de células) é criopreservada.

[0875] 203. O método de qualquer uma das modalidades 173-202, em que, subsequente à introdução da etapa (c), a célula (por exemplo, população de células) compreende:

(a) um indel em ou próximo de uma sequência de DNA genômico complementar com o domínio-alvo da primeira molécula de gRNA; e/ou
b) deleção compreendendo sequência, por exemplo, substancialmente toda a sequência, entre uma sequência complementar ao domínio-alvo da primeira molécula de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, completamente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG1 e uma sequência complementar ao domínio-alvo da primeira molécula de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG2, opcionalmente, em que o indel, por exemplo, a deleção, não compreende um nucleotídeo disposto entre 5.250.092 e 5.249.833, - cadeia (hg38).

[0876] 204. O método de qualquer uma das modalidades 173-203, em que, após a introdução da etapa (c), pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de

70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% das células da população de células compreendem um indel em ou perto de uma sequência de DNA genômico complementar ao domínio-alvo da primeira molécula de gRNA, opcionalmente em que nenhuma célula da população compreende uma deleção de um nucleotídeo disposto entre 5,250,092 e 5,249,833, - cadeia (hg38).

[0877] 205. Uma célula (por exemplo, população de células), obtível pelo método, de qualquer uma das modalidades 173-204.

[0878] 206. Um método de tratamento de uma hemoglobinopatia, compreendendo administração a um paciente humano de uma composição compreendendo uma célula, de qualquer uma das modalidades 134-156, uma população de células, de qualquer uma das modalidades 157-167, ou uma célula (por exemplo, uma população de células) da modalidade 205.

[0879] 207. Um método de aumentar a expressão de hemoglobina fetal em um paciente humano, compreendendo a administração ao referido paciente humano de uma composição que compreende uma célula, de qualquer uma das modalidades 134-156, uma população de células, de qualquer uma das modalidades 157-167, ou célula (por exemplo uma população de células) da modalidade 205.

[0880] 208. O método da modalidade 206, em que a hemoglobinopatia é talassemia beta ou doença falciforme.

[0881] 209. O método de qualquer uma das modalidades 206-208, em que é administrada ao paciente humano uma composição compreendendo pelo menos cerca de $1e6$ células, da modalidade 205, por kg de peso corporal do paciente humano, p.ex., pelo menos cerca de $1e6$ células CD34+, da modalidade 205, por kg de peso corporal do paciente humano.

[0882] 210. O método da modalidade 209, em que é administrada ao paciente humano uma composição compreendendo pelo menos cerca de 2×10^6 células, da modalidade 205, por kg de peso corporal do paciente humano, p.ex., pelo menos cerca de 2×10^6 células CD34+, da modalidade 205, por kg de peso corporal do paciente humano.

[0883] 211. O método da modalidade 209, em que é administrada ao paciente humano uma composição compreendendo cerca de 2×10^6 a cerca de 10×10^6 células, da modalidade 205, por kg de peso corporal do paciente humano, p.ex., pelo menos cerca de 2×10^6 a cerca de 10×10^6 células CD34+, da modalidade 205, por kg de peso corporal do paciente humano.

[0884] 212. Uma molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-86, uma composição, de qualquer uma das modalidades 87-114 ou 168-169, um ácido nucleico, de qualquer uma das modalidades 105-112, um vetor, de qualquer uma das modalidades 113-114, uma célula, de qualquer uma das modalidades 134-156 ou 205, ou uma população de células, de qualquer uma das modalidades 157-167, para uso como um medicamento.

[0885] 213. Uma molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-86, uma composição, de qualquer uma das modalidades 87-114 ou 168-169, um ácido nucleico, de qualquer uma das modalidades 105-112, um vetor, de qualquer uma das modalidades 113-114, uma célula, de qualquer uma das modalidades 134-156 ou 205, ou uma população de células, de qualquer uma das modalidades 157-167, para uso na fabricação de um medicamento.

[0886] 214. Uma molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-86, uma composição, de qualquer uma das modalidades 87-114 ou 168-169, um ácido nucleico, de qualquer uma das modalidades 105-112, um vetor, de qualquer uma das modalidades 113-114, uma célula, de qualquer uma das modalidades 134-156 ou 205, ou

uma população de células, de qualquer uma das modalidades 157-167, para uso no tratamento de uma doença.

[0887] 215. Uma molécula de gRNA, de qualquer uma das modalidades 1-86, uma composição, de qualquer uma das modalidades 87-114 ou 168-169, um ácido nucleico, de qualquer uma das modalidades 105-112, um vetor, de qualquer uma das modalidades 113-114, uma célula, de qualquer uma das modalidades 134-156 ou 205, ou uma população de células, de qualquer uma das modalidades 157-167, para uso no tratamento de uma doença, em que a doença é uma hemoglobinopatia.

[0888] 216. Uma molécula de gRNA, de qualquer das modalidades 1-86, uma composição de qualquer uma das modalidades 87-114 ou 168-169, um ácido nucleico de qualquer uma das modalidades 105-112, um vetor de qualquer uma das modalidades 113-114, uma célula de qualquer das modalidades 134-156 ou 205, ou uma população de células de qualquer das modalidades 157-167, para utilização no tratamento de uma doença, em que a hemoglobinopatia é talassemia beta ou doença falciforme.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Métodos Gerais Exemplificativos

Seleção e Criação de Guia

[0889] A seleção do guia inicial foi realizada *in silico* utilizando um genoma de referência humano e regiões genômicas de interesse definidas pelo utilizador (por exemplo, um gene, um éxon de um gene, região reguladora não codificante, etc.), para identificar PAMs nas regiões de interesse. Para cada PAM identificado, as análises foram realizadas e as estatísticas reportadas. As moléculas de gRNA foram ainda selecionadas e classificadas com base em um certo número de métodos para determinar a eficiência e eficácia, por exemplo, como aqui descrito. Este exemplo fornece os detalhes experimentais para

procedimentos que podem ser usados para testar os sistemas CRISPR, gRNAs e outros aspectos da invenção aqui descritos. Quaisquer modificações nesses procedimentos gerais que foram empregadas em uma experiência específica são anotadas nesse exemplo.

[0890] Ao longo dos Exemplos, nas experiências abaixo, foram utilizadas moléculas de sgRNA ou moléculas de dgRNA. A menos que indicado de outra forma, onde as moléculas de dgRNA foram usadas, o gRNA inclui o seguinte:

crRNA: [domínio-alvo]-[SEQ ID NO: 201]

tracr (trRNA): SEQ ID NO: 224;

[0891] A menos que indicado de outro modo, em experiências empregando uma molécula de sgRNA, foi utilizada a seguinte sequência:

[domínio-alvo]-[SEQ ID NO: 195]-UUUU

Sequenciamento de Próxima Geração (NGS) e Análise para Eficiência de Clivagem no Alvo e Formação de Indel

[0892] Para determinar a eficiência da edição (por exemplo, clivagem) da localização-alvo no genoma, sequenciamento profundo foi utilizado para identificar a presença de inserções e deleções introduzidas por união de extremidade não homóloga.

[0893] Em resumo, os iniciadores de PCR foram desenhados em torno do sítio-alvo e a área genômica de interesse foi amplificada por PCR em amostras editadas e não editadas. Amplicons resultantes foram convertidos em bibliotecas de sequenciamento Illumina e sequenciados. As leituras de sequenciamento foram alinhadas com a referência do genoma humano e submetidas à análise de chamada variante, permitindo-nos determinar as variantes de sequência e a sua frequência na região de interesse alvo. Os dados foram submetidos a vários filtros de qualidade e as variantes conhecidas ou variantes identificadas apenas nas amostras não editadas foram excluídas. A percentagem de

edição foi definida como a percentagem de todos os eventos de inserções ou deleções ocorrendo no sítio de interesse no alvo(ou seja, leituras de inserção e exclusão no sítio-alvo sobre o número total de leituras (leituras de tipo selvagem e mutantes) em sítio-alvo. Uma descrição detalhada do processo de análise de NGS é descrita no Exemplo 2.1.

Geração de RNP

[0894] A adição de crRNA e trRNA à proteína Cas9 resulta na formação do complexo ribonucleoproteico (RNP) Cas9 ativo, que medeia a ligação à região-alvo especificada pelo crRNA e clivagem específica do DNA genômico alvo. Este complexo foi formado pelo carregamento de trRNA e crRNA em Cas9, que se acredita causar alterações conformacionais para Cas9 permitindo que ele se ligue e clive o dsDNA.

[0895] O crRNA e o trRNA foram desnaturados separadamente a 95 °C durante 2 minutos e deixados a atingir a temperatura ambiente. Adicionou-se proteína Cas9 (10 mg/mL) a tampão 5X CCE (20 mM HEPES, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5% glicerol), ao qual foi então adicionado trRNA e os vários crRNAs (em reações separadas) e incubados a 37 °C durante 10 minutos, formando assim o complexo RNP ativo. O complexo foi entregue por eletroporação e outros métodos em uma grande variedade de células, incluindo células hematopoiéticas HEK-293 e CD34+.

Entrega de RNPs a CD34+ HSCs

Os RNPs Cas9 foram entregues em CD34+ HSCs.

[0896] CD34+ HSCs foram descongeladas e cultivadas (a ~500.000 células/mL) durante a noite em meio StemSpan SFEM (StemCell Technologies) com com adição de IL-12, SCF, TPO, Flt3L e Pen/Strep. Aproximadamente 90.000 células foram aliquotadas e sedimentadas por cada reação de entrega de RNP. As células foram então

ressuspensas em tampão de nucleofecção P3 60 uL (Lonza), ao qual o RNP ativo foi subsequentemente adicionado. As HSCs foram então eletroporadas (por exemplo, nucleofectadas usando o programa CA-137 em um Nucleofector Lonza) em triplicado (20 uL/eletroporação). Imediatamente após a eletroporação, meio StemSpan SFEM (com IL-12, SCF, TPO, Flt3L e Pen/Strep) foi adicionado às HSCs, que foram cultivadas durante pelo menos 24 horas. As HSCs foram então colhidas e submetidas a análises de expressão de T7E1, NGS e/ou marcadores de superfície.

Ensaio Funcional HSC

[0897] As CD34+ HSCs podem ser testadas quanto ao fenótipo de células-tronco utilizando técnicas conhecidas, tais como citometria de fluxo ou o ensaio *in vitro* de formação de colônias. A título de exemplo, as células foram ensaiadas pelo ensaio *in vitro* de formação de colônias (CFC) utilizando o kit Methocult H4034 Optimum (StemCell Technologies) utilizando o protocolo do fabricante. Resumidamente, 500-2000 células CD34+ em volume ≤ 100 uL são adicionadas a 1-1,25 mL Methocult. A mistura foi agitada vigorosamente durante 4-5 segundos para misturar completamente, depois deixada repousar à temperatura ambiente durante pelo menos 5 minutos. Utilizando uma seringa, transferiram-se 1-1,25 ml de MethoCult + células para um disco de 35 mm ou poço de uma placa de 6 poços. O número e a morfologia das colônias foram avaliados após 12-14 dias, de acordo com o protocolo do fabricante.

Xeno-transplante *in vivo*

[0898] As HSCs são funcionalmente definidas pela sua capacidade de se auto-renovar e por diferenciação de múltiplas linhagens. Esta funcionalidade só pode ser avaliada *in vivo*. O padrão-ouro para determinar a função de HSC humana é através do xeno-transplante no camundongo gama NOD-SCID (NSG) que através de uma série de

mutações é gravemente imunocomprometido e, portanto, pode atuar como um receptor para as células humanas. As HSCs que seguem a edição foram transplantadas em camundongos NSG para validar que a edição induzida não afeta a função HSC. A análise periódica de sangue periférico foi usada para avaliar o desenvolvimento de linhagem e quimerismo humano e transplante secundário, após 20 semanas foi usada para estabelecer a presença de HSCs funcionais, como descrito em mais detalhe nestes exemplos.

Exemplo 2.1 Edição de região HPFH não deleção em células-tronco hematopoiéticas e progenitoras (HSPCs) utilizando CRISPR-Cas9 para desrepressão da expressão de globina fetal em células eritroides adultas

Métodos:

[0899] Cultura celular CD34⁺ humana. As células CD34⁺ humanas foram isoladas de sangue periférico mobilizado G-CSF de doadores adultos (AllCells) utilizando imunosseleção (Miltenyi), de acordo com as instruções do fabricante, e expandidas durante 4 a 6 dias utilizando StemSpan SFEM (StemCell Technologies; Cat N° 09650) suplementado com 50 ng/mL de cada um de trombopoietina (Tpo, Life Technologies, Cat. #PHC9514), ligando Flt3 (Flt-3L, Life Technologies, Cat. #PHC9413), fator de células-tronco humano (SCF, Life Technologies, Cat. n.º PHC2113) e interleucina-6 humana (IL-6, Life Technologies, Cat. n.º PHC0063), bem como 1x antibiótico/antimicótico (Gibco, Cat. #10378-016) e 500 nM do composto 4. Ao longo deste exemplo (incluindo seus sub-exemplos), onde o protocolo indica que as células foram "expandidas", este meio foi usado. Esse meio também é conhecido como "meio de expansão de células-tronco" ou "meio de expansão" ao longo deste exemplo (incluindo seus sub-exemplos).

[0900] Montagem de Cas9 e complexos de ribonucleoproteína (RNP) de RNA guia, preparação de HSPC e eletroporação de RNP em

HSPC. Os complexos de ribonucleoproteína de Cas9-RNA guia (RNPs) foram preparados imediatamente antes da eletroporação. Para formação de RNP utilizando RNAs guias duplos (dgRNAs), 6 µg de cada de crRNA (em 4,5 µL) e tracr (em 2,52 µL) são primeiro desnaturados a 95 °C durante 2 min em tubos separados e depois arrefecidos para a temperatura ambiente. Para preparação da proteína Cas9, misturaram-se 12 µg de proteína CAS9 (em 2 µL) com 1 µL de tampão 5x CCE (20 mM de HEPES, 100 mM de KCL, 10 mM de MgCL₂, 5% de glicerol e 1 mM de DTT acabado de adicionar). O Tracr foi primeiro misturado com a preparação Cas9 e incubado a 37 °C durante 5 min. O crRNA foi então adicionado aos complexos Tracr/CAS9 e incubado por 5 min a 37 °C. Para a condição Nenhum/controle, o veículo em vez do crRNA foi adicionado aos complexos Tracr/CAS9. As HSPC foram recolhidas por centrifugação e ressuspensas em tampão P3 + suplemento que vem com o kit de eletroporação Lonza (Cat#V4XP-3032 Lonza Amaxa P3 primary cell 4-D nucleofection X Kit S) a uma densidade celular de 2,8 x 10⁶ /mL. O RNP foi misturado com 40 µL de células por pipetagem para cima e para baixo e incubado a TA durante 2 min. Para cada réplica de 21 µL da mistura celular / RNP foi transferida para Lonza Amaxa P3 primary cell 4-D nucleofection X Kit S. A eletroporação foi realizada com um sistema de transfecção de Lonza (4D-Nucleofector X Unit) usando o protocolo de CM-137. Eletroporações duplicadas de 21 µL foram realizadas.

[0901] Eritropoiese *in vitro* e análise FACS para células eritroides contendo HbF. Após a eletroporação, as células foram imediatamente transferidas para 250 µL de meio de diferenciação eritroide pré-aquecido (EDM), consistindo em IMDM (GE Life Sciences, Cat. N.º SH30228.01), 330 µg/mL de holo-transferrina humana (Invitria Cat N.º 777TRF029), 10 µg/mL de insulina humana recombinante (Gibco Cat N.º A1138211), 2 IU/mL de heparina (Sigma, parte N.º H3393), 5% soro

AB humano (Sigma, Cat N.º H4522), 2,5 U/mL de eritropoietina humana (Peprotech #100-064) e 1x antibiótico/antimicótico (Gibco, Cat. N.º 10378-016). Durante o período de cultura inicial até ao dia 7, EDM foi adicionalmente suplementado com 1,38 µM de hidrocortisona (Sigma H8672), 100 ng/mL de SCF humano (Life Technologies, Cat. #PHC2113), e 5 ng/mL de IL-3 humana (Peprotech #10779-598) para produzir EDM-I. Após 4 dias, a cultura de células foi diluída em meio fresco. As culturas foram mantidas durante um total de 7 dias nas condições de cultura descritas acima, altura em que metade das células foram analisadas por coloração intracelular para expressão de HbF. Resumidamente, as células foram lavadas uma vez com PBS, ressuspensas em corante de células mortas violeta fixável LIVE/DEAD® (ThermoFisher L34963; 1:1000 em PBS) e incubadas durante 30 min. As células foram então lavadas e coradas com diluições de 1/50 de anti-CD71-BV711 (Fisher Scientific Company Llc. BD 563767) e anticorpos anti-CD235a-APC (BD 551336) durante 30 min. As células foram então lavadas, seguido por fixação com tampão de fixação (Biolegend, Cat# 420801) e permeabilizadas com tampão de lavagem de permeabilização de coloração intracelular 1x (Biolegend, Cat# 421002) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram então incubadas com uma diluição de 1/40 de anticorpo anti-HbF-PE (Life Technologies, parte#MHFH04) em 50 µL de tampão de lavagem de permeabilização de coloração intracelular 1x durante 20 min à temperatura ambiente. As células foram lavadas duas vezes com 0,2 mL de tampão de lavagem de permeabilização de coloração intracelular 1x e ressuspensas em tampão de coloração e analisadas em um citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences) para a expressão de HbF. Os resultados foram analisados utilizando Flowjo e os dados foram apresentados como a % de células positivas para HbF (células F) na população de células viáveis eritroides positivas para CD71.

[0902] A partir do dia 7 restante, as células cultivadas 80.000 por condição foram transferidas para um meio de cultura EDM-II para posterior diferenciação até o dia 11. O EDM-II consiste em EDM-I suplementado com apenas 100 ng/mL de SCF. No dia 11 as células foram contadas e 200.000 células por condição foram transferidas para EDM sem suplementos adicionais. No dia 14, as células foram coradas para análise da expressão de HbF semelhante ao dia 7, mas os marcadores de superfície foram excluídos da coloração para evitar a agregação de células.

[0903] Preparação de DNA genômico e sequenciamento de próxima geração (NGS). O DNA genômico foi preparado a partir de HSPC editadas e não editadas, 7 dias após eletroporação, utilizando solução de extração de DNA Quick Extract (Epicentre Cat N.º QE09050). Para determinar a eficiência de edição e padrões de inserções e deleções (indels), produtos de PCR foram gerados usando iniciadores flanqueando os sítios-alvo, que foram então submetidos a sequenciamento de próxima geração (NGS), como descrito na literatura. A edição percentual de sequências correspondentes em amostras não editadas (eletroporadas com RNPs consistindo apenas de Cas9 e Tracr) foi tipicamente inferior a 1% e nunca excedeu 3%.

[0904] Preparação da biblioteca NGS e sequenciamento de amplicons. Os amplicons de PCR foram purificados usando 1,8x de esferas Agencourt AmpureXP (Beckman Coulter) seguindo as recomendações do fabricante. Os amplicons foram quantificados usando o ensaio de dsDNA Quant-iT PicoGreen (Life Technologies) seguindo as recomendações do fabricante. As bibliotecas de sequenciamento Illumina foram geradas usando o kit Nextera DNA Library Prep (Illumina) seguindo as recomendações do fabricante com as seguintes alterações. A *tagmentation* foi realizada em um volume final de 5 uL usando 5 ng de produto de PCR purificado, 0,15 uL de

enzima de *tagment* de Nextera e tampão de *tagmentation* previamente descrito por Wang et al (PMID: 24071908; incorporado aqui por referência). Amplicons *tagmented* foram então amplificados por PCR em um volume final de 50 uL utilizando uma concentração final de 0,2 mM de dNTP (Life Technologies), iniciadores de PCR de Illumina index 0,2 uM (Integrated DNA Technologies), 1x tampão de polimerase de DNA de Phusion (New England Biolabs) e 1U de DNA polimerase de Phusion (New England Biolabs). As condições de ciclagem de PCR utilizadas foram as seguintes: 72 °C durante 3 min, 98 °C durante 2 min e 15 ciclos de 98 °C durante 10 s, 63 °C durante 30 s e 72 °C durante 3 min. As bibliotecas de sequenciamento foram então purificadas utilizando esferas Agencourt AmpureXP de 1,0x (Beckman Coulter) seguindo as recomendações dos fabricantes. As bibliotecas de sequenciamento foram quantificadas utilizando o ensaio de dsDNA Quant-iT PicoGreen (Life Technologies) seguindo as recomendações do fabricante e agrupadas equimolares para sequenciamento. As bibliotecas de sequenciamento foram sequenciadas com 150 leituras de extremidade de pares de bases em um sequenciador MiSeq seguindo as recomendações do fabricante (Illumina). Um mínimo de uma cobertura de sequenciamento de 1000 vezes foi gerado por amplicon.

[0905] Dados de sequenciamento NGS QC e análise de variantes. Utilizando parâmetros padrão, o software de análise Illumina MiSeq (MiSeq reporter, versão 2.6.2, Illumina) foi usado para gerar ficheiros de dados de sequenciamento FASTQ específicos de amplicon (Cock et al., Nucleic Acids Res. 2010, 38 (6): 1767-71, PMID: 20015970). Os ficheiros FASTQ foram então processados através de uma análise variante de pipeline desenvolvida internamente, consistindo de uma série de pacotes de software de domínio público unidos usando um Perl script wrapper padrão. O fluxo de trabalho utilizado foi dividido em cinco etapas.

[0906] **Etapa 1, iniciador de PCR e sequência no e fora do alvo QC:** Para ambos os sítios no e fora do alvo, a sequência proto-espaçador do domínio-alvo de gRNA de 20 nucleotídeos mais a sequência PAM e sequências iniciadoras de PCR específicas do alvo (esquerda e direita sem as sequências Illumina adicionais) foram alinhadas à sequência de referência do genoma humano (construto GRCh38) usando uma pesquisa BLAST (versão 2.2.29+, Altschul et al., J Mol Biol., 1990, 215(3):403-10, PMID: 2231712). Sítios no alvo e fora do alvo com múltiplos sítios genômicos foram sinalizados.

[0907] **Etapa 2, descompactação do ficheiro sequenciador:** Os ficheiros FASTQ.GZ gerados pelo sequenciador Illumina foram descompactados para ficheiros FASTQ usando o script gzip (versão 1.3.12) e o número de leituras por arquivo foi calculado. Ficheiros sem leituras foram excluídos da análise posterior.

[0908] **Etapa 3, alinhamento de leitura de sequência e corte de qualidade:** As leituras de sequenciamento nos ficheiros FASTQ foram alinhadas à sequência de referência do genoma humano (construto GRCh38) usando o alinhador BWA-MEM (versão 0.7.4-r385, Li e Durbin, Bioinformatics, 2009, 25(14):1754-60, PMID: 19451168) usando 'hard-clipping' para aparar as extremidades 3' de leituras de sequências Illumina e bases de baixa qualidade. As leituras alinhadas resultantes, no formato de ficheiro BAM (Li et al, Bioinformatics, 2009 25(16):2078-9, PMID: 19505943), foram convertidas para ficheiros FASTQ usando o script SAMtools (versão 0.1.19-44428cd, Li et al, Bioinformatics, 2009 25(16):2078-9, PMID: 19505943). Os ficheiros FASTQ foram então alinhados novamente com a sequência de referência do genoma humano (construto GRCh38) usando o alinhador BWA-MEM, desta vez sem "hard-clipping".

[0909] **Etapa 4, análise variante (SNP e INDEL):** Os ficheiros BAM de leituras alinhadas foram processados usando o chamador variante

VarDict (versão 1.0 'Cas9 aware' modificado pelo desenvolvedor ZhongWu Lai, Lai et al, Nucleic Acids Res., 2016, 44(11):e108, PMID: 27060149) com limite de detecção de frequência alélica ajustado em $\geq 0,0001$ para identificar variantes (SNPs e indels). O chamador VarDict Cas9 aware é baseado em um pacote de domínio público, mas capaz de mover chamadas de variantes ambíguas, geradas devido a sequências repetitivas na região de alinhamento dos eventos de variantes, em direção ao potencial sítio de corte da nuclease Cas9 na sequência do domínio-alvo de gRNA localizada 3 bases em 5' da sequência PAM. O script SAMtools foi usado para calcular a cobertura de leitura por amostra amplicon para determinar se os sítios no alvo e fora do alvo estavam cobertos com uma cobertura de sequência de >1000 vezes. Sítios com <1000 vezes de cobertura de sequências foram sinalizados.

[0910] **Etapas 5, filtragem de dbSNP e análise diferencial tratada/não tratada:** As variantes identificadas foram filtradas para variantes conhecidas (SNPs e indels) encontradas em dbSNP (construto 142, Shery et al., Nucleic Acids Res. 2001, 29(1):308-11, PMID: 11125122). As variantes nas amostras tratadas foram adicionalmente filtradas para excluir: 1) variantes identificadas nas amostras de controle não editadas; 2) variantes com um desvio de cadeia VarDict de 2:1 (onde as contagens de leitura direta e inversa que suportam a sequência de referência são balanceadas, mas desbalanceadas para a chamada de variante de não referência); 3) variantes localizadas > 5 pb de cada lado do potencial sítio de corte Cas9; 4) variantes de nucleotídeo único.

Resultados:

[0911] Mostramos aqui o resultado surpreendente de que a ruptura direcionada de sequências específicas (por exemplo, pela criação de indel nessas regiões ou próximo delas) nas regiões promotoras de

HBG1 ou HBG2 alivia a repressão da expressão de γ -globina, permitindo a produção de glóbulos vermelhos contendo proteína HbF elevada (células que expressam hemoglobina fetal são por vezes referidas aqui como "células F"). HbF elevada previne que os glóbulos vermelhos fiquem falciformes em condições desoxigenadas e será terapêutica/curativa para os pacientes tanto da β -talassemia como da SCD. Aqui, o transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (HSCT) com HSC editado no genoma *ex vivo* de pacientes SCD foi também combinado com tecnologia de aumento de expansão de células-tronco, por exemplo, um inibidor de receptor de hidrocarboneto de arila (AHR), por exemplo, como descrito em WO2010/059401 (o seu conteúdo é incorporado por referência na sua totalidade), por exemplo, o Composto 4 para melhorar a expansão *ex vivo* e aumentar a dose entregue de HSC modificada por gene.

[0912] Para edição eficiente do genoma através de nuclease programável, Cas9, a entrega bem-sucedida de RNA guia (gRNA) e proteína Cas9 em células e tecidos alvo é essencial. Aqui, mostramos a entrega de complexos de ribonucleoproteína gRNA/Cas9 pré-complexos (RNP) por eletroporação leva a edição de genoma eficiente e específica quase imediatamente após a entrega e são degradados nas células, reduzindo os efeitos fora do alvo. Em contraste, o uso de sistemas de plasmídeo e vetor viral usados para fornecer Cas9 resulta em expressão prolongada da enzima, que podem agravar os efeitos fora do alvo associados ao sistema. Além disso, a entrega de RNPs nas células-alvo não requer ferramentas adicionais que facilitem muito a tradução da edição do genoma para fins terapêuticos na clínica.

[0913] A proteína Cas9 de *S. Pyogenes* recombinante (SEQ ID NO: 236) foi purificada a partir de *Escherichia coli* e complexada com gRNAs sintéticos duplos (dgRNA) que consistem em crRNA e tracr para gerar complexos de ribonucleoproteína (RNP). A lista e sequências de

domínios-alvo de gRNAs usados no estudo são mostradas na Tabela 1. A maioria das sequências de gRNAs possui alvos perfeitos ou apenas 1 ou 2 desemparelhamentos em ambas as áreas promotoras de HBG1 e HBG2. Esta situação é devida à duplicação dos genes HBG no locus da globina beta humana. Os complexos RNP foram sujeitos a eletroporação em CD34+ HSPC através de eletroporação como descrito em materiais e métodos. As células foram expandidas antes da entrega dos complexos RNP. Sem estar ligado à teoria, a divisão ativa de células pode facilitar a captação de complexos RNP entregues por eletroporação.

[0914] Tabela 4 Lista de gRNAs com direcionamento na região promotora de HBG1 e HBG2 usada no estudo atual. Todas as moléculas de gRNA foram testadas em duplicado no formato dgRNA, descrito acima.

ID do domínio-alvo do RNA guia	Av %CD71+ (dia 7)	Std % CD71+ (dia 7)	% HbF+ (células F), média de réplicas dia 7	% HbF+ (células F), desvio padrão dia 7	% HbF+ (células F), média de réplicas dia 14	% HbF+ (células F), desvio padrão dia 14	% HBG1 editada, Média de réplicas	% HBG1 editada, desvio padrão	% HBG2 editada, Média de réplicas	% HBG2 editada, desvio padrão
simulado	78,95	0,21	16,90	0,71	29,15	2,19	n/a	n/a	n/a	n/a
g8	73,15	1,20	49,25	0,64	66,95	1,48	n/a	n/a	n/a	n/a
GCR-0001	76,05	0,78	50,45	1,63	50,90	1,13	20,77	4,48	0,40	0,11
GCR-0002	73,5	1,41	24,50	0,42	33,85	1,91	1,37	0,04	1,54	0,16
GCR-0003	72,85	3,32	29,05	1,63	36,00	0,42	2,77	0,67	0,21	0,05
GCR-0004	72,4	0,42	24,60	0,14	32,55	0,21	0,82	0,04	0,82	0,04
GCR-0005	71,15	2,76	24,40	0,71	33,00	1,27	0,79	0,02	0,85	0,07
GCR-0006	76,25	2,33	43,40	0,00	43,90	2,40	4,95	0,76	5,92	1,10
GCR-0007	76,85	1,91	29,70	1,98	31,25	0,07	3,94	0,81	0,29	0,01
GCR-0008	70,75	6,15	61,60	2,12	55,75	2,90	57,72	4,53	75,09	1,96
GCR-0009	78,35	0,21	39,95	2,90	41,70	3,54	11,99	2,60	0,24	0,02

GCR-00010	73,1	5,52	46,15	2,19	43,30	0,85	5,42	0,17	9,58	0,63
GCR-00011	72,2	0,28	43,15	0,07	43,65	1,48	33,62	1,92	11,15	1,42
GCR-00012	69,3	0,42	51,00	0,00	49,05	0,07	44,34	4,16	5,39	0,08
GCR-00013	71,95	3,89	23,95	0,21	32,35	0,78	1,02	0,52	0,99	0,50
GCR-00014	76,55	0,64	28,95	0,49	33,65	2,33	5,26	0,37	0,25	0,04
GCR-00015	76,1	1,56	30,95	0,64	36,45	0,92	5,58	0,01	0,29	0,05
GCR-00016	77,35	0,64	23,75	0,07	30,90	2,12	0,59	0,08	nd	nd
GCR-00017	77,7	2,97	25,35	0,78	29,80	0,42	2,27	0,56	2,00	0,05
GCR-00018	79,3	0,14	28,05	2,05	33,15	1,77	3,32	0,74	nd	nd
GCR-00019	79,2	0,99	28,30	1,70	34,65	0,92	4,47	0,14	6,17	1,19
GCR-00020	78,7	0,57	25,30	1,56	31,05	0,07	1,25	0,64	nd	nd
GCR-00021	76,05	0,07	24,75	0,64	30,70	2,69	1,09	0,01	1,41	0,20
GCR-00022	75,75	1,06	25,00	1,56	32,25	0,92	0,24	0,02	2,01	0,16
GCR-00023	76,95	2,76	23,00	0,57	31,80	0,85	0,31	0,05	nd	nd
GCR-00024	77,7	1,56	22,90	0,28	30,50	1,41	0,47	0,25	nd	nd
GCR-00025	77	0,71	26,70	0,85	32,80	0,71	1,59	0,01	nd	nd
GCR-00026	76,85	2,05	24,15	0,49	30,95	0,35	0,95	0,18	1,43	0,11
GCR-00027	78,65	0,35	25,80	0,00	29,00	1,13	nd	nd	0,78	0,01
GCR-00028	79	2,97	50,60	0,71	47,90	0,85	24,90	2,02	nd	nd
GCR-00029	74,7	0,99	28,90	1,13	32,50	1,70	0,19	0,10	4,09	1,00
GCR-00030	77	3,25	24,95	0,92	32,20	0,57	0,96	0,08	nd	nd
GCR-00031	79	0,99	30,40	0,71	36,00	1,70	2,87	0,93	2,98	0,84
GCR-00032	78,55	0,21	26,30	0,28	33,00	0,71	4,25	0,56	4,61	0,66
GCR-00033	78,75	0,92	27,20	1,56	32,95	1,91	3,00	0,68	3,58	0,28
GCR-00034	80,05	0,49	50,55	1,48	50,35	1,48	6,31	0,24	12,68	0,64
GCR-00035	79,75	0,35	23,30	0,00	31,30	0,71	3,68	0,16	nd	nd
GCR-00036	79,7	0,57	23,50	0,28	30,95	0,07	0,71	0,21	1,51	0,36

GCR-0037	74,9	2,26	34,85	0,49	34,55	0,64	4,30	0,67	7,95	0,83
GCR-0038	77	0,14	25,20	0,28	30,55	2,19	1,61	0,13	nd	nd
GCR-0039	75,35	1,06	25,50	0,28	34,40	0,99	2,66	0,62	0,43	0,01
GCR-0040	76,35	1,06	28,20	0,71	33,50	0,57	2,66	0,51	2,61	0,21
GCR-0041	74,8	3,68	24,30	0,99	33,80	0,71	0,90	0,14	nd	nd
GCR-0042	73,6	4,10	26,45	0,49	33,65	2,76	1,75	0,22	2,43	0,13
GCR-0043	70,4	0,00	25,45	0,21	33,25	0,21	1,17	0,02	1,66	0,17
GCR-0044	74,7	0,00	26,10	0,85	34,25	2,19	2,40	0,14	3,65	0,01
GCR-0045	75,75	1,91	41,30	1,70	41,55	1,34	7,46	0,71	11,75	2,79
GCR-0046	77,85	1,91	41,30	1,70	42,40	0,71	1,69	0,03	13,10	0,15
GCR-0047	74,6	2,40	49,15	4,03	39,90	2,12	24,89	6,43	45,59	10,58
GCR-0048	76,85	4,88	60,75	1,77	52,95	2,62	28,49	10,88	47,10	15,49
GCR-0049	78,05	0,21	34,50	0,57	37,45	1,77	3,39	0,55	nd	nd
GCR-0050	76,25	6,72	45,90	2,12	41,20	0,57	21,36	8,74	30,16	1,60
GCR-0051	81,55	2,19	54,55	0,92	51,35	1,77	25,09	0,33	77,84	1,39
GCR-0052	80,6	0,14	37,25	1,77	42,35	0,35	0,31	0,04	20,52	1,70
GCR-0053	80,35	0,64	39,75	1,20	43,45	1,63	6,81	0,57	10,47	2,01
GCR-0054	81,05	0,21	44,55	0,78	46,55	1,48	0,48	0,10	23,91	2,87
GCR-0055	81,4	0,71	22,95	0,35	31,70	0,42	1,79	0,62	2,40	0,47
GCR-0056	81,1	0,85	31,70	0,14	37,00	0,28	2,63	0,46	5,24	0,66
GCR-0057	72,4	6,08	25,25	0,78	30,25	1,20	0,88	0,56	nd	nd
GCR-0058	70,95	3,04	40,00	0,71	39,25	0,49	0,54	0,13	17,84	1,33
GCR-0059	73,85	2,76	29,75	0,64	33,85	0,07	3,36	0,18	5,56	0,91
GCR-0060	67	8,20	24,70	0,14	30,95	0,07	0,99	0,06	1,06	0,38
GCR-0061	71,1	3,82	30,05	0,49	35,80	0,42	2,91	0,67	2,07	nd
GCR-0062	74,9	4,67	43,95	3,46	43,60	2,26	7,77	1,89	13,23	2,01
GCR-0063	77,05	2,62	42,20	1,13	43,80	1,13	11,32	0,84	17,89	1,55

GCR-0064	78,85	0,21	21,85	0,92	31,60	1,41	0,83	0,12	0,81	0,08
GCR-0065	78,15	0,21	26,35	2,05	34,75	0,49	nd	nd	nd	nd
GCR-0066	78,85	1,77	23,85	0,07	31,55	0,64	4,86	0,18	4,89	0,08
GCR-0067	69	7,07	62,75	0,92	53,85	2,19	16,54	4,20	29,61	7,91
GCR-0068	78,1	1,84	27,75	1,77	34,40	0,71	3,77	0,12	0,39	0,07
GCR-0069	79,15	2,19	30,00	0,14	35,40	1,56	4,28	0,10	6,23	1,40
GCR-0070	77,9	0,14	30,70	0,42	36,05	1,20	3,47	0,56	nd	nd
GCR-0071	79,2	0,42	36,80	2,55	39,80	2,12	67,16	8,10	nd	nd
GCR-0072	79,25	1,20	26,20	0,28	34,60	1,13	2,89	0,88	3,48	0,64

[0915] A HSPC editada e não editada por genoma foi analisada por citometria de fluxo para níveis de expressão de globina fetal e o marcador eritroide de superfície celular do receptor de transferrina (CD71) usando anticorpos conjugados a corantes fluorescentes. As células vivas foram identificadas e bloqueadas por exclusão de Violeta Live/Dead. A edição do genoma não afetou adversamente a diferenciação eritroide, uma vez que as células cultivadas mostraram percentagens de células CD71+ consistentes com eritroblastos semelhantes a células não editadas. A entrega desses gRNA RNPs a HSPCs resultou em um aumento da percentagem de células eritroides descendentes contendo HbF (até 62,75%) em comparação com células simuladas eletroporadas (16,9%) no dia 7 após a eletroporação (Tabela 4). A avaliação adicional dos níveis de indução de HbF no dia 14 confirmou altos níveis de indução para as sequências de dgRNA com melhor desempenho (tabela 4), embora os níveis de HbF detectados nos controles tenham sido maiores em comparação com o dia 7. A indução de células positivas para HbF por dgRNA incluindo o domínio-alvo de g8 direcionando para o éxon 2 de BCL11A também foi observada em paralelo, e vários dos gRNAs para as regiões HBG1 ou HBG2 resultaram em níveis mais altos de células F que g8. Produtos de

PCR de DNA genômico da região promotora de HBG1 e HBG2 isolados no dia 7 após a eletroporação também foram submetidos a sequenciamento de próxima geração (NGS) para determinar a percentagem de alelos editados na população de células. Elevadas percentagens de edição do genoma na região promotora HBG1 e HBG2 foram observadas em culturas celulares eletroporadas com RNPs contendo Cas9, crRNA do dado domínio-alvo e Tracr (Tabela 4, Figura 1), mas não em células controle sem domínio-alvo entregue (RNPs contendo apenas Cas9 e Tracr). Em particular, os tratamentos de dgRNA que resultaram em mais de 17% de células HbF+ acima do fundo de controle simulado transfectado no dia 7 tiveram um intervalo de 5,92% a 77,84% de alelos editados nos loci alvo HBG1 ou HBG2 (Tabela 4, Figura 2 e Figura 3). Alguns guias com especificidade seletiva para a área do promotor HBG1 ou HBG2 mostraram edição preferencial no sítio para o qual são específicos (por exemplo, GCR-0001, GCR-0011 e GCR-0012 editam HBG1 mais eficientemente e GCR-0034, GCR-0046, GCR-0051, GCR-0052, GCR-0054 e GCR-0058 editam o HBG2 de forma mais eficiente). Uma notável e surpreendente exceção a essa correlação é o GCR-0008, que, embora específico para uma sequência-alvo do locus HBG1, edita os loci HBG1 e HBG2 eficientemente e também resulta em elevada indução de HbF. O GCR-0008 tem uma única incompatibilidade com a sequência-alvo no locus do HBG2, sugerindo que a edição eficiente fora do alvo ocorre neste sítio. A sequência-alvo de alguns dos 72 gRNAs testados mapeia regiões sobrepostas ou próximas a várias mutações humanas anotadas associadas à persistência hereditária da expressão de hemoglobina fetal (HPFH), bem como a sítios de ligação conhecidos para fatores de transcrição nas áreas promotoras proximais de HBG1 e HBG2 (Figura 4 e Figura 5). Surpreendentemente, um grupo de gRNAs de melhor desempenho tem como alvo sequências fora dessas áreas conhecidas

de função promotora nos genes HBG1 e HBG2 (por exemplo, mapear para chr11:5,250,094-5,250,237; hg38 e chr11:5,255,022-5,255,164; hg38 (Figura 4 e Figura 5), respectivamente). Esses gRNAs incluem GCR-0001, GCR-0006, GCR-0008, GCR-0009, GCR-0010, GCR-0011, GCR-0012, GCR-0034, GCR-0046, GCR-0048, GCR-0051, GCR-0054, GCR-0058 e GCR-0067. Outro gRNA de boa performance (GCR-0028) tem como alvo um sítio de ligação do fator de transcrição (caixa TATA) na área do promotor proximal tanto de HBG1 quanto de HBG2 que não está associado a mutações no HPFH não deleção (chr11: 5,249,833-5,249,927; hg38 e chr11: 5,254,738-5,254,851; hg38 (Figura 4 e Figura 5), respectivamente).

Exemplo 2,2: Edição da região promotora da globina gama em HSPCs para desrepressão da expressão de globina fetal em células eritroides adultas - avaliação em sítios selecionados usando CRISPR-Cas9 com formato sgRNA

Métodos:

[0916] Os métodos são como no Exemplo 2,1, com as seguintes modificações.

[0917] Cultura celular CD34⁺ humana. As células CD34⁺ humanas foram derivadas de medula óssea de doadores adultos saudáveis (catálogo Lonza # 2M-101D). As células foram descongeladas e depois expandidas durante 6 dias.

[0918] Montagem de Cas9 e complexos de ribonucleoproteína (RNP) de RNA guia, preparação de HSPC e eletroporação de RNP em HSPC. Para formação de RNP usando RNAs guia simples (sgRNAs), 12 µg de cada de sgRNA, 12 µg de proteína CAS9 e 1 µL de tampão 10x CCE (20 mM HEPES, 100 mM KCL, 5 mM MgCL₂, 5% de Glicerol e DTT 1 mM recentemente adicionado foram combinados em um volume total de 10 uL, incubados a 37 °C por 5 min. Para a condição Nenhum/controle, veículo em vez de sgRNA foi adicionado. A densidade

celular em tampão P3 + suplemento foi de $3,9 \times 10^6$ /mL.

[0919] Eritropoiese *in vitro* e análise FACS para células eritroides contendo HbF. No dia 11, as células foram transferidas para EDM sem suplementos adicionais. No dia 14 e no dia 18 as células foram sedimentadas e ressuspensas em EDM fresco sem suplementos adicionais. Uma alíquota de células foi retirada para análise da expressão de HbF no dia 14 e dia 21. As células foram coradas semelhante ao dia 7, mas marcadores de superfície foram excluídos da coloração para evitar a agregação de células e o anticorpo anti-HbF foi utilizado a diluição de 1:20.

[0920] Preparação de DNA genômico e sequenciamento de próxima geração (NGS). O DNA genômico foi preparado a partir de HSPC editadas e não editadas, 3 dias após eletroporação, utilizando solução de extração de DNA Quick Extract (Epicentre Cat N.º QE09050). A análise de NGS descrita abaixo não mostrou edição significativa em amostras de controle eletroporadas com Cas9 sozinho.

[0921] A preparação da biblioteca NGS e sequenciamento dos produtos de amplificação foi efetuado tal como descrito no Exemplo 2.1. A análise dos dados de sequenciamento NGS QC e da variante foi realizada como descrito no Exemplo 2.1.

Resultados:

[0922] Mostramos aqui que a ruptura direcionada de sequências específicas dentro das regiões promotoras de HBG1 ou HBG2, levando à produção de células F, também pode ser realizado utilizando gRNA do formato sgRNA.

[0923] Tabela 5. Lista de gRNAs selecionados com direcionamento na região promotora de HBG1 e HBG2 usada no estudo atual. Todas as moléculas de sgRNA foram testadas em duplicado no formato dgRNA, descrito acima.

ID do domínio-alvo do RNA guia	% HbF+ (células F), média de réplicas dia 7	% HbF+ (células F), desvio padrão dia 7	% HbF+ (células F), média de réplicas dia 14	% HbF+ (células F), desvio padrão dia 14	% HbF+ (células F), média de réplicas dia 21	% HbF+ (células F), desvio padrão dia 21	% HBG1 editada, Média de réplicas	% HBG1 editada, desvio padrão	% HBG 2 editada, Média de réplicas	% HBG 2 editada, desvio padrão
Ne-nhum/Controle	39,0	1,8	32,7	0,6	14,4	4,9	n/a	n/a	n/a	n/a
GCR-0001	60,8	2,5	49,2	0,4	20,5	7,6	15,8	3,0	0,0	0,0
GCR-0008	67,1	0,8	55,2	2,3	25,6	9,3	55,2	2,0	40,9	2,8
GCR-0010	61,3	0,8	52,3	1,0	14,0	0,8	4,8	0,8	3,0	0,0
GCR-0028	58,7	1,6	49,2	0,1	14,1	2,1	nd	nd	nd	nd
GCR-0047	52,6	1,6	41,2	4,1	16,7	3,3	nd	nd	nd	nd
GCR-0048	64,3	2,3	57,5	2,3	28,8	11,0	53,7	5,3	57,2	5,3
GCR-0051	65,3	3,0	59,1	2,0	20,6	5,7	27,3	0,3	50,6	3,8
GCR-0053	71,7	3,3	73,7	3,3	26,2	2,6	11,9	4,2	28,0	6,1
GCR-0054	67,3	2,0	61,4	4,0	23,4	3,5	nd	nd	18,4	1,9
GCR-0062	61,1	5,2	54,8	1,1	16,7	1,7	2,5	1,8	3,9	2,7
GCR-0063	63,6	3,7	58,0	1,7	24,6	1,3	16,4	0,2	29,9	2,9
GCR-0067	74,6	0,4	70,4	3,7	36,6	0,6	23,7	0,0	37,5	4,4

[0924] HSPC adultas derivadas da medula óssea foram eletroporadas com complexos RNP formados a partir da proteína recombinante Cas9 de *S. Pyogenes* (SEQ ID NO: 236) e o gRNA indicado do formato sgRNA. A HSPC editada e não editada por genoma resultante foi analisada por citometria de fluxo para níveis de expressão de globina fetal e o marcador eritroide de superfície celular do receptor de transferrina (CD71) usando anticorpos conjugados a corantes

fluorescentes. As células vivas foram identificadas e bloqueadas por exclusão de Violeta Live/Dead. A entrega desses gRNA RNPs a HSPCs resultou em um aumento da percentagem de células eritroides contendo HbF (até 74,6%) em comparação com células simuladas eletroporadas (39,0%) no dia 7 após a eletroporação (Tabela 5). Avaliação adicional dos níveis de indução de HbF no dia 14 e no dia 21 confirmou altos níveis de indução para as sequências de sgRNA com melhor desempenho (Tabela 5). Produtos de PCR de DNA genômico da região promotora de HBG1 e HBG2 isolados no dia 3 após a eletroporação também foram submetidos a sequenciamento de próxima geração (NGS) para determinar a percentagem de alelos editados na população de células. Elevadas percentagens de edição do genoma (excluindo grandes deleções) na região promotora HBG1 e HBG2 foram observadas em muitas culturas celulares eletroporadas com RNPs contendo Cas9 e sgRNA do dado domínio-alvo (Tabela 5), mas não em células controle sem sgRNA entregue (apenas Cas9).

[0925] Sítios de direcionamento selecionados com um aumento de > 17% nas células eritroides HbF+ no dia 7 no Exemplo 2.1 foram incluídos neste estudo. O delineamento experimental diferiu de duas formas significativas do anteriormente descrito no Exemplo 2.1: o formato de gRNA (sgRNA em vez de dgRNA) e a fonte de HSPC (diferentes doadores e derivadas de medula óssea em vez de derivadas do sangue periférico mobilizadas). Sem estar limitado pela teoria, as diferenças nas percentagens de linha de base de células HbF+ em culturas de células não editadas entre os estudos podem ser causadas pelas diferenças inerentes entre as fontes de HSPC. Apesar dessas diferenças, todos os sítios de direcionamento, com exceção do GCR-47, permaneceram associados a um aumento > 17% nas células eritroides HbF+ no dia 7 (Figura 7). Este aumento foi mantido até ao dia 21 para GCR-0067 (Figura 7). Adicionalmente, a formação de indel >

25% em HBG1, HBG2 ou ambos foi observada com GCR-0008, GCR-0048, GCR-0051, GCR-0053, GCR-0063 e GCR-0067 (Tabela 5). Tal como no formato dgRNA (Tabela 4), o GCR-0008 no formato sgRNA foi associado a uma edição eficiente tanto no sítio-alvo de HBG1 como no sítio fora do alvo de HBG2 (Tabela 5). Foi indeterminado se a menor indução de células HbF⁺ com GCR-0047 neste estudo estava associada com edição reduzida. Notavelmente, o dia 7 e o dia 14 da indução de células HbF⁺ de >17% foram associados a sequências de alvos fora das áreas conhecidas da função promotora nos genes HBG1 e HBG2 (por exemplo, mapear para chr11:5,250,094-5,250,237; hg38 e chr11:5,255,022-5,255,164; hg38 (Figura 4 e Figura 5), respectivamente), especificamente GCR-0001, GCR-0008, GCR-0010, GCR-0048, GCR-0051, GCR-0054 e GCR-0067 (Figura 7). Destes, GCR-0008, GCR-0048 e GCR-0067 também tiveram um aumento > 10% nas células HbF⁺ no dia 21 e > 25% nos indels em HBG1, HBG2 ou ambos (Tabela 5 e Figura 7).

Exemplo 2.3: Edição da região promotora da globina gama em HSPCs para desrepressão da expressão de globina fetal em células adultas eritroides - análise adicional de padrões de edição usando CRISPR-Cas9 com formato sgRNA

Métodos:

[0926] Os métodos são como no Exemplo 2.1, com as seguintes modificações.

[0927] Cultura celular CD34⁺ humana. As células CD34⁺ humanas foram derivadas da medula óssea de doadores adultos saudáveis (catálogo Lonza #2M-101D e catálogo Hemacare #BM34-C). As células foram descongeladas e depois expandidas durante 6 dias.

[0928] Montagem de Cas9 e complexos de ribonucleoproteína (RNP) de RNA guia, preparação de HSPC e eletroporação de RNP em HSPC. Para formação de RNP usando RNAs guia simples (sgRNAs),

12 µg de cada de sgRNA, 12 µg de proteína CAS9 e 1 µL de tampão 10x CCE (20 mM HEPES, 100 mM KCL, 5 mM MgCL₂, 5% de Glicerol e DTT 1 mM recentemente adicionado foram combinados em um volume total de 10 uL, incubados a 37 °C por 5 min. Para a condição Nenhum/controle, veículo em vez de sgRNA foi adicionado. A densidade celular em tampão P3 + suplemento foi de $3,9 \times 10^6$ /mL.

[0929] Eritropoiese *in vitro* e análise FACS para células eritroides contendo HbF. No dia 11, as células foram transferidas para EDM sem suplementos adicionais. No dia 14 e no dia 18 as células foram sedimentadas e ressuspensas em EDM fresco sem suplementos adicionais. Uma alíquota de células foi retirada para análise da expressão de HbF no dia 14 e dia 21. As células foram coradas semelhante ao dia 7, mas marcadores de superfície foram excluídos da coloração para evitar a agregação de células e o anticorpo anti-HbF foi utilizado a diluição de 1:20.

[0930] Preparação de DNA genômico e sequenciamento de próxima geração (NGS). O DNA genômico foi preparado a partir de HSPC editadas e não editadas, 3 dias após eletroporação, utilizando solução de extração de DNA Quick Extract (Epicentre Cat N.º QE09050). A análise de NGS descrita abaixo não mostrou edição significativa em amostras de controle eletroporadas com Cas9 sozinho.

[0931] A preparação da biblioteca NGS e sequenciamento dos produtos de amplificação foi efetuado tal como descrito no Exemplo 2.1. A análise dos dados de sequenciamento NGS QC e da variante foi realizada como descrito no Exemplo 2.1.

[0932] PCR não quantitativo para detecção de inversões e grandes deleções. Os seguintes conjuntos de iniciadores foram utilizados para amplificar o gDNA na região de HBG1 e HBG2. P1: iniciador direto 5'-TGCTGAGATGAAACAGGCGT-3' (SEQ ID NO: 257), iniciador reverso 5'- TTAGGCATCCACAAGGGCTG-3' (SEQ ID NO: 258), produto

esperado de ~2,8 kb para deleção entre os sítios-alvo/fora do alvo de HBG1 e HBG2, produto esperado de ~7,7 kb para inversão entre sítios-alvo/fora do alvo de HBG1 e HBG2, produto esperado de ~7,7 kb para nenhuma deleção ou inversão grande (indels não editados ou menores nos sítios-alvo/fora do alvo de HBG1 e/ou HBG2, individualmente). P2: iniciador direto 5'- GCTCTACAAATGGAACCCAACC-3' (SEQ ID NO: 259), iniciador reverso 5'- CTGCTCTGATCTCTAACACCTCA-3' (SEQ ID NO: 260), nenhum produto esperado para deleção entre sítios-alvo/fora do alvo de HBG1 e HBG2, nenhum produto esperado para inversão entre sítios-alvo/fora do alvo de HBG1 e HBG2, produto esperado de ~3,8 kb para nenhuma deleção ou inversão grande (indels não editados ou menores nos sítios-alvo/fora do alvo de HBG1 e/ou HBG2, individualmente). P3: iniciador direto 5'- GAAGATACAGCTTGCCTCCGA -3' (SEQ ID NO: 261), iniciador reverso 5'- TTGCTGAGATGAAACAGGCGT -3' (SEQ ID NO: 262), nenhum produto esperado para deleção entre sítios-alvo/fora do alvo de HBG1 e HBG2, produto esperado de ~1,75 kb para inversão entre sítios-alvo/fora do alvo de HBG1 e HBG2, nenhum produto esperado para nenhuma deleção ou inversão grande (indels não editados ou menores nos sítios-alvo/fora do alvo de HBG1 e/ou HBG2, individualmente). Os produtos de PCR foram visualizados em um gel de agarose juntamente com uma escada de referência contendo bandas de 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10 kb (L; New England Biolabs # N3232L). Os produtos selecionados foram isolados como indicado e sujeitos a NGS como descrito no Exemplo 2.1.

[0933] Quantificação de grandes deleções. Grandes deleções entre sítios de direcionamento nos promotores de HBG1 e HBG2 foram quantificadas por PCR de gota digital (ddPCR) em formato de ensaio não competitivo para determinação do número de cópias de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, o gDNA foi

combinado com ddPCR SuperMix para Sondas (sem dUTPs) (BioRad Cat #1863024), enzima de restrição HindIII-HF (NEB Cat #R3104S) e cada mistura de sonda de iniciador, transferida para um cartucho DG8 juntamente com o Óleo de Geração de Gotículas para Sondas (BioRad Cat #1863005) e gotículas geradas com um gerador de gotículas QX200 (BioRad). As gotículas foram sujeitas a PCR em um Termociclador Touch C1000 com Módulo de Reação de Poço Profundo-96 (BioRad), seguido de detecção com leitor de gotículas QX200 (BioRad). As cópias por μ L foram determinadas por análise com o software QuantaSoft (BioRad). Um conjunto de sondas de iniciador personalizado (Life Technologies Cat #APZW76R, PN4331348, Iniciador direto: ACGGATAAGTAGATATTGAGGTAAGC (SEQ ID NO: 263), Iniciador reverso: GTCTCTTTCAGTTAGCAGTGG (SEQ ID NO: 264), FAM Sonda TaqMan: ACTGCGCTGAACTGTGGCTTTATAG (SEQ ID NO: 265)) usada para amplificar o gDNA dentro da região intergênica HBG1-HBG2. Utilizou-se um Ensaio de Referência de Número de Cópia TaqMan humano, RNase P (Thermo Fisher cat #4403326) como amplicon de referência. Cópias por μ L para os amplicons HBG1-HBG2 e RNase P estavam dentro da faixa linear do fabricante. Percentagem de deleção foi relatada como 100% vezes 1 menos a razão de cópias por μ L para HBG1-HBG2 e amplicons RNase P. Para amostras de controle não editadas calculou-se a percentagem de deleções de 2,4%, o que pode refletir o fundo do ensaio.

Resultados:

[0934] Mostramos aqui que a ruptura direcionada de sequências específicas dentro das regiões promotoras de HBG1 e HBG2 levando à produção de células F está associada a ambos os indels no alvo HBG1 ou HBG2 ou no sítio fora do alvo, bem como deleções e inversões da região interveniente. A análise NGS dos amplicons confirma essa observação.

[0935] Tabela 6 Lista de gRNAs selecionados com direcionamento na região promotora de HBG1 e HBG2 usada no estudo atual para editar células do primeiro doador independente. Todas as moléculas de sgRNA foram testadas em duplicado no formato sgRNA, descrito acima.

ID do domínio-alvo do RNA guia	% HbF+ (células F), média de réplicas dia 7	% HbF+ (células F), desvio padrão dia 7	% HbF+ (células F), média de réplicas dia 14	% HbF+ (células F), desvio padrão dia 14	% HbF+ (células F), média de réplicas dia 21	% HbF+ (células F), desvio padrão dia 21	% HBG1 editada, Média de réplicas	% HBG1 editada, desvio padrão	% HBG2 editada, Média de réplicas	% HBG2 editada, desvio padrão
Nenhum/Controle	37,6	3,0	17,1	0,4	32,4	5,9	n/a	n/a	n/a	n/a
GCR-0001	61,3	1,1	45,6	0,4	75,1	2,1	59,1	3,9	1,0	0,4
GCR-0008	62,9	1,3	42,8	2,1	67,3	1,3	86,3	6,2	85,6	5,5
GCR-0010	69,5	3,0	53,4	0,9	75,0	0,4	19,5	6,2	25,1	1,0
GCR-0048	59,2	4,2	43,8	0,8	66,2	3,6	73,5	9,2	80,4	3,6
GCR-0051	61,9	0,4	49,7	1,7	70,1	6,2	53,0	0,5	86,4	0,6
GCR-0067	72,2	1,8	58,1	1,7	77,4	4,2	68,8	1,2	77,5	1,6

[0936] Tabela 7 Lista de gRNAs selecionados com direcionamento na região promotora de HBG1 e HBG2 usada no estudo atual para editar células do segundo doador independente. Todas as moléculas de sgRNA foram testadas em duplicado no formato sgRNA, descrito acima.

ID do domínio-alvo do RNA guia	% HbF+ (células F), média de réplicas dia 7	% HbF+ (células F), desvio padrão dia 7	% HbF+ (células F), média de réplicas dia 14	% HbF+ (células F), desvio padrão dia 14	% HbF+ (células F), média de réplicas dia 21	% HbF+ (células F), desvio padrão dia 21	% HBG1 editada, Média de réplicas	% HBG1 editada, desvio padrão	% HBG2 editada, Média de réplicas	% HBG2 editada, desvio padrão
Nenhum/Controle	39,3	0,2	23,1	0,8	52,7	0,3	n/a	n/a	n/a	n/a
GCR-0001	58,8	0,7	44,7	3,0	80,2	0,8	62,7	10,0	1,0	0,0
GCR-0008	61,6	2,2	44,4	0,7	75,0	0,5	92,1	5,7	86,4	5,5
GCR-0010	65,5	2,5	47,7	3,0	79,4	0,0	17,7	n/a	28,5	9,0
GCR-0048	60,5	0,3	46,1	3,3	79,3	1,2	68,4	6,6	76,9	9,3
GCR-0051	64,5	1,7	47,1	4,2	78,1	0,4	62,7	7,8	86,4	3,0
GCR-0067	68,8	4,6	54,9	0,4	84,5	3,1	77,4	8,7	78,0	4,2

[0937] HSPC adultas derivadas da medula óssea de 2 doadores independentes foram eletroporadas com complexos RNP formados a partir da proteína recombinante Cas9 de *S. Pyogenes* (SEQ ID NO: 236) e o gRNA indicado do formato sgRNA. sgRNAs avaliados tiveram sequências de direcionamento fora das áreas conhecidas de função promotora nos genes HBG1 e HBG2 (por exemplo, mapear para chr11:5,250,094-5,250,237; hg38 e chr11:5,255,022-5,255,164; hg38 (Figura 4 e Figura 5) respectivamente). A HSPC editada e não editada por genoma resultante foi analisada por citometria de fluxo para níveis de expressão de globina fetal e o marcador eritroide de superfície celular do receptor de transferrina (CD71) usando anticorpos conjugados a corantes fluorescentes. As células vivas foram identificadas e bloqueadas por exclusão de Violeta Live/Dead. A entrega desses gRNA RNPs a HSPCs resultou em um aumento da percentagem de células eritroides descendentes contendo HbF em comparação com células

eletroporadas simuladas nos dias 7, 14 e 21 após a eletroporação (Tabelas 6 e 7). Todos os sítios de direcionamento incluídos foram associados a um aumento de > 17% nas células eritroides HbF⁺ de ambos os doadores em todos os momentos - dias 7, 14 e 21 (Figura 8). Produtos de PCR de DNA genômico da região promotora de HBG1 e HBG2 isolados no dia 3 após a eletroporação também foram submetidos a sequenciamento de próxima geração (NGS) para determinar a percentagem de alelos editados na população de células. Elevadas percentagens de edição do genoma na região promotora de HBG1 e HBG2 (53% a 92% indels) foram observadas em culturas de células de ambos os doadores eletroporados com RNPs contendo Cas9 e sgRNAs com os domínios-alvo GCR-0008, GCR-0048, GCR-0051 e GCR-0067 (Tabelas 6 e 7), mas não em células de controle sem sgRNA entregue (apenas Cas9). O domínio-alvo GCR-0010 foi associado a percentagens de edição reduzidas mas consideráveis na região promotora HBG1 e HBG2 (17% a 28% indels) em culturas de células de ambos os doadores; enquanto que o GCR-0001 foi associado com edição eficiente e seletiva no HBG1 (59% e 62%) em comparação com o HBG2 (1% e 1%) nos dois doadores (Tabelas 6 e 7).

[0938] Os domínios-alvo GCR-0048 e GCR-0067 estão presentes tanto em HBG1 quanto em HBG2, e os outros domínios-alvo estão presentes em HBG1 (GCR-0001, GCR-0008 e GCR-0010) ou HBG2 (GCR-0051) com um potencial incompatível fora do sítio-alvo no outro promotor. A clivagem simultânea em ambos os sítios-alvo/fora do alvo de HBG1 e HBG2 tem o potencial de resultar em deleção e/ou inversão da sequência genômica interveniente de 4,9 kb; aqui, por vezes, também referido como '4,9 kb' ou 'HBG1-HBG2' ou 'grande' inversão ou deleção. Assim, um conjunto de três diferentes reações de PCR foi utilizado para detectar a presença de genomas com deleção ou inversão dessa região. A reação P2 foi concebida para que as sequências

genômicas sem a deleção ou inversão de HBG1-HBG2 fossem amplificadas com um produto resultante de 3,8 kb, enquanto as sequências com a deleção ou inversão de HBG1-HBG2 não seriam amplificadas. Uma banda de aproximadamente deste tamanho foi detectada em todas as amostras (Figura 9), consistente com a detecção de indels menores em cada sítio de direcionamento individual de HBG1 ou HBG2 (Tabelas 6 e 7). A reação P3 foi concebida de modo que as sequências genômicas invertidas de HBG1-HBG2 fossem amplificadas com um produto resultante de 1,7 kb, enquanto as sequências sem essa inversão ou com/sem a deleção de HBG1-HBG2 não seriam amplificadas. Uma banda aproximadamente deste tamanho foi detectada em culturas eletroporadas com RNPs contendo Cas9 e sgRNAs com os domínios-alvo indicados, mas foi indetectável em culturas de controle não editadas (Figura 9). Finalmente, a reação P1 foi concebida para abranger tanto a região de direcionamento de HBG1 quanto de HBG2, de modo que a amplificação de sequências sem a deleção de HBG1-HBG2, bem como aquelas com a região invertida HBG1-HBG2, produzisse um produto de 7,7 kb, enquanto amplificação das sequências contendo a deleção de HBG1-HBG2 resultaria em um produto de 2,8 kb. De fato, as amostras de controle não editadas tinham uma banda superior proeminente a aproximadamente 8 kb e uma banda fraca, potencialmente não específica, a aproximadamente 2,8 kb. Em contraste, as culturas eletroporadas com RNPs contendo Cas9 e sgRNAs com os domínios-alvo indicados tinham uma banda proeminente a aproximadamente 2,8 kb e uma banda fraca a aproximadamente 8 kb (Figura 9). O DNA de cada banda indicada com um asterisco foi isolado e sujeito a sequenciamento de nova geração para confirmar a sua identidade como amplificação da sequência prevista (com ou sem a inversão ou deleção de HBG1-HBG2, como descrito).

[0939] Para posterior caracterização da sequência da região abrangendo os sítios de edição de HBG1 e HBG2, uma quarta condição de PCR de longo alcance (P4) foi desenvolvida para amplificar uma região de 6192 pb englobando os sítios de edição de HBG1 e HBG2 para gRNA GCR-0001, GCR-0008, GCR-0010, GCR-0048, GCR-0051 e GCR-0067. A amplificação de amostras editadas no genoma resulta em dois tamanhos de amplicons (1,2 kb e 6,2 kb), enquanto amostras não editadas geram apenas um tamanho de amplicon (6,2 kb). A análise da sequência dos amplicons de 6,2 kb e 1,2 kb mostra que os amplicons de 1,2 kb são resultado de deleções de 4,9 kb entre os sítios de corte HBG1 e HBG2, enquanto o amplicon de 6,2 kb consiste em alelos de tipo selvagem e indel nos sítios de edição de HBG1 e HBG2. A análise de sequenciamento também mostra um baixo nível de inversões entre os sítios de corte de HBG1 e HBG2 onde a sequência excisada entre os dois sítios foi reincorporada no genoma na direção oposta. Esta análise não é quantitativa, mas a inversão é provavelmente muito rara, pois só é detectada em uma pequena percentagem (<1%) de leituras de sequenciamento abrangendo os sítios de corte de HBG1 e HBG2.

[0940] Em conjunto, estes resultados sugerem que, para além dos indels no sítio-alvo/não alvo de HBG1 ou HBG2, as culturas eletroporadas com RNPs contendo Cas9 e sgRNAs com os domínios-alvo indicados contêm alelos editados com deleção ou inversão da região de HBG1-HBG2 interveniente. Assim, um determinado alelo pós-edição poderia ser uma inversão de HBG1-HBG1, uma deleção de HBG1-HBG2, um indel localizado no sítio de HBG1, um indel localizado no sítio de HBG2 ou um indel localizado no sítio de HBG1 juntamente com um indel localizado no sítio HBG2 sem modificação da região interveniente. As variantes de padrão de reparação de edição mais comuns no alvo geradas pela edição com os gRNAs GCR-0001, GCR-0008, GCR-0010, GCR-0048, GCR-0051 e GCR-0067 são mostradas

na Tabela 7-2. As variantes mostradas são os indels localizados gerados nos loci de HBG1 e HBG2 e grandes deleções de 4,9 kb causadas pela excisão da sequência entre os sítios de corte de HBG1 e HBG2. Os indels localizados foram caracterizados usando análise de PCR e NGS como descrito no Exemplo 2.1. Um ensaio quantitativo de ddPCR foi desenvolvido para determinar a frequência de alelos com a grande deleção de 4,9 kb da região interveniente HBG1 a HBG2 (Figura 10). Resumidamente, o número de cópias da região a montante do promotor HBG1 (entre os iniciadores Fwd e Rev de 5,2 kb mostrados na Figura 10) foi definido em relação ao número de cópias no locus RPPH1 como descrito nos métodos. As frequências alélicas para os indels menores localizados não são relativas à frequência total de indel, porque a amplificação do sítio de HBG1 ou HBG2 para NGS não ocorreria em alelos contendo a inversão ou deleção de 4,9 kb. Por exemplo, para o gRNA GCR-0001 a frequência da deleção de 4,9kb é 35,2%, com os restantes 64,8% (100% - 35,2%, ignorando inversões) sendo uma mistura de indels de tipo selvagem e menores localizados. Portanto, a deleção de 9% do par de bases único A seria de 5,8% da frequência total do indel, ou seja, 9% de 64,8%. As frequências alélicas apresentadas na Tabela 7-2 variam ligeiramente entre as experiências e não devem ser consideradas como valores absolutos.

[0941] Tabela 7-2. Variantes do padrão superior de reparação de edição no alvo (coletivamente para qualquer molécula de gRNA, também referida aqui como "padrão indel"), geradas pela edição de células do primeiro doador com gRNAs GCR-0001, GCR-0008, GCR-0010, GCR-0048, GCR-0051 e GCR-0067. O tamanho da variante, o tipo de variante (Ins = inserção, Del = deleção), o alelo de referência, o alelo variante, a posição inicial e final da variante relativa ao construto hg38 do genoma de referência do cromossomo 11 e a frequência alélica são mostrados. O locus de HBG2 editado com gRNA GCR-0001 não

mostra indícios localizados significativos, mas com base nos resultados de qPCR, resulta em uma deleção de 4,9 kb. * Sítio-alvo HBG1/2 com incompatibilidades.

Nome do gRNA	Tamanho (pb)	Tipo	Alelo de referência	Alelo variante	Posição de início e final da variante	Frequência alélica
GCR-0001 (HBG1)	4928	Del	Não mostrado	Não mostrado	5250172-5255100	35,2%
	-1	Del	CA	C	5250171-5250172	9,0%
	1	Ins	A	A	5250172-5250173	8,1%
	-1	Del	A	A	5250172-5250173	8,0%
	-2	Del	ATA	A	5250172-5250174	5,1%
	1	Ins	A	AA	5250172-5250172	2,6%
GCR-0008 (HBG1)	4928	Del	Não mostrado	Não mostrado	5250150-5255078	40,4%
	1	Ins	T	TA	5250150-5250151	50,5%
	-2	Del	AGC	A	5250151-5250153	3,4%
	-1	Del	TA	T	5250150-5250151	3,3%
	-1	Del	AG	A	5250151-5250152	2,4%
	-4	Del	TAGCT	T	5250150-5250154	2,2%
GCR-0008* (HBG2)	4928	Del	Não mostrado	Não mostrado	5250150-5255078	40,4%
	1	Ins	T	TA	5255078-5255079	55,8%
	-19	Del	CCCTTTA GCTAGTT TTCTTC (SEQ ID NO: 266)	A	5255073-5255092	5,6%
	-2	Del	AGC	A	5255079-5255081	2,9%
	-6	Del	TTTAGCT	T	5255076-5255082	2,8%

	-1	Del	TA	T	5255078-5255079	2,6%
GCR-0010 (HBG1)	4928	Del	Não mostrado	Não mostrado	5250151-5255079	43,6%
	1	Ins	A	AG	5250151-5250152	5,6%
	-4	Del	AGCTA	A	5250151-5250155	1,8%
	1	Ins	A	AA	5250151-5250152	1,6%
GCR-0010* (HBG2)	4928	Del	Não mostrado	Não mostrado	5250151-5255079	43,6%
	1	Ins	A	AG	5255079-5255080	5,7%
	-19	Del	CCCTTTA GCTAGTT TTCTTC (SEQ ID NO: 266)	A	5255073-5255092	2,6%
	-52	Del	GCCTTGT T.....TTCC CTTTA	G	5255027-5255079	2,0%
	-4	Del	TAGCT	T	5255078-5255082	1,5%
	-6	Del	TTTAGCT	T	5255076-5255082	1,5%
GCR-0048 (HBG1)	4928	Del	Não mostrado	Não mostrado	5250187-5255115	43,5%
	-1	Del	AC	A	5250187-5250188	40,0%
	-2	Del	ACT	A	5250187-5250189	10,1%
	-4	Del	ACTTC	A	5250187-5250191	5,2%
	1	Ins	A	AA	5250187-5250188	1,9%
	-1	Del	GA	G	5250186-5250187	2,1%
GCR-0048 (HBG2)	4928	Del	Não mostrado	Não mostrado	5250187-5255115	43,5%
	-1	Del	AC	A	5255115-5255116	42,4%
	-2	Del	ACT	A	5255115-5255117	8,9%
	-3	Del	ACTT	A	5255115-	2,7%

					5255118	
	-4	Del	ACTTC	A	5255115-5255119	2,5%
	-15	Del	GGACTTC TTTTGTC AG (SEQ ID NO: 267)	G	5255113-5255128	2,5%
GCR-0051* (HBG1)	4928	Del	Não mostrado	Não mostrado	5250150-5255078	44,9%
	1	Ins	T	TA	5250150-5250151	39,4%
	-1	Del	TA	A	5250150-5250151	1,3%
	-2	Del	AGC	A	5250151-5250153	0,7%
	-14	Del	TTAGCTA GTTTCCT T (SEQ ID NO: 268)	T	5250149-5250163	0,9%
	-6	Del	TTTAGCT	T	5250148-5250154	0,6%
GCR-0051 (HBG2)	4928	Del	Não mostrado	Não mostrado	5250150-5255078	44,9%
	1	Ins	T	TA	5255078-5255079	52,5%
	-19	Del	CCCTTTA GCTAGTT TTCTTC (SEQ ID NO: 269)	C	5255073-5255092	4,9%
	-2	Del	AGC	A	5255079-5255081	3,2%
	-4	Del	TAGCT	T	5255078-5255082	2,4%
	-1	Del	TA	T	5255078-5255079	2,2%
GCR-0067 (HBG1)	4928	Del	Não mostrado	Não mostrado	5250099-5255027	55,3%
	-6	Del	GCCTTTG	G	5250093-5250099	11,3%
	-1	Del	TG	T	5250098-5250099	9,4%
	-1	Del	GC	G	5250099-5250100	7,0%
	-5	Del	GCCTTG	G	5250099-	5,4%

					5250104	
	-2	Del	GCC	G	5250099-5250101	3,4%
GCR-0067 (HBG2)	4928	Del	Não mostrado	Não mostrado	5250099-5255027	55,3%
	-6	Del	GCCTTTG	G	5255021-5255027	36,1%
	-5	Del	GCCTTG	G	5255027-5255032	15,7%
	-1	Del	TG	T	5255026-5255027	4,0%
	-1	Del	GC	G	5255027-5255028	2,4%
	-2	Del	GCC	G	5255027-5255029	2,1%

[0942] Frequências de edição globais elevadas no locus da globina gama, incluindo elevadas frequências de grandes deleções de 4,9 kb entre os sítios de direcionamento do promotor HBG1 e HBG2, foram observadas após eletroporação de células com RNPs contendo sgRNA do domínio-alvo indicado. Os padrões de edição no alvo mostrados foram identificados em células que geraram células F aumentadas após a diferenciação eritroide, como descrito. Em modalidades, o padrão indel para qualquer molécula gRNA aqui descrito inclui 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 indels mais frequentes detectados no locus HBG1. Em modalidades, o padrão indel para qualquer molécula gRNA aqui descrito inclui 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 indels mais frequentes detectados no locus HBG2. Em modalidades, o padrão indel para qualquer molécula de gRNA aqui descrito inclui os 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 indels mais frequentes detectados no locus de HBG1 e os 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 indels mais frequentes detectados no locus HBG2, por exemplo, conforme descrito na Tabela 7-2 (mas não contando duas vezes a deleção de aproximadamente 4,9 kb).

Exemplo 2,4: Padrões de edição exemplificativos em subpopulações isoladas de HSPCs após edição da região promotora da globina gama

Métodos:

[0943] Os métodos são como no Exemplo 2,1, com as seguintes

modificações.

[0944] Cultura celular CD34⁺ humana. As células CD34⁺ humanas foram isoladas a partir de sangue periférico mobilizado G-CSF de doadores adultos (catálogo Hemacare #M001F-GCSF-3) utilizando imunoseleção (Miltenyi) de acordo com as instruções do fabricante e expandido durante 2 dias antes de eletroporação com os complexos de RNP.

[0945] Montagem de Cas9 e complexos de ribonucleoproteína (RNP) de RNA guia, preparação de HSPC e eletroporação de RNP em HSPC. Para formação de RNP usando RNAs guia simples (sgRNAs), 12 µg de cada de sgRNA, 12 µg de proteína CAS9 e 1 µL de tampão 10x CCE (20 mM HEPES, 100 mM KCL, 5 mM MgCL₂, 5% de Glicerol e DTT 1 mM recentemente adicionado foram combinados em um volume total de 10 uL, incubados a 37 °C por 5 min. A densidade celular em tampão P3 + suplemento foi de $1,3 \times 10^8$ /mL. Sete réplicas de eletroporações foram realizadas utilizando GCR-0067 e as células foram combinadas após eletroporação. Para a condição Nenhum/controle, as células foram transferidas diretamente do tampão P3 para meio de expansão sem eletroporação ou adição de Cas9. Após a eletroporação com complexos de RNP, as células foram expandidas durante mais 3 dias antes da citometria de fluxo de separação de células.

[0946] Separação de células por análise de citometria de fluxo da eficiência de edição em subpopulações de tronco e progenitoras hematopoiéticas. Culturas celulares editadas aos 3 dias após a eletroporação foram colhidas e incubadas com anti-CD34 (BD Biosciences, Cat# 348057), anti-CD38 (BD Biosciences, Cat# 560677), anti-CD90 (BD Biosciences, Cat# 559869), anti-CD45RA (BD Biosciences, Cat# 563963), anti-CD49f (BD Biosciences, Cat# 562598) em tampão de coloração de FACS que consiste em HBSS (GE Life

Sciences, Cat. #SH30588.01) suplementado com 2% de FBS (Omega Scientific, Cat. #FB-11) e 2mM EDTA (Corning Cat. #46-034-CL). As células foram lavadas com tampão de coloração de FACS, e a viabilidade celular foi determinada por adição de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Análise multicolor FACS foi realizada em um separador de células FACS Aria (BD Biosciences). A discriminação entre populações de células negativas e positivas foi determinada por classificações definidas através culturas de células de controle coradas, em que cada anticorpo foi substituído individualmente com um isotipo e anticorpo de controle não específico fluorocromo-conjugado (BD Biosciences Cat# 550854, 554680, 563437, 557872 e 562602). A pureza de células classificadas foi confirmada por verificação de pureza pós-classificação.

[0947] Preparação de DNA genômico e sequenciamento de próxima geração (NGS). O DNA genômico foi preparado a partir de HSPC não editada e subpopulações separadas de HSPC editadas em 3 dias pós-eletroporação utilizando o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Cat# 69504). A análise de NGS descrita abaixo não mostrou edição significativa em amostras de controle não editadas.

[0948] A preparação da biblioteca NGS e sequenciamento amplicon foi efetuado tal como descrito no Exemplo 2.1. A análise dos dados de sequenciamento NGS QC e da variante foi realizada como descrito no Exemplo 2.1.

[0949] Quantificação de grandes deleções. Grandes deleções entre sítios de direcionamento nos promotores de HBG1 e HBG2 foram quantificadas por PCR de gota digital (ddPCR) em formato de ensaio não competitivo para determinação do número de cópias de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, o gDNA foi combinado com ddPCR SuperMix para Sondas (sem dUTPs) (BioRad Cat #1863024), enzima de restrição HindIII-HF (NEB Cat #R3104S) e cada mistura de sonda de iniciador, transferida para um cartucho DG8

juntamente com o Óleo de Geração de Gotículas para Sondas (BioRad Cat #1863005) e gotículas geradas com um gerador de gotículas QX200 (BioRad). As gotículas foram sujeitas a PCR em um Termociclador Touch C1000 com Módulo de Reação de Poço Profundo-96 (BioRad), seguido de detecção com leitor de gotículas QX200 (BioRad). As cópias por μL foram determinadas por análise com o software QuantaSoft (BioRad). Um conjunto de sondas de iniciador personalizado (Life Technologies Cat #APZW76R, PN4331348, Iniciador direto: ACGGATAAGTAGATATTGAGGTAAGC (SEQ ID NO: 270), Iniciador reverso: GTCTCTTTCAGTTAGCAGTGG (SEQ ID NO: 271), FAM Sonda TaqMan: ACTGCGCTGAACTGTGGCTTTATAG (SEQ ID NO: 272)) usada para amplificar o gDNA dentro da região intergênica HBG1-HBG2. Utilizou-se um Ensaio de Referência de Número de Cópia TaqMan humano, RNase P (Thermo Fisher cat #4403326) como amplicon de referência. Cópias por μL para os amplicons HBG1-HBG2 e RNase P estavam dentro da faixa linear do fabricante. Percentagem de deleção foi relatada como 100% vezes 1 menos a razão de cópias por μL para HBG1-HBG2 e amplicons RNase P. Para amostras de controle não editadas calculou-se a percentagem de deleções até 13%, o que pode refletir o fundo do ensaio.

Resultados:

[0950] Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que a população HSPC CD34+ contenha células de vários potenciais para enxerto, auto-renovação e destino celular, com marcadores adicionais enriquecendo ainda mais em células com propriedades compartilhadas, incluindo enxerto de células-tronco hematopoiéticas de longo prazo (Notta, *Science*, 8 de julho de 2011;333(6039):218-21. doi: 10.1126/science.1201219; Huntsman, *Blood*. 24 de setembro de 2015;126(13):1631-3. doi: 10.1182/blood-2015-07-660670; cada um aqui incorporado por referência na sua totalidade). Sem estarem

limitados pela teoria, tais subpopulações podem ter um benefício terapêutico particular no transplante de células editadas por genes, uma vez que podem reconstituir o sistema hematopoiético em diferentes momentos após o transplante. Assim, as células foram submetidas a citometria de fluxo para caracterizar a eficiência de edição em subpopulações de HSPC. Cinco populações de células foram isoladas, primeiro células CD34+, seguidas por uma separação de 4 vias para células CD34+CD45RA-CD38+, CD34+CD45RA-CD38-CD90-CD49f+, CD34+CD45RA-CD38-CD90+CD49f+ e CD34+CD45RA-CD38-CD90-CD49f- usando a estratégia mostrada (Figura 11). Cada uma destas populações separadas foram analisadas para edição por sequenciamento individual das regiões localizadas no sítio-alvo HBG1 e HBG2, bem como por detecção da deleção da região HBG1-HBG2 interveniente. As frequências de deleção HBG1-HBG2 (isto é, excisão) foram consistentemente elevadas em subpopulações, variando de 69 a 81 por cento (Figura 12). A amplificação localizada no promotor HBG1 e HBG2, individualmente, e NGS foi usada para determinar a % de edição em cada sítio (pequenos indels). Alelos com inversões ou deleções causadas por direcionamento em ambos os promotores não seriam amplificados no ensaio. Dos alelos sem deleção ou inversão de HBG1-HBG2, a edição foi similarmente alta entre as subpopulações, variando de 53 a 73% para HBG1 e 75 a 91% para HBG2. A edição total mínima foi estimada combinando a percentagem de genomas deletados de HBG1-HBG2 com a percentagem de genomas não deletados de HBG1-HBG2 com edição em HBG2 (edição total mínima = % deleção mais % não deletada [100 menos % deleção, ignorando inversões] vezes a % editada em HBG2). Os indels pequenos localizados em HBG1 não foram incluídos, porque não pudemos determinar que proporção de % de edição em HBG1 era um alelo com indels localizados apenas em HBG1 e que proporção era um alelo com indels coexistentes

em HBG1 e HBG2. A edição total mínima foi estimada entre 92 e 97 por cento entre as subpopulações. Os padrões de edição para indels localizados nos sítios-alvo HBG1 e HBG2 também foram semelhantes entre sub-populações, com os padrões de edição mais frequentemente observados em subpopulações. Para todas as subpopulações e cada sítio, HBG1 ou HBG2, os três principais padrões de indel incluíram uma deleção de 6 pb, uma deleção de 5 pb e uma deleção de 1 pb (Figura 13A (locus HBG1); Figura 13B (locus HBG2)). Em resumo, as frequências e padrões de edição consistentes entre HSPC total e subfrações, incluindo células-tronco hematopoiéticas de longo prazo CD34+CD45RA-CD38-CD90+CD49f+ definidas, suportam a utilidade da abordagem de edição de genes aqui descrita para transplante de HSPC.

Exemplo 2,5: Capacidade de formação de colônias de HSPCs após edição da região promotora da globina gama

Métodos:

[0951] Os métodos são como no Exemplo 2,1, com as seguintes modificações.

[0952] Cultura celular CD34⁺ humana. As células CD34⁺ humanas foram derivadas da medula óssea de doadores adultos saudáveis (catálogo Lonza #2M-101D). As células foram descongeladas, depois expandidas durante 2 dias antes da eletroporação com complexos de RNP.

[0953] Montagem de Cas9 e complexos de ribonucleoproteína (RNP) de RNA guia, preparação de HSPC e eletroporação de RNP em HSPC. Para formação de RNP usando RNAs guia simples (sgRNAs), 12 µg de cada de sgRNA, 12 µg de proteína CAS9 e 1 µL de tampão 10x CCE (20 mM HEPES, 100 mM KCL, 5 mM MgCL₂, 5% de Glicerol e DTT 1 mM recentemente adicionado foram combinados em um volume total de 10 uL, incubados a 37 °C por 5 min. A densidade celular

em tampão P3 + suplemento foi de $6,64 \times 10^6$ /mL. Duas réplicas de eletroporação foram realizadas com células de cada um dos dois doadores independentes. Para a condição Nenhum/controle, o veículo em vez do sgRNA foi adicionado. Após a eletroporação com complexos RNP, as células retornaram ao meio de expansão.

[0954] Preparação de DNA genômico e sequenciamento de próxima geração (NGS). O DNA genômico foi preparado a partir de HSPC não editada e subpopulações separadas de HSPC editadas em 3 dias pós-eletroporação utilizando o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Cat# 69504). A análise de NGS descrita abaixo não mostrou edição significativa em amostras de controle eletroporadas com Cas9 sozinho.

[0955] A preparação da biblioteca NGS e sequenciamento dos produtos de amplificação foi efetuado tal como descrito no Exemplo 2.1. A análise dos dados de sequenciamento NGS QC e da variante foi realizada como descrito no Exemplo 2.1.

[0956] Quantificação de grandes deleções. Grandes deleções entre sítios de direcionamento nos promotores de HBG1 e HBG2 foram quantificadas por PCR de gota digital (ddPCR) em formato de ensaio não competitivo para determinação do número de cópias de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, o gDNA foi combinado com ddPCR SuperMix para Sondas (sem dUTPs) (BioRad Cat #1863024), enzima de restrição HindIII-HF (NEB Cat #R3104S) e cada mistura de sonda de iniciador, transferida para um cartucho DG8 juntamente com o Óleo de Geração de Gotículas para Sondas (BioRad Cat #1863005) e gotículas geradas com um gerador de gotículas QX200 (BioRad). As gotículas foram sujeitas a PCR em um Termociclador Touch C1000 com Módulo de Reação de Poço Profundo-96 (BioRad), seguido de detecção com leitor de gotículas QX200 (BioRad). As cópias por uL foram determinadas por análise com o software QuantaSoft

(BioRad). Um conjunto de sondas de iniciador personalizado (Life Technologies Cat #APZW76R, PN4331348, Iniciador direto: ACGGATAAGTAGATATTGAGGTAAGC (SEQ ID NO: 273), Iniciador reverso: GTCTCTTTCAGTTAGCAGTGG (SEQ ID NO: 274), FAM Sonda TaqMan: ACTGCGCTGAACTGTGGCTTTATAG (SEQ ID NO: 275)) usada para amplificar o gDNA dentro da região intergênica HBG1-HBG2. Utilizou-se um Ensaio de Referência de Número de Cópia TaqMan humano, RNase P (Thermo Fisher cat #4403326) como amplicon de referência. Cópias por μL para os amplicons HBG1-HBG2 e RNase P estavam dentro da faixa linear do fabricante. Percentagem de deleção foi relatada como 100% vezes 1 menos a razão de cópias por μL para HBG1-HBG2 e amplicons RNase P. Para amostras de controle não editadas calculou-se a percentagem de deleções até 9%, o que pode refletir o fundo do ensaio.

[0957] Ensaio unitário de célula formadora de colônia. Dois dias após a entrega de RNP, as células viáveis foram enumeradas por citometria de fluxo em uma LSRFortessa (BD Biosciences) utilizando tubos TruCount (BD Biosciences Cat# 340334) de acordo com as recomendações do fabricante. As células inviáveis foram discriminadas usando DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). A análise foi realizada usando o software FlowJo (Tree Star). Para o ensaio de unidade formadora de colônias (CFU), células e 1x antibiótico/antimicótico (Gibco, Cat. # 10378-016) foram adicionados ao meio de metilcelulose MethoCult H4034 Optimum (Stemcell Technologies) e 1 mL foi plaqueado em triplicado em placas SmartDish (StemCell Technologies). As placas de cultura foram incubadas em uma incubadora umidificada a 37 °C. As culturas foram visualizadas no dia 14 pós-plaqueamento usando uma StemVision (Stemcell Technologies). As colônias foram marcadas manualmente usando o software Colony Marker (Stemcell Technologies). O número de colônias por poço (média de três poços) foi

dividido pelo número de células plaqueadas por mL de Methocult (variou de 226 a 318) e multiplicado por 1000 para obter a frequência de CFU por 1000 células.

Resultados:

[0958] Mostramos aqui que as HSPCs funcionam no ensaio de formação de colônias após o ruptura direcionada de sequências específicas dentro das regiões promotoras de HBG1 e HBG2 associadas à produção de células F. HSPC editada e não editada no genoma foram avaliadas quanto à composição de células progenitoras e potencial de diferenciação usando um ensaio unitário de formação de colônia. As colônias foram contadas e classificadas como derivadas de células progenitoras eritroides (CFU-eritroide [CFU-E] e unidade eritroide formadora de ruptura [BFU-E]), células progenitoras granulócitos e/ou macrófagos (CFU-granulócitos, macrófagos [CFU-GM]; CFU-granulócitos [CFU-G]; e CFU-macrófagos [CFU-M]), ou células progenitoras com múltiplos potenciais (CFU-granulócitos, eritrócitos, macrófagos, megacariócitos [CFU-GEMM]).

Tabela 8 Lista de gRNAs selecionados com direcionamento na região promotora de HBG1 e HBG2 usada no estudo atual para editar células do primeiro doador independente.

ID do do mínio de direciona mento RNA guia	% HBG1 editado	% HBG2 editado	% dele ção de HBG1- HBG2	% edi ção aprox. min.	BFU- E/CFU- E por 1000 células	CFU- G/M/GM por 1000 células	CFU- GEMM por 1000 células	Total de colô nias por 1000 células
Nenhum/ Controle	n/a	n/a	8,6	n/a	48	162	3	213
GCR-0008	80,7	78,9	42,6	88,9	18	134	2	154
GCR-0010	34,9	18,0	29,5	54,1	25	118	4	148
GCR-0048	81,4	84,0	40,6	90,5	28	130	0	158
GCR-0051	51,0	74,9	41,2	85,2	28	133	2	164
GCR-0067	82,9	88,6	51,3	94,4	25	123	5	153

[0959] Tabela 9. Lista de gRNAs selecionados com direcionamento na região promotora de HBG1 e HBG2 usada no estudo atual para editar células do segundo doador independente.

ID do domínio de direcionamento do RNA guia	% HBG1 editado	% HBG2 editado	% deleção de HBG1-HBG2	% edição aprox. min.	BFU-E/CFU-E por 1000 células	CFU-G/M/GM por 1000 células	CFU-GEMM por 1000 células	Total de colônias por 1000 células
Nenhum/Controle	n/a	n/a	8,9	n/a	90	241	12	343
GCR-0008	82,3	85,2	47,0	92,1	51	151	4	206
GCR-0010	42,3	35,1	43,0	67,1	56	162	5	223
GCR-0048	68,7	76,1	41,7	86,0	49	129	7	186
GCR-0051	55,2	82,7	41,3	89,9	32	157	6	196
GCR-0067	81,2	88,9	47,1	94,1	39	169	9	217

[0960] Ambos os doadores eletroporados com RNPs com os gRNAs indicados tiveram edição eficiente, ambos os indels localizados nos sítios-alvo/não alvo do promotor HBG1 e HBG2, bem como deleções da região interveniente (Tabelas 8 e 9). As culturas editadas foram associadas a uma queda na capacidade geral de formação de colônias (Tabelas 8 e 9), possivelmente indicando diminuição da aptidão das células submetidas à edição. Apesar dessa redução no número total de colônias, todas as colônias eritroides, granulócitos/macrófagos e multi-potenciais foram todas observadas em pelo menos um doador (Tabelas 8 e 9). Além disso, houve diferenças mínimas na proporção de tipos de colônia entre amostras não editadas e editadas (Figura 14), indicando que as culturas de células editadas nesses sítios-alvo não tinham capacidade de diferenciação distorcida.

Exemplo 2,6: Proliferação celular de HSPCs in vitro após edição da região promotora da globina gama

Métodos:

[0961] Os métodos são como no Exemplo 2,1, com as seguintes

modificações.

[0962] Cultura celular CD34⁺ humana. As células CD34⁺ humanas foram derivadas da medula óssea de doadores adultos saudáveis (catálogo Lonza #2M-101D e catálogo Hemacare #BM34-C). As células foram descongeladas, depois expandidas durante 2 dias antes da eletroporação com complexos de RNP.

[0963] Montagem de Cas9 e complexos de ribonucleoproteína (RNP) de RNA guia, preparação de HSPC e eletroporação de RNP em HSPC. Para formação de RNP usando RNAs guia simples (sgRNAs), 12 µg de cada de sgRNA, 12 µg de proteína CAS9 e 1 µL de tampão 10x CCE (20 mM HEPES, 100 mM KCL, 5 mM MgCL₂, 5% de Glicerol e DTT 1 mM recentemente adicionado) foram combinados em um volume total de 10 uL, incubados a 37 °C por 5 min. A densidade celular em tampão P3 + suplemento foi de 1×10^7 a $2,5 \times 10^7$ /mL. Uma réplica de eletroporação foi realizada com células de cada um dos três doadores independentes. Para a condição Nenhum/controle, o veículo em vez do sgRNA foi adicionado. Após a eletroporação com complexos RNP, as células retornaram ao meio de expansão.

[0964] Preparação de DNA genômico e sequenciamento de próxima geração (NGS). O DNA genômico foi preparado a partir de HSPC não editada e editada aos 3 dias após a eletroporação utilizando Solução Extractora Quick Extract de DNA (Epicenter Cat# QE09050) ou a análise NGS do DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Cat# 69504) descrita abaixo, não apresentou edição significativa nas amostras de controle eletroporadas com Cas9 sozinho.

[0965] A preparação da biblioteca NGS e sequenciamento dos produtos de amplificação foi efetuado tal como descrito no Exemplo 2.1. A análise dos dados de sequenciamento NGS QC e da variante foi realizada como descrito no Exemplo 2.1.

[0966] Proliferação celular e fenotipagem. Dois dias após a entrega

de RNP, as células viáveis foram enumeradas por citometria de fluxo em uma LSRFortessa (BD Biosciences) utilizando tubos TruCount (BD Biosciences Cat# 340334) de acordo com as recomendações do fabricante. As células inviáveis foram discriminadas utilizando DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), e o conteúdo de células CD34⁺ e CD34⁺CD90⁺ foi determinado por inclusão de anti-CD34 (BD Biosciences Cat# 348057, BD Biosciences Cat# 340666 ou eBioscience Cat# 25-0349-425) e anti-CD90 (BD Biosciences Cat# 559869) em tampão de coloração FACS consistindo em HBSS (GE Life Sciences Cat. #SH30588.01) suplementado com 2% de FBS (Omega Scientific, Cat. #FB-11) e 2mM EDTA (Corning Cat. #46-034-CL). A análise foi realizada usando o software FlowJo (Tree Star). As células foram então semeadas em meio de expansão a $2,0 \times 10^4$ ou $1,0 \times 10^5$ células viáveis/mL e cultivadas durante 7 dias. Para culturas semeadas a $1,0 \times 10^5$ /mL, foi adicionado meio fresco durante o período de cultura para uma diluição de 3 ou 4 vezes. Após 7 dias de cultura, as células foram novamente enumeradas como acima. Após 7 dias de cultura, as células foram adicionalmente analisadas quanto à expressão do marcador de superfície após coloração com os seguintes painéis de anticorpos. Painel 1: Anticorpos específicos para CD38 (conjugado FITC, BD Biosciences N.º 340926, clone HB7), epítipo 1 de CD133 (conjugado PE, Miltenyi N.º 130-080-801, clone AC133), CD34 (conjugado PerCP, BD Biosciences N.º 340666, clone 8G12), CD90 (conjugado APC, BD Biosciences N.º 559869, clone 5E10), CD45RA (conjugado Pe-Cy7, eBioscience N.º 25-0458-42, clone HI100). Painel 2: CD34 (conjugado PerCP, BD Biosciences N.º 340666, clone 8G12), CD33 (conjugado PE-Cy7, BD Biosciences N.º 333946, clone P67.6), CD14 (conjugado APC-H7, BD Biosciences N.º 560270, clone MφP9) CD15 (conjugado PE, Biolegend N.º 301905, clone HI98). Painel 3: CD34 (PerCP-conjugado, BD Biosciences N.º 340666, clone 8G12), CD41a (conjugado APC-H7,

BD Biosciences N.º 561422, clone HIP8), CD71 (conjugado FITC, BD Biosciences N.º 555536, clone M-A712), CD19 (conjugado PE, BD Biosciences N.º 340720, clone SJ25C1), CD56 (conjugado APC, Biolegend N.º 318310, clone HCD56). Painéis de anticorpos de controle de isotipo correspondentes foram usados para corar culturas em paralelo. As células inviáveis foram discriminadas por coloração com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). As amostras coradas foram analisadas em um citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences) para expressão da proteína na superfície celular. Os resultados foram analisados usando Flowjo e os dados foram apresentados como a % da população celular viável negativa em DAPI.

Resultados:

[0967] Mostramos aqui que as HSPCs podem expandir-se com composição celular típica in vitro após a ruptura direcionada de sequências específicas dentro das regiões promotoras de HBG1 e HBG2 associadas à produção de células F. HSPC editadas e não editadas pelo genoma foram avaliadas quanto à capacidade de proliferação e composição celular em condições de cultura que promovem a expansão de HSPC. Réplicas doadores independentes eletroporadas com RNPs contendo GCR-0067 tiveram edição eficiente (Tabela 9-2).

Tabela 9-2. Percentagem de amplicons editados da região promotora HBG1 ou HBG2 em células de três doadores independentes usando o gRNA indicado.

ID do domínio-alvo do RNA guia	% HBG1 editado, doador A	% HBG2 editado, doador A	% HBG1 editado, doador B	% HBG2 editado, doador B	% HBG1 editado, doador C	% HBG2 editado, doador C
GCR-0067	62,7	64,5	57,0	73,4	53,1	56,9

[0968] Culturas editadas foram associadas a uma queda na

capacidade de proliferação global, possivelmente indicando uma diminuição da aptidão das células em edição, embora isso não tenha alcançado significância sobre três doadores de células independentes (Figura 15). Observaram-se reduções semelhantes dentro da população CD34+CD90+ enriquecida em células-tronco hematopoiéticas, tal como na população CD34+ total, indicando que esta população não é afectada diferencialmente (Figura 15). Sob essas condições de cultura, espera-se que tanto HSPC quanto a progênie diferenciada estejam presentes, assim, a composição celular foi ainda analisada para a expressão de um painel mais abrangente de marcadores de superfície celular. A discriminação dessas populações de células é exemplificada na Figura 16. A composição celular foi semelhante entre culturas editadas e não editadas no genoma através de três doadores de células independentes, sem diferença significativa em uma dada população pelo teste t não-pareado (Figura 17). As grandes barras de erro para a população CD33+ resultam de um único doador com células CD33+ insignificantes nas culturas editadas e não editadas no genoma (Figura 17).

Exemplo 3: Avaliação de Variantes Cas9

Avaliação em células-tronco hematopoiéticas CD34+

[0969] Foram avaliadas 14 proteínas Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SPyCas9) purificadas, medindo-se a sua eficiência de inativação do gene da beta-2-microglobulina (B2M) em células-tronco hematopoiéticas humanas primárias (HSCs). Estas proteínas foram divididas em 3 grupos: o primeiro grupo consistiu em variantes SPyCas9 com seletividade melhorada (Slaymaker et al. 2015, Science 351: 84 (e1.0, e1.1 e K855A); Kleinstiver et al. 2016, Nature 529: 490 (HF)). O segundo grupo consistia em SPyCas9 do tipo selvagem com diferentes números e/ou posições do sinal de localização nuclear do SV40 (NLS) e o marcador 6xHistidina (His6) (SEQ ID NO: 247) ou 8xHistidina (His8)

(SEQ ID NO: 248) com ou sem um sítio clivável TEV, e uma proteína SPyCas9 com duas substituições de cisteína (C80L, C574E), que têm sido relatadas para estabilizar Cas9 para estudos estruturais (Nishimasu et al 2014, Cell. 156:935). O terceiro grupo consistiu no mesmo SPyCas9 recombinante produzido por diferentes processos (Figura 6). A inativação de B2M foi determinada por FACS e sequenciamento de próxima geração (NGS).

Métodos

Materiais

1. Instrumento de eletroporação de Neon (Invitrogen, MPK5000)
2. Kit de eletroporação de Neon (Invitrogen, MPK1025)
3. crRNA (sequência do domínio-alvo de GGCCACGGAGCGAGACAUCU (SEQ ID NO: 276), complementar a uma sequência no gene B2M, fundida com a SEQ ID NO: 201)
4. tracrRNA (SEQ ID NO: 224)
5. Tampão de armazenamento de Cas9: Tris-Cl 20 mM, pH 8,0, KCl 200 mM, MgCl₂ 10 mM
6. HSCs CD34+ derivadas da medula óssea (Lonza, 2M-101C)
7. Meios de cultura celular (Stemcell Technologies, StemSpam SFEM II com StemSpam CC-100)
8. Tampão de lavagem FACS: 2% FCS em PBS
9. Tampão de bloqueio FACS: por mL de PBS, adicionar 0,5 ug de IgG de camundongo, 150 ug de bloqueador Fc, 20 uL de FCS
10. Suspensão Chelex: 10% Chelex 100 (bioRad, Cat N.º 142-1253) em H₂O
11. Anticorpo Anti-B2M: Biolegend, cat# 316304

Processo

[0970] Descongelar e cultivar as células seguindo as recomendações de Lonza, adicione meio a cada 2 ou 3 dias. No dia 5, sedimentar as células a 200 x g durante 15 min, lavar uma vez com PBS,

ressuspender as células com tampão T do kit NEON a $2 \times 10^4/\mu\text{L}$, colocar em gelo. Diluir a proteína Cas 9 com tampão de armazenamento Cas9 a 5 mg/mL. Reconstituir crRNA e tracrRNA para 100 uM com H_2O . O complexo de ribonucleoproteína (RNP) é feito misturando 0,8 μL cada de proteína CAS9, crRNA e tracrRNA com 0,6 μL de tampão de armazenamento Cas9, incubar à temperatura ambiente por 10 min. Misturar 7 μL de HSCs com o complexo RNP durante dois minutos e transferir os 10 μL inteiros para uma ponta de pipeta Neon, eletroporar a 1700 v, 20 ms e 1 pulso. Após a eletroporação, transferir imediatamente as células para um poço de placa de 24 poços contendo 1 mL de meio pré-calibrado a 37°C , 5% de CO_2 . Recolher células 72 horas pós-eletroporação para análise por FACS e NGS.

[0971] FACS: retirar 250 μL das células de cada poço da placa de 24 poços, para placa de 96 poços de fundo em U e sedimentar as células. Lavar uma vez com FCS a 2% (soro fetal de vitelo) -PBS. Adicionar 50 uL tampão de bloqueio FACS para as células e incubar em gelo durante 10 minutos, adicionar 1 uL de anticorpo B2M marcado com FITC e incubar durante 30 minutos. Lavar com 150 uL de tampão de lavagem FACS uma vez seguido por mais uma vez com 200 uL de tampão de lavagem FACS uma vez. As células foram ressuspensas em 200 uL de tampão FACS de análise FACS.

[0972] Preparação da amostra NGS: transferir 250 uL de suspensão celular de cada poço da placa de 24 poços para um tubo Eppendorf de 1,5 mL, adicionar 1 mL de PBS e sedimentar as células. Adicionar 100 μL de suspensão Chelex, incubar a 99°C durante 8 minutos e agitar durante 10 segundos, seguido de incubação a 99°C durante 8 minutos, vortex durante 10 segundos. Sedimentar a resina por centrifugação a $10.000 \times g$ durante 3 minutos e o sobrenadante lisado é usado para PCR. Retirar 4 uL de lisado e realizar a reação de PCR com os iniciadores b2m (b2mg67F: CAGACAGCAAACCTCACCCAGT (SEQ ID

NO: 277), b2mg67R: CTGACGCTTATCGACGCCCT (SEQ ID NO: 278)) usando o kit Titanium (Clontech, cat# 639208) e seguir as instruções do fabricante. As seguintes condições de PCR são usadas: 5 minutos a 98 °C durante 1 ciclo; 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 62 °C e 1 minuto a 72 °C durante 30 ciclos; e finalmente 3 minutos a 72 °C durante 1 ciclo. O produto de PCR foi usado para NGS.

[0973] A preparação da biblioteca NGS e sequenciamento dos produtos de amplificação foi efetuado tal como descrito no Exemplo 2.1. A análise dos dados de sequenciamento NGS QC e da variante foi realizada como descrito no Exemplo 2.1.

[0974] Estatísticas: A percentagem de células B2M KO por FACS e a percentagem de indels por NGS são usadas para avaliar a eficácia de clivagem CAS 9. A experiência foi criada com Cas9 como efeito fixo. Cada experiência é encaixada dentro de doadores, como efeitos aleatórios encaixados. Portanto, o modelo linear misto foi aplicado para a análise dos dados FACS e NGS.

Resultados

[0975] De modo a normalizar as variações experimentais e do dador, representamos graficamente a atividade relativa de cada proteína para iProt105026, a criação original com dois SV40 NLS flanqueando o tipo selvagem SPyCas9 e o marcador His6 (SEQ ID NO: 247) no terminal C da proteína (Figura 6). A análise estatística mostra que em comparação com a proteína Cas9 de referência iProt105026, iProt106331, iProt106518, iProt106520 e iProt106521 não são significativamente diferentes na inativação de B2M em HSCs, enquanto as outras variantes testadas (PID426303, iProt106519, iProt106522, iProt106545, iProt106658, iProt106745, iProt106746, iProt106747, iProt106884) são altamente significativamente diferentes da referência iProt105026 em inativar B2M em HSCs. Descobrimos que movendo o marcador His6 (SEQ ID NO: 247) do terminal C para o terminal N

(iProt106520) não afetou a atividade da proteína (Figura 6). Um NLS foi suficiente para manter a atividade apenas quando foi colocado no terminal C da proteína (iProt106521 vs. iProt106522, Figura 6). As proteínas purificadas do processo 1 tiveram uma eficiência de inativação mais consistente do que as dos processos 2 e 3 (iProt106331 vs. iProt106545 & PID426303, Figura 6). Em geral, as variantes SPyCas9 com uma seletividade melhorada relatada não foram tão ativas como as SPyCas9 do tipo selvagem (iProt106745, iProt106746 e iProt106747, Figura 6). Curiosamente iProt106884 não cortou o sítio de direcionamento. Isso é consistente com o relatório de Kleinstiver et al que essa variante não conseguiu cortar até 20% dos sítios-alvo legítimos em células de mamíferos (Kleinstiver et al., 2016, Nature 529: 490). Finalmente, a variante Cas9 com duas substituições de cisteína (iProt106518) manteve elevados níveis de atividade enzimática (Figura 6).

Exemplo 4. Quantificação de alterações na subunidade da hemoglobina após edição de genes por espectrometria de massa por eletroforese capilar

[0976] Após a edição de genes das HSCs, além de capturar a produção de hemoglobina fetal por citometria de fluxo, as alterações nas subunidades individuais de hemoglobina nas células eritroides foram também medidas por espectrometria de massa por eletroforese capilar (CE-MS). As células CD34+ derivadas do sangue periférico de pacientes com células falciformes foram ou não editadas na presença da proteína Cas9 (com dois NLS e um marcador His, iProt106331) e sem RNA guia, ou editadas por genes na presença da proteína Cas9 e RNA guia sg0067, e diferenciadas em linhagem eritroide em cultura como descrito anteriormente. No dia 14 da diferenciação eritroide, o mesmo número de células de cada condição foi corado com anticorpo conjugado com FITC reconhecendo hemoglobina fetal (HbF), e as

células foram submetidas a citometria de fluxo para quantificar a indução de HbF após a edição genética. A citometria de fluxo reportou 30-50% de regulação positiva de células HbF+ (Tabela 10). Paralelamente, quantidades variadas de células eritroides (6, 12, 66 e 99 milhões) por condição foram colhidas e submetidas a CE-MS para quantificar globina alfa, globina beta normal (HbB), globina beta falciforme (HbS) e as subunidades da globina gama fetal (HbF) e os dados foram normalizados com a quantidade de células de entrada. CE-MS foi capaz de detectar todas as subunidades de globina na concentração de apenas 600 células/uL. Os resultados mostraram que as amostras de pacientes com anemia falciforme editada tiveram um aumento de ~40% na globina gama e uma diminuição concomitante de 50% na globina beta falciforme (Figura 18).

Tabela 10 Descrição do tratamento e quantidade de células das amostras submetidas à quantificação CE-MS das subunidades da globina. A expressão de hemoglobina fetal destas amostras também foi medida por citometria de fluxo usando anticorpo anti-HbF conjugado a um fluoróforo.

ID do doador	ID de Amostra	Descrição da Amostra	Número de Células (1 x 10e6)	Células HbF + Medidas por Citometria de Fluxo (%)
Paciente de células falciformes 1	1	Simulado editado, sem sgRNA, eritroide diferenciada	99,2	55,5
	2	Gene editado com sg0067, eritroide diferenciada	66,6	81,15
Paciente de células falciformes 2	3	Simulado editado, sem sgRNA, eritroide diferenciada	12,6	59,70
	4	Gene editado com sg0067, eritroide diferenciada	5,5	81,85

Exemplo 5. Células-tronco hematopoiéticas (HSCs) editadas por genes foram capazes de enxertar a longo prazo e apoiar a

reconstituição de múltiplas linhagens

[0977] Para avaliar a função das células-tronco de HSCs editadas por genes, HSCs humanas editadas foram transplantadas em camundongos imunocomprometidos para examinar a regeneração hematopoiética a longo prazo. Quinhentas mil células CD34+ humanas derivadas da medula óssea foram descongeladas no dia 0, eletroporadas no dia 3 com um complexo RNP simulado (Cas9 sozinho e sem gRNA) ou complexo RNP formado com Cas9 e sgRNA compreendendo o domínio-alvo de CR001128 (algumas vezes referido para aqui em sg1128) AUCAGAGGCCAAACCCUUCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 181), que compreende a sequência de domínio-alvo de AUCAGAGGCCAAACCCUUCC (SEQ ID NO: 180)). As células foram subsequentemente mantidas com a mesma concentração e meio descrito no Exemplo 2.1, e no dia 6 de cultura, todas as células de cada tratamento foram transplantadas em 2 camundongos Grey subletalmente irradiados NOD.Cg-*Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}*/SzJ (NSG) (Figura 19). Observamos aproximadamente 30-40% de enxerto de células humanas na medula óssea dos receptores às 16 semanas pós-transplante. Além disso, esse nível de enxerto foi comparável ao controle simulado do tratamento, sugerindo que a edição de genes não prejudica a habilidade de longo prazo do enxerto de HSCs (Figura 20). As HSC transplantadas, editadas por genes, sustentaram a regeneração das células mielóides normais, linfóides B e linfóides T às 4, 8, 12, 16 semanas após o transplante (Figura 21). Estes dados demonstram que as HSCs editadas por genes foram capazes de enxerto a longo prazo e suportam a reconstituição normal de múltiplas linhagens, incluindo até 16 semanas após o transplante.

Exemplo 6. HSCs enxertadas, de longo prazo e editadas por genes, foram capazes de sustentar a produção de hemoglobina fetal (HbF)

[0978] Em um estudo separado, avaliamos a função de células-tronco de HSCs editadas com gRNAs da região do promotor da globina gama (sg-G0008, sg-G0051, sg-G0010, sg-G0048, sg-G0067 na Tabela 11) em comparação para gRNA da região intensificadora específica do eritroide do gene BCL11A (sg-G1128). As HSCs humanas editadas com estes gRNAs foram transplantadas em camundongos NSG imunocomprometidos para examinar a regeneração hematopoiética (Figura 22).

Tabela 11 RNAs guia usados no estudo de transplante, concebidos para atingir a região promotora da globina gama.

Nome de gRNA	ID do Domínio-alvo	ID do crRNA	Sequência do domínio de alvo de gRNA	Sequência 100mer sgRNA
sg-G0008	GCR-0008	CR005821	GGAGAAGGAAACUA GCUAAA (SEQ ID NO: 8)	GGAGAAGGAAACUAGCUAA AGUUUUAGAGCUAGAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU (SEQ ID NO: 84)
sg-G0010	GCR-0010	CR005823	GGGAGAAGGAAACU AGCUAA (SEQ ID NO: 10)	GGGAGAAGGAAACUAGCUA AGUUUUAGAGCUAGAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU (SEQ ID NO: 94)
sg-G0048	GCR-0048	CR005811	ACGGCUGACAAAAG AAGUCC (SEQ ID NO: 48)	ACGGCUGACAAAAGAAGUC CGUUUUAGAGCUAGAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU (SEQ ID NO: 134)
sg-G0051	GCR-0051	CR005813	GGAGAAGAAAACUA GCUAAA (SEQ ID NO: 51)	GGAGAAGAAAACUAGCUAA AGUUUUAGAGCUAGAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU (SEQ ID NO: 144)
sg-G0067	GCR-0067	CR005820	ACUGAAUCGGAACAA GGCAA (SEQ ID NO: 67)	ACUGAAUCGGAACAAGGCA AGUUUUAGAGCUAGAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU (SEQ ID NO: 174)

Procedimentos Experimentais

Descongelamento e cultura de CD34+

[0979] As células CD34+ da medula óssea foram descongeladas e cultivadas. Cada frasco de 1 milhão de células CD34+ de medula óssea foi removido do nitrogênio líquido, pulverizado com etanol a 70% e descongelado rapidamente em um banho de água a 37 °C até ficar um pequeno sedimento de gelo. O frasco foi pulverizado com etanol a 70% e esfregado. Usando uma pipeta de 5 mL, o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo falcon de 50 mL. O criotubo foi lavado uma vez com 1 mL de IMDM pré-aquecido, 10% de FBS e adicionado gota a gota ao tubo falcon de 50 mL; 25 mL de IMDM pré-aquecido, FBS a 10% foi lentamente adicionada ao longo de 2 min para as células, agitando suavemente para misturar. As células foram centrifugadas a 300g por 10min. Vinte e oito milhões de células CD34+ foram cultivadas em StemSpan SFEM + 100 ng/ml SCF/IL6/Flt3L/TPO + 500 nM Composto 4 + 1X Pen/Strep a 0,2-0,5 x 10⁶ células/mL.

Eletroporação RNP

[0980] Quarenta e oito horas pós-descongelação, as células foram eletroporadas com 1) apenas Cas9; ou 2) complexo Cas9 RNP contendo sg1128 (como descrito acima), ou um dos sgRNAs na Tabela 11. Resumidamente, RNP foi preparado usando uma proporção molar de 1:2 de proteína Cas9 para sgRNA resultando em uma mistura RNP com 10 uM de Cas9 e 20 uM de sgRNA. Adicionaram-se 5 uL de 10 uM de RNP a 1 milhão de células CD34+ em 20 uL de tampão P3 (Lonza). 22 uL da mistura eletroporação foi transferido para um poço de uma placa de 96 poços de eletroporação e eletroporados usando o Lonza Amaxa Shuttle de 96 poços ou Lonza Nucleofector System, programa de CA-137. Imediatamente após a eletroporação, 80 uL de meios de cultura (StemSpan SFEM + 100 ng/mL SCF/IL6/Flt3L/TPO + 500 nM Composto 4 + 1X Pen/Strep) foi adicionado à amostra a eletroporação.

[0981] Vinte e quatro horas após a eletroporação, 500 K equivalentes de células de partida foram transplantadas por

camundongo. 30.000-100.000 células foram utilizadas para a diferenciação eritroide para avaliar a pós-edição de indução de HbF. As células remanescentes foram deixadas em cultura por mais 24 horas (48 horas pós-eletroporação total) para análise de frequência de edição de NGS.

Transplante

[0982] Dez camundongos NSG/patologia foram irradiados 4-24 h antes do transplante com 200 Rad utilizando o irradiador de raios X RadSource, ou 2 Gray usando um irradiador de césio138. Quinhentos mil equivalentes de células iniciais foram transplantados por camundongo através da injeção na veia da cauda. Após o transplante, os camundongos foram colocados em um regime antibiótico por 4-8 semanas. Os camundongos foram tratados de acordo com os procedimentos de cuidados animais dos institutos e seguindo o protocolo IACUC aprovado. Às 4, 8, 12, 16 e 20 semanas, o sangue periférico foi coletado para enxerto e análise de linhagem através da veia caudal. Às 8-9 semanas e 20 semanas, a medula óssea foi coletada para análise (citometria de fluxo, Taqman qPCR e NGS conforme descrito em protocolos anteriores, por exemplo, Exemplo 2.1) bem como para separação de células hCD45+CD34+ para diferenciação eritroide como descrito nos protocolos anteriores. Na semana 20, a separação de célula hCD45+CD34+ e diferenciação eritroide foram realizados.

[0983] A figura 22 mostra o diagrama esquemático do estudo de transplante para avaliar a função de células-tronco de HSCs editadas com sgRNAs da região promotora da globina gama (sg-G0008, sg-G0051, sg-G0010, sg-G0048, sg-G0067) em comparação ao gRNA do região intensificadora específica de eritroide do gene BCL11A (sg-G1128; também referido como sg1128). Quinhentas mil células CD34+ humanas foram descongeladas no dia 0, eletroporadas com um complexo RNP simulado (apenas Cas9 e sem gRNA) ou com o

complexo RNP formado com Cas9 (NLS-Cas9-NLS-His6 ("His6" divulgada como SEQ ID NO: 247)) e vários gRNAs no dia 3. No dia 6, todas as células de cada condição foram colhidas e transplantadas para camundongos NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}//2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) irradiados subletalmente com 2 Gy (Figura 22). Os camundongos foram sangrados às 4, 8, 12, 16 e 20 semanas após o transplante. Às 8 e 20 semanas após o transplante, as células da medula óssea dos animais foram também colhidas para examinar o enxerto de células humanas na medula óssea.

Resultados

A edição de HSCs foi capaz de enxertar a longo prazo e apoiar a diferenciação de múltiplas linhagens em camundongos NSG

[0984] Os resultados mostraram que os sgRNAs da região promotora da globina gama alcançaram, em média, 20-40% de enxerto de medula óssea às 8 semanas após o transplante, comparável ao sg-G1128. Embora o enxerto em pontos de tempo inicial possa ser contribuído por células progenitoras hematopoiéticas de vida curta, o enxerto em pontos de tempo mais longos (20 semanas) é prova de reconstituição por HSCs de longo prazo. Os sgRNAs testados mostraram 5-22% de enxerto de medula óssea 20 semanas após o transplante (Figura 23A-F e 24A e 24B). É importante notar que injetamos apenas ~500.000 células CD34+ simuladas ou genômicas em cada camundongo para atingir esse nível de enxerto. Esse nível de enxerto foi comparável a outros estudos que transplantaram 1 milhão de células CD34+ editadas pelo genoma, indicando um enxerto altamente eficiente das células instantâneas. Além disso, observamos recuperação normal de células mielóides, linfóides B e linfóides T em 4, 8, 12, 16, 20 semanas após o transplante (Figura 23A-F e 25) quando comparamos todos os grupos editados por genes com o controle simulado editado. Estes dados demonstram que, ao direcionar para a região promotora da globina gama com um gRNA que não mapeia para

qualquer HPFH conhecida, a estratégia de edição do genoma não afeta a capacidade de enxerto de HSCs de longo prazo, nem altera sua função de reconstituição de multi-linhagem quando transplantado para um novo hospedeiro. Em contraste, podemos conseguir um enxerto robusto injetando 50% menos células em comparação com outras estratégias relatadas. Em resumo, as HSCs editadas por estes sgRNAs são capazes de enxerto de longo prazo com reconstituição robusta de múltiplas linhagens no nicho de células-tronco hematopoiéticas para sustentar a hematopoiese a longo prazo.

Alta eficiência de edição foi mantida pré e pós-transplante.

[0985] Examinamos a eficiência de edição dos sgRNAs testados por NGS como descrito no procedimento experimental. Três dias depois do gene de edição, 100.000 das células CD34+ humanas editadas em gene, juntamente com células CD34+ editadas simuladas foram submetidos a análise de NGS. As células restantes foram transplantadas para receptores NSG, como descrito anteriormente. Às 8 semanas e 20 semanas após o transplante, foram colhidas células de medula óssea de camundongos NSG transplantados e 100.000 células CD45+ humanas foram submetidas a NGS para medir a eficiência de edição. Os resultados mostram que sgRNA sg-G1128, sg-G0048 e sg-G0067 atingiram 80-90% de edição, enquanto sg-G0010 demonstrou ~45% de edição (Figura 26). Ao comparar a eficiência de edição pré-transplante com após 8 ou 20 semanas de transplante, os resultados mostraram que os eventos editados nas populações de células-tronco e progenitoras hematopoiéticas foram mantidos a longo prazo durante todo o período do transplante. Estes dados demonstram a durabilidade das células editadas no indivíduo transplantado. Nós até observamos um aumento na eficiência de edição do sg-G1128 em 20 semanas após o transplante, o que implica que as células editadas foram selecionadas pelo microambiente da medula óssea ou têm uma vantagem de

sobrevivência após o transplante.

[0986] Em outra repetição independente de transplante, a análise de NGS revelou uma gama de edição alcançada com os gRNAs testados, com sg-G1128 resultando em mais de 90% de edição dois dias após a eletroporação (Fig 8A). A edição foi também detectada em células CD34+ humanas isoladas às 9 e 20 semanas após o transplante (Fig. 27B e 27C).

HSCs de edição de genes e de longo prazo enxertadas aumentaram a produção de hemoglobina fetal

[0987] Os camundongos NSG não suportam o desenvolvimento eritroide, uma vez que o camundongo não possui a citocina humana correta para permitir a maturação eritroide. No entanto, as HSCs humanas enxertadas podem ser colhidas a partir da medula óssea de camundongo, colocadas em meio de diferenciação eritroide (tal como descrito em outros sítios nestes exemplos) para induzir a diferenciação eritroide. Os dados mostram que as HSCs de 20 semanas, editadas por genes, foram capazes de produzir um nível mais elevado de HbF, comparativamente a HSCs editadas e transplantadas (Figura 28).

Exemplo 7. Análise de Padrão Indel Fora do Alvo

Identificação *in silico* de potenciais loci fora do alvo de gRNA

[0988] Os loci potenciais fora do alvo para o subconjunto de gRNAs da região HGB1/HBG2 GCR-0001, GCR-0008, GCR-0010, GCR-0048, GCR-0051 e GCR-0067 foram identificados como se segue. Para cada gRNA, a sequência do domínio-alvo do gRNA de 20 nucleotídeos foi alinhada à sequência de referência do genoma humano (contrução GRCh38) usando o alinhador de sequência BFAST (versão 0.6.4f, Homer et al, PLoS One, 2009, 4(11), e7767, PMID: 19907642) usando parâmetros padrão permitindo até 5 desemparelhamentos de nucleotídeos. Os loci identificados foram filtrados para conter apenas sítios que estão adjacentes em 5' à sequência PAM canônica 5'-NGG-

3' do Cas9 (ou seja, locus-PAM-3' 5'-fora-alvo). Usando o script BEDTools (versão 2.11.2, Quinlan and Hall, Bioinformatics, 2010 26(6):841-2, PMID: 20110278) sítios com 5 desemparelhamentos de nucleotídeos foram ainda filtrados contra anotações do gene RefSeq (Pruitt et al, Nucleic Acids Res., 2014 42(Database issue):D756-63, PMID: 24259432) para conter apenas loci anotados como éxons. As contagens dos potenciais loci fora do alvo identificados para gRNAs da região HGB1/HBG2 são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12. Contagens de loci fora do alvo *in silico* identificados para a região HGB1/HBG2 dos gRNAs GCR-0001, GCR-0008, GCR-0010, GCR-0048, GCR-0051 e GCR-0067 com 0, 1, 2, 3 e 4 desemparelhamentos de nucleotídeos e 5 desemparelhamentos de nucleotídeos dentro éxons RefSeq são mostrados. *gRNAs GCR-0048 e GCR-0067 têm dois sítios de correspondência perfeita no alvo, um por locus de HBG. +inclui um ou dois sítios-alvo HBG1 ou HBG2 homólogos incompatíveis.

Nome do gRNA	Número de fora do alvo com desemparelhamentos N					Éxons 5 RefSeq	Total de sítios
	0	1	2	3	4		
GCR-0001	0	0	4 ⁺	17	323	28	372
GCR-0008	0	1 ⁺	0	27	267	60	355
GCR-0010	0	1 ⁺	0	17	216	64	298
GCR-0048*	0	0	0	7	89	38	134
GCR-0051	0	1 ⁺	3	25	369	66	464
GCR-0067*	0	0	0	11	95	38	144

Análise fora do alvo em HSPCs CD34⁺

Extração do DNA genômico

[0989] O DNA genômico foi isolado a partir de HSPC CD34⁺ derivadas de medula óssea, editadas e não editadas com RNP de 3 dias, utilizando o kit Quick-DNA Miniprep (Zymo Research) seguindo as recomendações do fabricante.

Criação de iniciadores de PCR para amplificação direcionada de

potenciais sítios fora do alvo

[0990] Amplicons de PCR direcionando para potenciais loci fora do alvo com 0-3 de desemparelhamentos (e o locus no alvo) identificados para os gRNAs da região HBG1/HBG2 (GCR-0001, GCR-0008, GCR-0010, GCR-0048, GCR-0051 e GCR-0067) foram concebidos usando Primer3 (versão 2.3.6, Untergasser et al, Nucleic Acids Res., 2012 40(15):e115, PMID: 22730293) utilizando parâmetros predefinidos visando uma gama de tamanho de amplicon de aproximadamente 160-300 pares de bases de comprimento com a sequência do domínio-alvo de gRNA localizada no centro do amplicon. Pares de iniciadores de PCR resultantes e sequências amplicon foram verificados para a singularidade pela busca BLAST (versão 2.2.19, Altschul et al, J Mol Biol., 1990, 215(3):403-10, PMID: 2231712) de sequências contra a sequência de referência do genoma humano (construto GRCh38). Os pares de iniciadores que resultaram em mais de uma sequência de amplicons foram descartados e re-criados. A Tabela 3 mostra as contagens de pares de iniciadores de PCR concebidos com sucesso.

Preparação, quantificação e sequenciamento da biblioteca de sequenciamento Illumina

[0991] O DNA genômico de HSPC editadas (2 réplicas por gRNA) ou não editadas (2 réplicas por gRNA) com RNP foi quantificado utilizando o kit de dsDNA Quant-iT PicoGreen (Thermo Fisher, Cat # P7581) usando as recomendações do fabricante. As bibliotecas de sequenciamento Illumina direcionadas aos loci individuais fora do alvo (e o locus no alvo) foram geradas para cada amostra utilizando duas reações de PCR sequenciais. O primeiro PCR amplificou o locus alvo utilizando iniciadores de PCR específicos do alvo (concebidos acima) que foi colocada cauda com sequências universais de sequenciamento Illumina compatíveis. O segundo PCR adicionou sequências adicionais compatíveis de sequenciamento Illumina ao primeiro amplicon de PCR,

incluindo códigos de barras de amostra para permitir a multiplexação durante o sequenciamento. O PCR 1 foi realizado em um volume final de 10 μ L com cada reação contendo aproximadamente 6,5 ng de gDNA (equivalente a aproximadamente 1000 células), pares de iniciadores PCR1 (Integrated DNA Technologies) em uma concentração final de 0,25 μ M e 1x concentração final de Master Mix Q5 Hot Start (New England BioLabs, Cat # 102500-140). PCR 1 os iniciadores esquerdos eram de cauda 5' (isto é, 5'-iniciador esquerdo específico do alvo-cauda-3') com a sequência 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' (SEQ ID NO: 279) e iniciadores direitos eram de cauda 5' (isto é, 5'-iniciador direito específico do alvo-cauda-3') com a sequência 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3' (SEQ ID NO: 280). O PCR 1 foi realizado em um termociclador usando as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 98 °C durante 1 min; 25 ciclos de 98 °C durante 10 s, 63 °C durante 20 s e 72 °C durante 30 s; 1 ciclo a 72 °C durante 2 min. PCR 1 foi, em seguida, diluído 1 em 100 utilizando água livre de nuclease (Ambion, Cat N.º AM9932) e utilizado como entrada no PCR 2. PCR 2 foi realizado em um volume final de 10 μ L com cada reação contendo 2 μ L de produto PCR 1 diluído, pares de iniciadores PCR 2 (Integrated DNA Technologies) a uma concentração final de 0,5 μ M e 1x concentração final de Q5 Hot Start Master Mix (New England BioLabs, Cat N.º 102500-140). PCR 2 a sequência do iniciador esquerdo usada foi 5'-AATGATACGGCGACCGAGATCTACACNNNNNNNNNTCGTCGGCAGCGTC-3' (SEQ ID NO: 281) e a PCR 2 sequência do iniciador direito usada foi 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATNNNNNNNNNGTCTCGTGGGCTCGG-3' (SEQ ID NO: 282) em que o NNNNNNNN denota uma sequência de código de barras de 8 nucleotídeos usada para

multiplexagem de amostras como parte do processo de sequenciamento padrão da Illumina. O PCR 2 foi realizado em um termociclador usando as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 72 °C durante 3 min; 1 ciclo de 98 °C durante 2 min; 15 ciclos de 98 °C durante 10 s, 63 °C durante 30 s e 72 °C durante 2 min. Amplicons do PCR 2, bibliotecas de sequenciamento Illumina agora viáveis, foram limpas usando esferas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Cat N.º A63882) seguindo as recomendações do fabricante. As bibliotecas de sequenciamento Illumina limpas foram depois quantificadas utilizando métodos de quantificação qPCR padrão utilizando mistura Power SYBR Green PCR master (Life Technologies, Cat# 4367660) e iniciadores específicos para as extremidades da biblioteca de sequenciamento Illumina (sequência de iniciador direto 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3' (SEQ ID NO: 283), e sequência do iniciador reverso 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGA-3' (SEQ ID NO: 284)). As bibliotecas de sequenciamento Illumina foram então agrupadas equimolarmente e submetidas ao sequenciamento Illumina em um instrumento MiSeq (Illumina, Cat N.º SY-410-1003) com 300 leituras de extremidade de pares de bases usando um kit de reagentes MiSeq v3 (Illumina, Cat N.º MS-102-3003) seguindo as recomendações do fabricante. Uma cobertura mínima de sequência de 1000 vezes foi gerada para cada locus em cada réplica. PCR, limpeza, agrupamento e sequenciamento de amostras editadas e não editadas foram realizados separadamente para evitar qualquer possibilidade de contaminação cruzada entre amostras ou amplicons de PCR gerados a partir deles.

Dados de sequenciamento NGS QC e análise de variantes

[0992] Os métodos são como no Exemplo 2.1, com as seguintes modificações. Para o Estágio 5 da análise, sítios com uma frequência indel combinada de > 2% (edição em mais de aproximadamente 10 a 20 células) foram considerados e potenciais sítios de edição ativa foram

examinados ao nível de alinhamento de leitura usando o Integrative Genome Viewer (versão IGV 2.3, Robinson et al, Nat Biotechnol. 2011, 9(1):24-6, PMID: 21221095) que permite a inspeção visual dos alinhamentos de leitura para a sequência de referência do genoma.

Quantificação de grandes deleções.

[0993] Grandes deleções entre sítios de direcionamento nos promotores de HBG1 e HBG2 foram quantificadas por PCR de gota digital (ddPCR) em formato de ensaio não competitivo para determinação do número de cópias de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, o gDNA foi combinado com ddPCR SuperMix para Sondas (sem dUTPs) (BioRad Cat #1863024), enzima de restrição HindIII-HF (NEB Cat #R3104S) e cada mistura de sonda de iniciador, transferida para um cartucho DG8 juntamente com o Óleo de Geração de Gotículas para Sondas (BioRad Cat #1863005) e gotículas geradas com um gerador de gotículas QX200 (BioRad). As gotículas foram sujeitas a PCR em um Termociclador Touch C1000 com Módulo de Reação de Poço Profundo-96 (BioRad), seguido de detecção com leitor de gotículas QX200 (BioRad). As cópias por μ L foram determinadas por análise com o software QuantaSoft (BioRad). Um conjunto de sondas de iniciador personalizado (Life Technologies Cat #APZW76R, PN4331348, Iniciador direto: ACGGATAAGTAGATATTGAGGTAAGC (SEQ ID NO: 285), Iniciador reverso: GTCTCTTTCAGTTAGCAGTGG (SEQ ID NO: 286), FAM Sonda TaqMan: ACTGCGCTGAACTGTGGCTTTATAG (SEQ ID NO: 287)) usada para amplificar o gDNA dentro da região intergênica HBG1-HBG2. Utilizou-se um Ensaio de Referência de Número de Cópia TaqMan humano, RNase P (Thermo Fisher cat #4403326) como amplicon de referência. Cópias por μ L para os amplicons HBG1-HBG2 e RNase P estavam dentro da faixa linear do fabricante. Percentagem de deleção foi relatada como 100% vezes 1 menos a razão de cópias

por uL para HBG1-HBG2 e amplicons RNase P. Para amostras de controle não editadas calculou-se a percentagem de deleções até 2%, o que pode refletir o fundo do ensaio.

Análise de resultados da região HBG1/HBG2 *in silico* fora do alvo

[0994] A tabela 13 mostra o número de sítios fora do alvo caracterizados com sucesso. Os sítios não caracterizados falharam no desenho do iniciador de PCR ou na amplificação por PCR e permanecem sob avaliação.

[0995] **gRNA GCR-0001:** O sítio HBG1 no alvo mostrou edição localizada robusta com uma frequência média de INDEL de aproximadamente 58%, enquanto o sítio-alvo homólogo de HBG2 com dois desemparelhamentos (aqui e abaixo, mostrados em letras minúsculas) em relação à sequência de domínio-alvo de gRNA (5'-AGTCCTGGTATC**ṡ**TCTATG**ḡ** - PAM-3', PAM = TGG (SEQ ID NO: 288)) mostrou edição localizada mínima. No entanto, a análise de ddPCR da deleção de 4,9 kb mostrou que ela ocorre em uma frequência de aproximadamente 34%. Uma análise adicional identificou um sítio positivo fora do alvo com uma frequência média de INDEL de aproximadamente 26% em ambas as réplicas. O sítio tem 3 desemparelhamentos em relação à sequência do domínio-alvo de gRNA (5'-A**ṡ**TCC**ḡ**aGTATCCTCTATGA-PAM-3', PAM = TGG (SEQ ID NO: 289)) e está localizado em um intergênico no cromossomo Y na posição de par de bases 21,470,475-21,470,497. Não está claro se a edição neste sítio fora do alvo tem algum efeito prejudicial sobre a expressão de genes ou viabilidade celular, uma análise mais aprofundada é necessária.

[0996] **gRNA GCR-0008:** O sítio HBG1 no alvo mostrou edição localizada robusta com uma frequência média de INDEL de aproximadamente 88%. O sítio-alvo homólogo de HBG2 com um desemparelhamento em relação à sequência do domínio-alvo de gRNA

(5'-GGAGAAG_aAACTAGCTAAA- PAM-3', PAM = GGG (SEQ ID NO: 290)) mostrou edição localizada robusta com uma frequência média de INDEL de aproximadamente 85%. A análise de ddPCR da deleção de 4,9 kb mostrou que ela ocorre em uma frequência de aproximadamente 50%. Nenhum outro sítio mostrou edição.

[0997] **gRNA GCR-0010:** O sítio HBG1 no alvo mostrou edição localizada robusta com uma frequência média de INDEL de aproximadamente 32%. O sítio-alvo homólogo de HBG2 com um desemparelhamento em relação à sequência do domínio-alvo de gRNA (5'- GGGAGAAG_aAACTAGCTAA- PAM-3', PAM = AGG (SEQ ID NO: 291)) mostrou edição localizada robusta com uma frequência média de INDEL de aproximadamente 27%. A análise de ddPCR da deleção de 4,9 kb mostrou que ela ocorre em uma frequência de aproximadamente 33%. Nenhum outro sítio mostrou edição.

[0998] **gRNA GCR-0048:** Os sítios no alvo HBG1 e HBG2 mostraram edição localizada robusta com uma frequência média de INDEL de aproximadamente 86% para ambos os sítios. A análise ddPCR da deleção 4.9 kb mostrou que ocorrem a uma frequência de aproximadamente 45%. Nenhum outro sítio mostrou edição.

[0999] **gRNA GCR-0051:** O sítio HBG2 no alvo mostrou edição localizada robusta com uma frequência média de INDEL de aproximadamente 88%. O sítio-alvo homólogo de HBG1 com um desemparelhamento em relação à sequência do domínio-alvo de gRNA (5'- GGAGAAG_gAACTAGCTAAA- PAM-3', PAM = GGG (SEQ ID NO: 292)) mostrou edição localizada robusta com uma frequência média de INDEL de aproximadamente 59%. A análise de ddPCR da deleção de 4,9 kb mostrou que ela ocorre em uma frequência de aproximadamente 40%. Nenhum outro sítio mostrou edição.

[1000] **gRNA GCR-0067:** Os sítios no alvo HBG1 e HBG2 mostraram edição localizada robusta com uma frequência média de

INDEL de aproximadamente 74% e 78%, respectivamente. A análise ddPCR da deleção 4.9 kb mostrou que ocorrem a uma frequência de aproximadamente 62%. Nenhum outro sítio mostrou edição.

[1001] As frequências localizadas de INDEL descritas acima não são relativas à frequência total indel e não levam em consideração a frequência da grande deleção de 4,9 kb.

Tabela 13. Contagens *in silico* de 0-3 sítios fora do alvo desemparelhados, identificados para os gRNAs da região HBG1/HBG2 GCR-0001, GCR-0008, GCR-0010, GCR-0048, GCR-0051 e GCR-0067, contagens de sítios caracterizados com sucesso em HSPC editadas por genoma e as contagens de sítios que exibem edição são mostrados.

Nome do gRNA	Número de 0-3 sítios fora do alvo <i>in silico</i> incompatíveis	Número de sítios <i>in silico</i> caracterizados com sucesso	Número de sítios <i>in silico</i> fora do alvo ativos identificados
GCR-0001	21	19	1
GCR-0008	28	28	1 (HBG2)
GCR-0010	18	18	1 (HBG2)
GCR-0048	7	7	0
GCR-0051	29	29	1 (HBG1)
GCR-0067	11	11	0

Análise Fora do Alvo Imparcial

[1002] Um ensaio baseado em inserção oligo (ver, por exemplo, Tsai et al., Nature Biotechnology. **33**, 187-197; 2015) foi usado para determinar potenciais sítios genômicos fora do alvo clivados por Cas9 com direcionamento para HBG1 e/ou HBG2. Nestas experiências, as células HEK293 que expressam Cas9GFP (HEK-293_Cas9GFP) foram transfectadas com gRNAs (15 nM crRNA:tracr) e oligo de inserção (10 nM) usando Lipofectamine® RNAiMAX. O ensaio baseia-se na identificação do oligo incorporado em quebras duplas no genoma, que

podem ou não resultar da clivagem por Cas9.

[1003] **Em uma experiência, gRNAs (RNAs guia duplos compreendendo** o domínio-alvo indicado na Figura 29) direcionando para HBG1 e/ou HBG2 foram rastreados em células HEK-293_Cas9GFP, e os resultados estão representados graficamente na Figura 29. Em uma experiência separada, a mesma metodologia foi usada para rastrear alguns dos mesmos, bem como gRNAs adicionais (incluindo RNAs guia duplo e guia único compreendendo o domínio-alvo indicado na Figura 30) direcionando para HBG1 e/ou HBG2 nas células HEK-293_Cas9GFP e os resultados são apresentados na Figura 30. A experiência com os dados apresentados na Figura 30 usou um iniciador oligo alternativo de inserção com um conteúdo equilibrado em G/C e complementaridade minimizada com o genoma humano, bem como outras modificações para os etapas de PCR, em comparação com o publicado Tsai et al. métodos, que melhoraram a sensibilidade e diminuíram falsos positivos. Em ambas as experiências, o ensaio detectou edição de alta eficiência nas sequências-alvo esperadas e um ou mais potenciais sítios fora do alvo.

[1004] Enquanto a detecção do oligo de inserção em sítios no genoma que não o sítio-alvo identifica potenciais efeitos fora do alvo de Cas9, sequenciamento profundo direcionado dos potenciais sítios fora do alvo pode ser usado para determinar se os potenciais sítios são de fato, sítios fora do alvo clivados por Cas9. Para este fim, foi realizada uma experiência em que as células HEK-293_Cas9GFP foram transfectadas de forma semelhante com os gRNAs (a 25 nM crRNA:tracr) utilizados nas duas experiências anteriores, mas sem a inserção oligo. O sequenciamento profundo do fragmento de cada um dos potenciais sítios identificados fora do alvo representados nas Figuras 29 e 30 foi utilizado para identificar se os indels (indicativos de eventos de clivagem Cas9) estavam presentes nos potenciais sítios fora

do alvo na linha celular HEK-293_Cas9GFP. Os resultados desta experiência demonstraram que a maioria dos potenciais sítios fora do alvo identificados pelo ensaio de inserção oligo não têm indels detectáveis após a transfecção do gRNAs, com algumas exceções, como fornecido na Tabela 14 abaixo. É importante ressaltar que as células HEK-293_Cas9GFP usadas nestas experiências para detectar possíveis fora do alvo sobre-expressam Cas9, provavelmente levando a um número maior de possíveis "acertos" fora dos alvos em comparação a uma modalidade de entrega transitória (por exemplo, entrega de RNP) em vários tipos de células de interesse (por exemplo, HSCs CD34+).

[1005] Tabela 14. Sítios fora do alvo validados na linha de células HEK-293_Cas9GFP.

ID Guia	Coordenada fora do alvo	Frequência Média de Indel
CR005813 (dgRNA; GCR-0051)	chr13:95591406-95591426	2%
G000690 (sgRNA GCR-0051)	chr13:95591406-95591426	2%
CR005821 (dgRNA GCR008)	chr20:10409602-10409622	27,60%
G000692 (sgRNA GCR008)	chr20:10409602-10409622	20,10%

[1006] Utilizando os métodos aqui descritos, foram examinados potenciais sítios fora do alvo em HSPCs CD34+ editadas com sgRNA/Cas9 e não apresentaram edição no tipo de células CD34+.

Exemplo 8

Procedimento Experimental

[1007] As células CD34+ colhidas a partir de sangue periférico mobilizado (mPB) de doadores saudáveis foram cultivadas e editadas em gene nas mesmas condições como descrito anteriormente no Exemplo 6. As células foram caracterizadas quanto à sua função biológica usando os mesmos métodos descritos nos parágrafos anteriores.

[1008] **As células CD34+ derivadas de sangue periférico**

mobilizado mantêm sua contagem de células CD34+, capacidade de expansão e viabilidade após a edição

[1009] O número de células CD34+ transplantadas para o paciente está diretamente correlacionado com o sucesso de um transplante de medula óssea. Portanto, nós enumeramos a percentagem de células CD34+ ao longo de um período de 10 dias após a edição de genes usando um método clinicamente aceitável, o ISHAGE. Os resultados mostram que nem a edição com sg1128 nem com sg0067 teve impacto na contagem de células CD34+ (Figura 31) quando comparado ao controle de edição simulada. Para a duração total do nosso processo de célula, em que apenas as células foram mantidas em cultura durante 3 dias após a eletroporação, a percentagem de células CD34+ foi mantida a aproximadamente 90%. (Figura 31A). A edição de genes também não teve impacto na capacidade de expansão das células CD34+ (Figura 31B) e sua viabilidade pós-eletroporação variou entre 70-90% (Figura 31C). Observamos uma expansão de células ~2 vezes no dia 3 após eletroporação, expansão de ~10 vezes no dia 7 após eletroporação e expansão de 15-25 vezes no dia 10 após eletroporação (Figura 31B).

As células CD34+ derivadas do sangue periférico mobilizado de indivíduos saudáveis demonstram eficiências de edição similares em comparação com a fonte de células da medula óssea ou células CD34+ de pacientes com doença falciforme

[1010] Sg1128 demonstraram cerca de 70-75% de eficiência de edição em células CD34+ derivadas de mPB de doadores saudáveis, enquanto que sg0067 apresentou > 95% de eficiência de edição total (incluindo grande deleção 5 kb e pequenos indels) (Figura 32). As eficiências de edição destes sgRNA foram semelhantes em células de diferentes fontes, incluindo células CD34+ derivadas da medula óssea de doadores saudáveis ou células CD34+ derivadas do sangue periférico de pacientes com doença falciforme (ver outros exemplos). É

importante notar que tanto a eficiência de edição quanto o padrão de edição de cada sgRNA foram altamente consistentes em todos os doadores testados.

Silenciamento CRISPR de BCL11A ou mutação do grupo de genes da g-globina aumenta transcrição de g-globina e produção de células F

[1011] O silenciamento de BCL11A por sg1128, ou mutação do potencial sítio de ligação BCL11A no grupo de genes de g-globina por sg0067, ambos aumentaram significativamente os transcritos de g-globina (Figura 33) levando a 15-20% de aumento da produção de células F em comparação com o controle editado simulado (Figura 34). Em resumo, sg1128 e sg0067 podem editar células CD34+ com elevada eficiência e gerar padrões de edição altamente consistentes. Células editadas mantêm aproximadamente 90% de contagem de células CD34+ no final de nosso procedimento de processamento de células por 6 dias. A capacidade de expansão e a viabilidade das células não foram prejudicadas pelo processo de edição de genes. Células CD34+ editadas, quando diferenciadas em eritrócitos, expressaram um nível significativamente maior de transcritos de g-globina, traduzindo-se em um aumento no número de produção de células F. Esta melhora na expressão de hemoglobina e no número de células F pode resgatar as características hematológicas da doença falciforme.

Exemplo 9: Enxerto in vivo e caracterização de HSPCs editadas por genes derivadas de pacientes com doença falciforme

Procedimento Experimental

[1012] Células CD34+ de pacientes com doença falciforme foram cultivadas e editadas em gene nas mesmas condições como descrito anteriormente no Exemplo 8. As células foram caracterizadas quanto à sua função biológica usando os mesmos métodos descritos nos Exemplos anteriores.

As células CD34+ derivadas de indivíduos com doença falciforme mantêm seu imunofenótipo e viabilidade de CD34+ após a edição.

[1013] As células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (HSPCs), que mantêm o seu estado celular primitivo, devem expressar CD34. Este é um dos mais importantes marcadores clínicos que se associa a células-tronco hematopoiéticas enxertáveis após o transplante, e o sucesso de um transplante está diretamente correlacionado com o número de células CD34+ transplantadas. Portanto, nós enumeramos o número de células CD34+ obtidas do sangue periférico de indivíduos falciformes após a edição usando um método clinicamente aceitável, ISHAGE. Os resultados mostram que nem a edição com sg1128 nem com sg0067 teve impacto na contagem de células CD34+ (Figura 35A e Figura 35B) quando comparado ao controle de edição simulada. A percentagem de células CD34+ foi mantida a ~80% no dia 3 após a edição (Figura 35B). A edição de genes também não teve impacto na capacidade de expansão das células CD34+ derivadas de pacientes (Figura 35C) e sua viabilidade pós-eletroporação (eletroporação em D0) foi superior a 75% em todos os momentos medidos em um período de 10 dias (Figura 35D).

As células CD34+ derivadas de indivíduos com doença falciforme demonstram eficiências de edição semelhantes em comparação com as células CD34+ de doadores saudáveis

[1014] Sg1128 demonstrou 65% de eficiência de edição em células CD34+ derivadas de pacientes com anemia falciforme, enquanto sg0067 mostrou 80-95% de eficiência de edição em amostras de pacientes (Figura 36). O nível de eficiência de edição é semelhante aos obtidos usando células CD34+ derivadas de medula óssea ou derivadas de sangue periférico de doadores saudáveis. O padrão de edição de cada RNA guia medido por NGS (como descrito no Exemplo 2.1) também foi altamente consistente em diferentes pacientes.

Edição de genes não compromete a capacidade de diferenciação multi-linhagem in vitro de células CD34+ derivadas de indivíduos com doença falciforme

[1015] Células progenitoras e células-tronco hematopoiéticas editadas em genes foram completamente capazes de se diferenciar em linhagens eritroides, granulocíticas, monocíticas e megacariocíticas, conforme medido por ensaios de unidade formadora de colônia (Figura 37).

Silenciamento CRISPR de BCL11A ou mutação do grupo de genes da g-globina aumenta transcrição de g-globina, produção de células F e expressão de hemoglobina fetal

[1016] Tanto o silenciamento de BCL11A por sg1128, como a criação de indels/deleções no grupo de g-globina por sg0067, aumentou significativamente os transcritos de g-globina (Figura 38) e aumentou o número de células F como medido por citometria de fluxo (Figura 39). Além disso, a intensidade de expressão da hemoglobina fetal das células F também foi melhorada por célula, medido por citometria de fluxo (Figura 40).

A edição de genes de células CD34+ derivadas de pacientes levou a uma redução significativa na contagem de células falciformes e aumento no número de células normais

[1017] Finalmente, para entender se a edição de genes pode resgatar a morfologia das células falciformes, nós editamos com CRISPR células CD34+ derivadas de pacientes com anemia falciforme, diferenciamos essas células em glóbulos vermelhos do sangue e submetemos essas células a uma câmara de hipóxia por 4 dias para induzir a morfologia falciforme. As células foram co-coradas com anticorpo anti-HbF-FITC, fixadas dentro da câmara, e submetidas a citometria de fluxo por imagiologia para capturar uma única imagem por célula. A citometria de fluxo de imagiologia de célula única pode

distinguir células falciformes versus células normais com base no comprimento da célula e na expressão de HbF em alto rendimento (foram utilizadas 40.000 imagens de células individuais de cada paciente para análise de dados). Os resultados mostram que a edição de genes com sg1128 ou sg0067 foi capaz de diminuir a contagem de células falciformes em aproximadamente 40% (Figura 41A) e, concomitantemente, aumentar a contagem de células normais em 1,2 vezes (Figura 41B). O efeito do composto de diminuir a contagem de células falciformes e aumentar concomitantemente a contagem normal de glóbulos vermelhos beneficiará enormemente os pacientes quando estes forem traduzidos para a clínica.

[1018] Em resumo, sg1128 e sg0067 podem editar células CD34+ de pacientes com doença falciforme com elevada eficiência e gerar padrões de edição altamente consistentes. A percentagem de células CD34+, a capacidade de expansão das células e a viabilidade das células não foram prejudicadas pelo processo de edição de genes ao comparar as células editadas ao grupo controle simulado editado. Células CD34+ editadas, quando diferenciadas em eritrócitos, expressaram um nível significativamente maior de transcritos de γ -globina. Isso se traduz em um aumento no número de células F e também na expressão aumentada de HbF por célula. O aumento do número de células F expressando HbF e a redução do número de glóbulos vermelhos falciformes foi refletido em nossa análise de citometria de fluxo de uma única célula. Observamos um decréscimo de 50% das células falciformes no grupo editado por genes e, simultaneamente, um aumento de 1,2 vezes nos glóbulos vermelhos normais expressando HbF em grupos editados, quando comparado ao controle modificado em simulado. Este efeito do composto de reduzir o número de células falciformes com um aumento concomitante de glóbulos vermelhos normais expressando HbF elevados após a edição

de genes deve beneficiar significativamente os pacientes quando traduzidos para a clínica. Juntos, esses dados suportam o desenvolvimento da edição de genoma mediada por CRISPR/Cas como um meio de terapia celular para tratar b-globinopatias.

[1019] Na medida em que houver qualquer discrepância entre qualquer listagem de sequências e qualquer sequência citada na especificação, a sequência citada na especificação deve ser considerada a sequência correta. Salvo indicação em contrário, todas as localizações genômicas estão de acordo com hg38.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[1020] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente aqui mencionados são aqui incorporados por referência na sua totalidade, como se cada publicação individual, patente ou pedido de patente fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência. Em caso de conflito, o presente pedido, incluindo quaisquer definições aqui, irá controlar.

EQUIVALENTES

[1021] Os peritos na técnica reconhecerão, ou serão capazes de determinar utilizando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção aqui descrita. Embora esta invenção tenha sido divulgada com referência a aspectos específicos, é evidente que outros aspectos e variações desta invenção podem ser concebidos por outros peritos na técnica sem se afastar do verdadeiro espírito e âmbito da invenção. As reivindicações anexas destinam-se a ser interpretadas de modo a incluir todos esses aspectos e variações equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de gRNA, caracterizada por compreender um *tracre* crRNA, em que o crRNA compreende um domínio-alvo que:

a) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,250,094-5,250,237, - cadeia, hg38;

b) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,255,022-5,255,164, - cadeia, hg38;

c) é complementar com uma sequência-alvo de uma região HFPH não deleção (por exemplo, uma região HPFH não deleção humana);

d) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,249,833 a Chr11:5,250,237, - cadeia, hg38;

e) é complementar com uma sequência-alvo na sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,254,738 a Chr11:5,255,164, - cadeia, hg38;

f) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11: 5,249,833-5,249,927, - cadeia, hg38;

g) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11: 5,254,738-5,254,851, - cadeia, hg38;

h) é complementar com uma sequência-alvo dentro da sequência de ácido nucleico genômico em Chr11:5,250,139-5,250,237, - cadeia, hg38; ou

i) suas combinações.

2. Molécula de gRNA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o domínio-alvo compreende, por

exemplo, qualquer uma das SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 72, ou um fragmento do mesmo.

3. Molécula de gRNA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o domínio-alvo compreende, por exemplo, qualquer uma das SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, ou um fragmento do mesmo.

4. Molécula de gRNA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o domínio-alvo compreende, por exemplo, qualquer uma das

a) SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 51, ou um fragmento do mesmo; ou

b) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 54, ou um fragmento do mesmo.

5. Molécula de gRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizada pelo fato de que o domínio-alvo compreende, por exemplo, ácidos nucleicos consecutivos 17, 18, 19 ou 20 de qualquer uma das sequências de domínio-alvo citadas.

6. Molécula de gRNA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que os ácidos nucleicos consecutivos 17, 18, 19 ou 20 de qualquer uma das sequências de domínio-alvo recitadas são os ácidos nucleicos consecutivos 17, 18, 19 ou 20 dispostos na extremidade 3' da sequência de domínio-alvo recitada.

7. Molécula de gRNA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que os ácidos nucleicos consecutivos 17, 18, 19 ou 20 de qualquer uma das sequências de domínio-alvo recitadas

são os ácidos nucleicos consecutivos 17, 18, 19 ou 20 dispostos na extremidade 5' da sequência de domínio-alvo recitada.

8. Molécula de gRNA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que os ácidos nucleicos consecutivos 17, 18, 19 ou 20 de qualquer uma das sequências de domínio-alvo recitadas não compreendem o ácido nucleico 5' ou 3' da sequência de domínio-alvo recitada.

9. Molécula de gRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8, caracterizada pelo fato de que o domínio-alvo consiste na sequência de domínio-alvo recitada.

10. Molécula de gRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que o domínio-alvo compreende, por exemplo, SEQ ID NO: 67.

11. Molécula de gRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que a molécula de gRNA é uma molécula de RNA guia dual.

12. Molécula de gRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que a molécula gRNA é uma molécula de RNA guia única.

13. Molécula de gRNA, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) SEQ ID NO: 195;

(b) SEQ ID NO: 231; ou

(c) qualquer (a) ou (b), acima, compreendendo ainda, na extremidade 3', 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 nucleotídeos de uracila (U); em que a sequência de qualquer (a) a (c) está disposta em 3', opcionalmente imediatamente 3', ao domínio-alvo.

14. Molécula de gRNA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende, por exemplo, a sequência:

(a) SEQ ID NO: 174;

(b) SEQ ID NO: 175; ou

(c) SEQ ID NO: 176.

15. Molécula de gRNA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende, por exemplo:

(a) um crRNA compreendendo, por exemplo SEQ ID NO: 177 e um tracr compreendendo, por exemplo, SEQ ID NO: 224;

(b) um crRNA compreendendo, por exemplo, SEQ ID NO: 177 e um tracr compreendendo, por exemplo, SEQ ID NO: 73;

(c) um crRNA compreendendo, por exemplo, SEQ ID NO: 178 e um tracr compreendendo, por exemplo, SEQ ID NO: 224; ou

(d) um crRNA compreendendo, por exemplo, SEQ ID NO: 178 e um tracr compreendendo, por exemplo, SEQ ID NO: 73.

16. Molécula de gRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de que

a) quando um sistema CRISPR (por exemplo, um RNP como descrito aqui) compreendendo uma molécula de gRNA é introduzido em uma célula, um indel é formado na ou próximo da sequência-alvo complementar ao domínio-alvo da molécula de gRNA; e/ou

b) quando um sistema CRISPR (por exemplo, um RNP como aqui descrito) compreendendo a molécula de gRNA é introduzido em uma célula, é criada uma deleção compreendendo a sequência, por exemplo, compreendendo substancialmente toda a sequência, entre uma sequência complementar ao domínio-alvo de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora HBG1 e uma sequência complementar ao domínio-alvo de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora HBG2.

17. Molécula de gRNA, de acordo com a reivindicação 16,

caracterizada pelo fato de que o indel não compreende um nucleotídeo disposto entre 5.250.092 e 5.249.833, - cadeia (hg38), opcionalmente em que o indel não compreende um nucleotídeo de um HPFH não deletável ou sítio de ligação do fator de transcrição .

18. Molécula de gRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizada pelo fato de que quando um sistema CRISPR (por exemplo, um RNP como descrito aqui) compreendendo a molécula de gRNA é introduzido em uma população de células, um indel é formado na ou próximo da sequência-alvo complementar ao domínio-alvo da molécula de gRNA em, pelo menos, cerca de 15%, por exemplo, pelo menos cerca de 17%, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, por exemplo, pelo menos cerca de 30%, por exemplo, pelo menos cerca de 40%, por exemplo, pelo menos cerca de 50%, por exemplo, pelo menos cerca de 55%, por exemplo, pelo menos cerca de 60%, por exemplo, pelo menos cerca de 70%, por exemplo, pelo menos cerca de 75%, das células da população.

19. Molécula de gRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizada pelo fato de que, quando um sistema CRISPR (por exemplo, um RNP como descrito aqui) compreendendo uma molécula de gRNA é introduzido em uma célula (por exemplo, uma população de células):

(a) expressão de hemoglobina fetal é aumentada na referida célula ou na sua descendência, por exemplo, a sua descendência eritroide, por exemplo, a sua descendência de glóbulos vermelhos, opcionalmente em que a referida expressão de hemoglobina fetal é aumentada em, pelo menos, cerca de 15%, por exemplo, pelo menos cerca de 17%, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, por exemplo, pelo menos cerca de 25%, por exemplo, pelo menos cerca de 30%, por exemplo, pelo menos cerca de 35%, por exemplo, pelo menos 40% em relação ao nível de expressão de hemoglobina fetal em uma população

de células à qual a molécula de gRNA não foi introduzida ou uma população da sua descendência, por exemplo, a sua descendência eritroide, por exemplo, a sua descendência de glóbulos vermelhos;

(b) a referida célula ou população de células, ou a sua descendência, por exemplo, a sua descendência, por exemplo, sua descendência eritroide, por exemplo, sua descendência de glóbulos vermelhos, produz pelo menos cerca de 6 picogramas (por exemplo, pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal por célula;

(c) não se formam indels fora do alvo na referida célula, por exemplo, não se formam indels fora do alvo fora das regiões promotoras de HBG1 e/ou HBG2, por exemplo, como detectáveis por sequenciamento de próxima geração e/ou ensaio de inserção de nucleotídeos; e/ou

(d) não é detectado indel fora do alvo, por exemplo, indel fora do alvo fora das regiões promotoras HBG1 e/ou HBG2, em mais do que cerca de 5%, por exemplo, mais do que cerca de 1%, por exemplo, mais do que cerca de 0,1 %, por exemplo, mais do que cerca de 0,01%, das células da população de células, por exemplo, como detectável por sequenciamento de próxima geração e/ou um ensaio de inserção de nucleotídeos.

20. Molécula de gRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 19, caracterizada pelo fato de que a célula é (ou a população de células compreende) uma célula de mamífero, primata ou humana, por exemplo, é uma célula humana, opcionalmente em que a referida célula é obtida de um paciente que sofre de hemoglobinopatia, por exemplo, doença falciforme ou talassemia, por exemplo, beta-talassemia.

21. Molécula de gRNA, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a célula é (ou população de células compreende) uma HSPC, opcionalmente uma HSPC CD34+, opcionalmente uma HSPC CD34+CD90+.

22. Molécula de gRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 21, caracterizada pelo fato de que a célula é autóloga ou alogênica no que refere-se a um paciente a ser administrado com a referida célula.

23. Composição caracterizada pelo fato de que compreende:

1) uma ou mais moléculas de gRNA (incluindo uma primeira molécula de gRNA), como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, e uma molécula de Cas9;

2) uma ou mais moléculas de gRNA (incluindo uma primeira molécula de gRNA), como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, e ácido nucleico que codifica uma molécula de Cas9;

3) ácido nucleico que codifica uma ou mais moléculas de gRNA (incluindo uma primeira molécula de gRNA), como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, e uma molécula de Cas9;

4) ácido nucleico que codifica uma ou mais moléculas de gRNA (incluindo uma primeira molécula de gRNA), como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, e ácido nucleico que codifica uma molécula de Cas9; ou

5) qualquer um de 1) a 4), acima, e um ácido nucleico molde; ou

6) qualquer um de 1) a 4) acima, e ácido nucleico compreendendo sequência que codifica um ácido nucleico molde.

24. Composição caracterizada pelo fato de que compreende uma primeira molécula de gRNA, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, compreendendo ainda uma de Cas9, opcionalmente, em que a molécula de Cas9 é uma Cas9 ativa ou inativa

de *S. pyogenes*, opcionalmente em que a molécula de Cas9 compreende a SEQ ID NO: 205 ou uma sequência com pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de homologia de sequência com esta.

25. Composição, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, caracterizada pelo fato de que a molécula de Cas9 compreende, por exemplo:

- (a) SEQ ID NO: 233;
- (b) SEQ ID NO: 234;
- (c) SEQ ID NO: 235;
- (d) SEQ ID NO: 236;
- (e) SEQ ID NO: 237;
- (f) SEQ ID NO: 238;
- (g) SEQ ID NO: 239;
- (h) SEQ ID NO: 240;
- (i) SEQ ID NO: 241;
- (j) SEQ ID NO: 242;
- (k) SEQ ID NO: 243; ou
- (l) SEQ ID NO: 244.

26. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 25, caracterizada pelo fato de que a primeira molécula de gRNA e a molécula de Cas9 estão presentes num complexo de proteína ribonuclear (RNP).

27. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 26, caracterizada pelo fato de que é formulada em um meio adequado para eletroporação.

28. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 27, caracterizada pelo fato de que cada uma das referidas moléculas de gRNA está em um RNP com uma molécula de Cas9 descrita aqui, e em que cada um dos referidos RNP está em uma concentração de menos do que cerca de 10 μ M, por exemplo, menos

do que cerca de 3 uM, por exemplo, menos do que cerca de 1 uM, por exemplo, menos do que cerca de 0,5 uM, por exemplo, menos do que cerca de 0,3 uM, por exemplo, menos do que cerca de 0,1 uM, opcionalmente, em que a concentração do referido RNP é de cerca de 2 uM ou é cerca de 1 uM, opcionalmente, em que a composição compreende ainda uma população de células, por exemplo, HSPCs.

29. Sequência de ácidos nucleicos, caracterizada pelo fato de que codifica uma ou mais moléculas de gRNA, como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 22.

30. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico, como definido na reivindicação 29, opcionalmente em que no vetor é selecionado do grupo consistindo em um vetor lentiviral, um vetor adenoviral, um vetor viral adenoassociado (AAV), um vetor do vírus do herpes simples (HSV), um plasmídeo, um minicírculo, um nanoplasmídeo e um vetor de RNA.

31. Método de alteração de uma célula (por exemplo, uma população de células), (por exemplo, alteração da estrutura (por exemplo, sequência) de ácido nucleico) em ou próximo de uma sequência-alvo dentro da referida célula, caracterizado pelo fato de que compreende contato da (por exemplo, introdução na) referida célula (por exemplo, população de células) com:

1) uma ou mais moléculas de gRNA, como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, e uma molécula de Cas9;

2) uma ou mais moléculas de gRNA, como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, e ácido nucleico que codifica uma molécula de Cas9;

3) ácido nucleico que codifica uma ou mais moléculas de gRNA, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, e uma molécula de Cas9;

4) ácido nucleico que codifica uma ou mais moléculas de

gRNA, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, e ácido nucleico que codifica uma molécula de Cas9;

5) qualquer um de 1) a 4), acima, e um ácido nucleico molde;

6) qualquer um de 1) a 4) acima, e ácido nucleico compreendendo sequência que codifica um ácido nucleico molde;

7) a composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 23 a 28; ou

8) o vetor, como definido na reivindicação 30.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula animal, por exemplo, uma célula de mamífero, primata ou humana, por exemplo, é uma célula humana; opcionalmente em que a referida célula é obtida de um paciente que sofre de hemoglobinopatia, por exemplo, doença falciforme ou talassemia, por exemplo, beta-talassemia.

33. Método, de acordo com a reivindicação 31 ou 32, caracterizado pelo fato de que a célula é uma HSPC, opcionalmente uma HSPC CD34+, opcionalmente uma HSPC CD34+CD90+.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 33, caracterizado pelo fato de que a célula está disposta em uma composição compreendendo uma população de células que foi enriquecida quanto a células CD34+.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 34, caracterizado pelo fato de que a célula (por exemplo, população de células) foi isolada da medula óssea, sangue periférico (por exemplo, sangue periférico mobilizado) ou sangue do cordão umbilical.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 35, caracterizado pelo fato de que a célula é autóloga ou alogênica no que diz respeito a um paciente a ser administrado com a referida célula.

37. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

31 a 36, caracterizado pelo fato de que:

(a) a alteração resulta em um indel em ou próximo de uma sequência de DNA genômico complementar com o domínio-alvo da uma ou mais moléculas de gRNA; e/ou

b) a alteração resulta em uma deleção compreendendo sequência, por exemplo, substancialmente toda a sequência, entre uma sequência complementar ao domínio-alvo de uma ou mais moléculas de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, completamente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG1 e uma sequência complementar ao domínio-alvo de uma ou mais moléculas de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG2, opcionalmente, em que a deleção não compreende um nucleotídeo disposto entre 5,250,092 e 5,249,833, - cadeia (hg38).

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 37, caracterizado pelo fato de que:

(a) o método resulta em uma população de células em que pelo menos cerca de 15%, por exemplo, pelo menos cerca de 17%, por exemplo, pelo menos cerca de 20%, por exemplo, pelo menos cerca de 30%, por exemplo, pelo menos cerca de 40%, por exemplo, pelo menos cerca de 50%, por exemplo, pelo menos cerca de 55%, por exemplo, pelo menos cerca de 60%, por exemplo, pelo menos cerca de 70%, por exemplo, pelo menos cerca de 75% da população foi alterada, por exemplo, compreendem um indel, opcionalmente em que o indel selecionado de um indel listado na Tabela 2-7, opcionalmente em que as células da população não compreendem uma deleção de um nucleotídeo disposto entre 5,250,092 e 5,249,833, - cadeia (hg38);

(b) a alteração resulta em uma célula (por exemplo,

população de células) que é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada de uma linhagem eritroide (por exemplo, um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada exibe um nível aumentado de hemoglobina fetal, por exemplo, em relação a uma célula (por exemplo, população de células) inalterada;

(c) a alteração resulta em uma população de células que é capaz de se diferenciar em uma população de células diferenciadas, por exemplo, uma população de células de uma linhagem eritroide (por exemplo, uma população de glóbulos vermelhos) e em que a referida população de células diferenciadas tem uma percentagem aumentada de células F (por exemplo, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30% ou pelo menos cerca de 40% percentagem de células F mais elevada), por exemplo, em relação a uma população de células inalteradas; e/ou

(d) a alteração resulta em uma célula (por exemplo, uma população de células) que é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada, por exemplo, uma célula de uma linhagem eritroide (por exemplo, um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada produz, pelo menos, cerca de 6 picogramas (por exemplo, pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal por célula.

39. Célula, caracterizada pelo fato de que é alterada pelo método, como definido em qualquer uma das reivindicações 31 a 38, ou uma célula obtível pelo método, como definido em qualquer uma das reivindicações 31 a 38.

40. Célula, caracterizada pelo fato de que compreende um indel descrito na Tabela 7-2, opcionalmente, em que a célula não compreende uma deleção de um nucleotídeo disposto entre 5,250,092

e 5,249,833, - cadeia (hg38).

41. Célula, caracterizada pelo fato de que compreende uma primeira célula de gRNA, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 ou 22, ou uma composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 23 a 28, um ácido nucleico, como definido na reivindicação 29, ou um vetor, como definido na reivindicação 30.

42. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 41, caracterizada pelo fato de que a célula é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada, por exemplo, uma célula de uma linhagem eritroide (por exemplo, um glóbulo vermelho), e em que a referida célula diferenciada exibe um aumento do nível de hemoglobina fetal, por exemplo, relativamente a uma célula do mesmo tipo que não foi modificada para compreender uma molécula de gRNA, opcionalmente em que a célula diferenciada (por exemplo, célula de uma linhagem eritroide, por exemplo, glóbulos vermelhos) produz, pelo menos, cerca de 6 picogramas (por exemplo, pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas, ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas, ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal, por exemplo, relativa a uma célula diferenciada do mesmo tipo que não foi modificada para compreender uma molécula de gRNA.

43. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 42, caracterizada pelo fato de que a célula foi colocada em contato com um expensor de células-tronco.

44. Célula, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de que o expensor de células-tronco é:

a) (1r,4r)-N¹-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina;

b) 4-(3-piperidin-1-ilpropilamina)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-

carboxilato de metilo;

c) 4-(2-(2-(benzo[b]tiofen-3-il)-9-isopropil-9H-purin-6-ilamino)etil)fenol;

d) (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol; ou

e) suas combinações (por exemplo, uma combinação de (1r,4r)-N¹-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina e (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol).

45. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 44, caracterizada pelo fato de que compreende:

a) um indel em ou próximo de uma sequência de DNA genômico complementar com o domínio-alvo de uma molécula de gRNA, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22; e/ou

b) uma deleção compreendendo sequência, por exemplo, substancialmente toda a sequência, entre uma sequência complementar ao domínio-alvo de uma molécula de gRNA, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, completamente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG1 e uma sequência complementar ao domínio-alvo de uma molécula de gRNA, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG2, opcionalmente, em que a deleção não compreende um nucleotídeo disposto entre 5.250.092 e 5.249.833, - cadeia (hg38).

46. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 45, caracterizada pelo fato de que a célula é uma célula animal, por exemplo, uma célula de mamífero, primata ou humana, por exemplo,

é uma célula humana; opcionalmente em que a referida célula é obtida de um paciente que sofre de hemoglobinopatia, por exemplo, doença falciforme ou talassemia, por exemplo, beta-talassemia.

47. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 46, caracterizada pelo fato de que a célula é uma HSPC, opcionalmente uma HSPC CD34+, opcionalmente uma HSPC CD34+CD90+.

48. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 47, caracterizada pelo fato de que a célula (por exemplo, população de células) foi isolada da medula óssea, sangue periférico (por exemplo, sangue periférico mobilizado) ou sangue do cordão umbilical.

49. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 48, caracterizada pelo fato de que a célula é autóloga ou alogênica no que diz respeito a um paciente a ser administrado com a referida célula.

50. População de células, caracterizada pelo fato de que compreende a célula, como definida em qualquer uma das reivindicações 39 a 49, opcionalmente em que pelo menos cerca de 50%, por exemplo, pelo menos cerca de 60%, por exemplo, pelo menos cerca de 70%, por exemplo, pelo menos cerca de 80%, por exemplo, pelo menos cerca de 90% (por exemplo, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99%) das células da população são uma célula, como definida em qualquer uma das reivindicações 39 a 49.

51. População de células, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de que a população de células é capaz de se diferenciar em uma população de células diferenciadas, por exemplo, uma população de células de uma linhagem eritroide (por exemplo, uma população de glóbulos vermelhos), e em que a referida população de células diferenciadas tem uma percentagem aumentada de células F

(por exemplo, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 17%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, ou pelo menos cerca de 40% maior percentagem de células F), por exemplo, em relação a uma população de células não modificadas do mesmo tipo; opcionalmente, em que as células F da população de células diferenciadas produzem uma média de, pelo menos, 6 picogramas (por exemplo, pelo menos 7 picogramas, pelo menos 8 picogramas, pelo menos 9 picogramas, pelo menos 10 picogramas, ou aproximadamente 8 a cerca de 9 picogramas, ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal por célula.

52. População de células, de acordo com a reivindicação 50 ou 51, caracterizada pelo fato de que compreende:

- 1) pelo menos $1e6$ células CD34+/kg de peso corporal do paciente ao qual as células são para ser administradas;
- 2) pelo menos $2e6$ células CD34+/kg de peso corporal do paciente ao qual as células são para ser administradas;
- 3) pelo menos $3e6$ células CD34+/kg de peso corporal do paciente ao qual as células são para ser administradas;
- 4) pelo menos $4e6$ células CD34+/kg de peso corporal do paciente ao qual as células são para ser administradas; ou
- 5) de $2e6$ a $10e6$ células CD34+/kg de peso corporal do paciente ao qual as células são para ser administradas.

53. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 52, caracterizada pelo fato de que pelo menos cerca de 40%, por exemplo, pelo menos cerca de 50%, (por exemplo, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, ou menos cerca de 90%) das células da população serem células CD34+, opcionalmente, pelo menos cerca de 10%, por exemplo, pelo menos cerca de 15%, por exemplo, pelo menos 20%, por exemplo, pelo menos cerca de 30% das células da população são células

CD34+CD90+.

54. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 53, caracterizada pelo fato de que a população de células é derivada de sangue do cordão umbilical, sangue periférico (por exemplo, sangue periférico mobilizado) ou medula óssea, por exemplo, é derivada da medula óssea.

55. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 54, caracterizada pelo fato de que a população de células compreende, por exemplo, células de mamíferos, por exemplo, células humanas, opcionalmente, em que a população de células é obtida a partir de um paciente que sofre de uma hemoglobinopatia, por exemplo, doença falciforme ou talassemia, por exemplo, beta-talassemia.

56. População de células, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 55, caracterizada pelo fato de que a população de células é (i) autóloga em relação a um paciente ao qual é para ser administrado, ou (ii) alogênica em relação a um paciente ao qual é para ser administrado.

57. População de células (por exemplo, células CD34+), por exemplo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 56, caracterizada pelo fato de que compreende um padrão indel como descrito na Tabela 7-2, opcionalmente em que os indels do padrão indel descrito na Tabela 7-2 são detectáveis em pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% das células da população.

58. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende a célula ou a população de células, como definidas em qualquer uma das reivindicações 39 a 57, compreendendo opcionalmente um meio farmacologicamente aceitável, por exemplo, um meio farmacologicamente

aceitável adequado para criopreservação.

59. Uso de uma célula ou população de células, como definida em qualquer uma das reivindicações 39 a 57, ou de uma composição, como definida na reivindicação 58, caracterizada pelo fato de que é para o preparo de um medicamento para o tratamento de uma hemoglobinopatia em um paciente.

60. Uso de uma célula ou população de células, como definida em qualquer uma das reivindicações 39 a 57, ou de uma composição, como definida na reivindicação 58, caracterizada pelo fato de que é para o preparo de um medicamento para aumentar a expressão de hemoglobina fetal num mamífero.

61. Uso, de acordo com a reivindicação 60, caracterizada pelo fato de que a hemoglobinopatia é beta-talassemia ou doença falciforme.

62. Método de preparação de uma célula (por exemplo, uma população de células) caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) fornecer uma célula (por exemplo, uma população de células) (por exemplo, uma HSPC (por exemplo, uma população de HSPCs));

(b) cultivar a referida célula (por exemplo, a referida população de células) ex vivo em um meio de cultura de células compreendendo um expansor de células-tronco; e

(c) introduzir na referida célula uma primeira molécula de gRNA, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, uma molécula de ácido nucleico que codifica uma primeira molécula de gRNA, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, uma composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 23 a 28, um ácido nucleico, como definido na reivindicação 29, ou um vetor, como definido na reivindicação 30.

63. Método, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado

pelo fato de que, após a referida introdução do etapa (c), a referida célula (por exemplo, população de células) é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada (por exemplo, população de células diferenciadas), por exemplo, uma célula de uma linhagem eritroide (por exemplo, população de células de uma linhagem eritroide), por exemplo, um glóbulo vermelho (por exemplo, uma população de glóbulos vermelhos) e em que a referida célula diferenciada (por exemplo, população de células diferenciadas) produz hemoglobina fetal aumentada, por exemplo, em relação à mesma célula que não foi sujeita ao etapa (c).

64. Método, de acordo com a reivindicação 62 ou 63, caracterizado pelo fato de que o expensor de células-tronco é:

a) (1r,4r)-N1-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina;

b) 4-(3-piperidin-1-ilpropilamina)-9H-pirimido[4,5-b]indol-7-carboxilato de metila;

c) 4-(2-(2-(benzo[b]tiofen-3-il)-9-isopropil-9H-purin-6-ilamino)etil)fenol;

d) (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol; ou

e) suas combinações (por exemplo, uma combinação de (1r,4r)-N1-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclo-hexano-1,4-diamina e (S)-2-(6-(2-(1H-indol-3-il)etilamino)-2-(5-fluoropiridin-3-il)-9H-purin-9-il)propan-1-ol).

65. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 62 a 64, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura celular compreende a trombopoietina (TPO), ligante de Flt3 (Flt-3L), e fator de células-tronco humanas (SCF), opcionalmente, em que o meio de cultura celular compreende ainda a interleucina-6 humana (IL-6); opcionalmente, em que o meio de cultura celular compreende

trombopoietina (Tpo), ligante de Flt3 (Flt-3L), fator de células-tronco humanas (SCF) e, se presente, IL-6 humana, cada um em uma concentração que varia desde cerca de 10 ng/mL a 1000 ng/mL, opcionalmente cada um a uma concentração de cerca de 50 ng/mL, por exemplo, a uma concentração de 50 ng/mL.

66. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 62 a 65, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura celular compreende um expensor de células-tronco, a uma concentração variando desde cerca de 1 nM a cerca de 1 mM, opcionalmente, a uma concentração variando desde cerca de 1 uM até cerca de 100 nM, opcionalmente a uma concentração variando de cerca de 500 nM a cerca de 750 nM, opcionalmente a uma concentração de cerca de 500 nM, por exemplo, a uma concentração de 500 nM, ou a uma concentração de cerca de 750 nM, por exemplo, a uma concentração de 750 nM.

67. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 62 a 66, caracterizado pelo fato de que a cultura do etapa (b) compreende um período de cultura antes da introdução do etapa (c), opcionalmente, em que o período de cultura antes da introdução do etapa (c) é pelo menos 12 horas, por exemplo, é por um período de cerca de 1 dia a cerca de 12 dias, por exemplo, é por um período de cerca de 1 dia a cerca de 6 dias, por exemplo, é por um período de cerca de 1 dia a cerca de 3 dias, por exemplo, por um período de cerca de 1 dia a cerca de 2 dias, por exemplo, é por um período de cerca de 2 dias.

68. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 62 a 67, caracterizado pelo fato de que a cultura do etapa (b) compreende um período de cultura após a introdução do etapa (c), opcionalmente, em que o período de cultura após a introdução do etapa (c) é pelo menos 12 horas, por exemplo, é por um período de cerca de 1 dia a cerca de 12 dias, por exemplo, é por um período de cerca de 1

dia a cerca de 6 dias, por exemplo, por um período de cerca de 2 dias a cerca de 4 dias, por exemplo, é por um período de cerca de 2 dias ou é por um período de cerca de 3 dias ou é por um período de cerca de 4 dias.

69. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 62 a 68, caracterizado pelo fato de que a população de células é expandida *ex-vivo*, pelo menos, 3 vezes, por exemplo, pelo menos 4 vezes, por exemplo, pelo menos 5 vezes, por exemplo, pelo menos 10 vezes.

70. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 62 a 69, caracterizado pelo fato de que a introdução do etapa (c) compreende uma eletroporação.

71. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 62 a 70, caracterizado pelo fato de que a célula (por exemplo, população de células) fornecida no etapa (a) é uma célula humana (por exemplo, uma população de células humanas).

72. Método, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de que a célula (por exemplo, população de células) proporcionada no etapa (a) é isolada da medula óssea, sangue periférico (por exemplo, sangue periférico mobilizado) ou sangue do cordão umbilical.

73. Método, de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que

(i) a célula (por exemplo, população de células) fornecida no etapa (a) é isolada da medula óssea, por exemplo, é isolada da medula óssea de um paciente que sofre de hemoglobinopatia, opcionalmente em que a hemoglobinopatia é doença falciforme ou talassemia, opcionalmente, em que a talassemia é beta-talassemia; ou

(ii) a célula (por exemplo, população de células) fornecida no etapa (a) é isolada do sangue periférico, por exemplo, é isolada do

sangue periférico de um paciente que sofre de hemoglobinopatia, opcionalmente em que a hemoglobinopatia é doença falciforme ou talassemia, opcionalmente, em que a talassemia é beta-talassemia; opcionalmente em que o sangue periférico é mobilizado sangue periférico, opcionalmente em que o sangue periférico mobilizado é mobilizado utilizando Plerixafor, G-CSF ou uma combinação destes.

74. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 62 a 73, caracterizado pelo fato de que a população de células fornecida na etapa (a) é enriquecida quanto a células CD34+.

75. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 62 a 74, caracterizado pelo fato de que subsequente à introdução da etapa (c), a célula (por exemplo, população de células) é criopreservada.

76. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 62 a 75, caracterizado pelo fato de que subsequente à introdução da etapa (c), a célula (por exemplo, população de células) compreende:

(a) um indel em ou próximo de uma sequência de DNA genômico complementar com o domínio-alvo da primeira molécula de gRNA; e/ou

b) deleção compreendendo sequência, por exemplo, substancialmente toda a sequência, entre uma sequência complementar ao domínio-alvo da primeira molécula de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, completamente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG1 e uma sequência complementar ao domínio-alvo da primeira molécula de gRNA (por exemplo, pelo menos 90% complementar ao domínio-alvo de gRNA, por exemplo, totalmente complementar ao domínio-alvo de gRNA) na região promotora de HBG2, opcionalmente, em que o indel, por exemplo, a deleção, não compreende um nucleotídeo disposto entre 5.250.092 e 5.249.833, -

cadeia (hg38).

77. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 62 a 76, caracterizado pelo fato de que:

(a) após a introdução da etapa (c), pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% das células da população de células compreendem um indel em ou perto de uma sequência de DNA genômico complementar ao domínio-alvo da primeira molécula de gRNA, opcionalmente, em que o indel é selecionado de um indel listado na Tabela 2-7, opcionalmente, em que nenhuma célula da população compreende uma deleção de um nucleotídeo disposto entre 5,250,092 e 5,249,833, - cadeia (hg38);

(b) após a introdução da etapa (c), a célula (por exemplo, população de células) é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada de uma linhagem eritroide (por exemplo, um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada exibe um nível aumentado de hemoglobina fetal, por exemplo, em relação a uma célula (por exemplo, população de células) inalterada;

(c) após a introdução da etapa (c), a população de células é capaz de se diferenciar em uma população de células diferenciadas, por exemplo, uma população de células de uma linhagem eritroide (por exemplo, uma população de glóbulos vermelhos) e em que a referida população de células diferenciadas tem uma percentagem aumentada de células F (por exemplo, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30% ou pelo menos cerca de 40% percentagem de células F mais elevada), por exemplo, em relação a uma população de células inalteradas;

(d) após a introdução da etapa (c), a célula (por exemplo,

uma população de células) é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada, por exemplo, uma célula de uma linhagem eritroide (por exemplo, um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada (por exemplo, uma população de células diferenciadas) produz pelo menos cerca de 6 picogramas (por exemplo, pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal por célula;

(e) após a introdução da etapa (c), não se formam indels fora do alvo na referida célula, por exemplo, não se formam indels fora do alvo fora das regiões promotoras de HBG1 e/ou HBG2, por exemplo, como detectáveis por sequenciamento de próxima geração e/ou ensaio de inserção de nucleotídeos; e/ou

(f) após a introdução da etapa (c), não ser detectado indel fora do alvo, por exemplo, não é detectado indel fora do alvo indel fora das regiões promotoras HBG1 e/ou HBG2, em mais do que cerca de 5%, por exemplo, mais do que cerca de 1%, por exemplo, mais do que cerca de 0,1 %, por exemplo, mais do que cerca de 0,01%, das células da população de células, por exemplo, como detectável por sequenciamento de próxima geração e/ou um ensaio de inserção de nucleotídeos.

78. Célula (por exemplo, população de células), caracterizada pelo fato de que é obténível pelo método, como definido em qualquer uma das reivindicações 62 a 77.

79. Célula, por exemplo, uma célula alterada, por exemplo, uma célula, como definida na reivindicação 78, caracterizada pelo fato de que:

(a) pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca

de 80%, pelo menos cerca de 90% cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% das células da população de células compreendem um indel em ou perto de uma sequência de DNA genômico complementar ao domínio-alvo da molécula de gRNA, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, opcionalmente, em que o indel é selecionado de um indel listado na Tabela 2-7, opcionalmente, em que nenhuma célula da população compreende uma deleção de um nucleotídeo disposto entre 5,250,092 e 5,249,833, - cadeia (hg38);

(b) a célula (por exemplo, população de células) é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada de uma linhagem eritroide (por exemplo, um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada exibe um nível aumentado de hemoglobina fetal, por exemplo, em relação a uma célula (por exemplo, população de células) inalterada;

(c) a população de células é capaz de se diferenciar em uma população de células diferenciadas, por exemplo, uma população de células de uma linhagem eritroide (por exemplo, uma população de glóbulos vermelhos) e em que a referida população de células diferenciadas tem uma percentagem aumentada de células F (por exemplo, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30% ou pelo menos cerca de 40% percentagem de células F mais elevada), por exemplo, em relação a uma população de células inalteradas;

(d) a célula (por exemplo, uma população de células) é capaz de se diferenciar em uma célula diferenciada, por exemplo, uma célula de uma linhagem eritroide (por exemplo, um glóbulo vermelho) e em que a referida célula diferenciada (por exemplo, uma população de células diferenciadas) produz pelo menos cerca de 6 picogramas (por exemplo,

pelo menos cerca de 7 picogramas, pelo menos cerca de 8 picogramas, pelo menos cerca de 9 picogramas, pelo menos cerca de 10 picogramas ou de cerca de 8 a cerca de 9 picogramas ou de cerca de 9 a cerca de 10 picogramas) de hemoglobina fetal por célula;

(e) não se formam indels fora do alvo na referida célula, por exemplo, não se formam indels fora do alvo fora das regiões promotoras de HBG1 e/ou HBG2, por exemplo, como detectáveis por sequenciamento de próxima geração e/ou ensaio de inserção de nucleotídeos;

(f) não é detectado indel fora do alvo, por exemplo, não é detectado indel fora do alvo indel fora das regiões promotoras HBG1 e/ou HBG2, em mais do que cerca de 5%, por exemplo, mais do que cerca de 1%, por exemplo, mais do que cerca de 0,1 %, por exemplo, mais do que cerca de 0,01%, das células da população de células, por exemplo, como detectável por sequenciamento de próxima geração e/ou um ensaio de inserção de nucleotídeos; e/ou

(g) a referida célula ou a sua descendência é detectável em um paciente ao qual é transplantada a mais de 16 semanas, a mais de 20 semanas ou a mais de 24 semanas após o transplante, opcionalmente detectado por detecção de um indel em uma ou perto de uma sequência de DNA genômico complementar ao domínio-alvo de uma molécula de gRNA, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, opcionalmente em que o indel é selecionado a partir de um indel listado na Tabela 2-7.

80. Célula, de acordo com a reivindicação 78 ou 79, caracterizada pelo fato de que a célula é uma célula animal, por exemplo, uma célula de mamífero, primata ou humana, por exemplo, é uma célula humana; opcionalmente em que a referida célula é obtida de um paciente que sofre de hemoglobinopatia, por exemplo, doença falciforme ou talassemia, por exemplo, beta-talassemia.

81. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 80, caracterizada pelo fato de que a célula é uma HSPC, opcionalmente uma HSPC CD34+, opcionalmente uma HSPC CD34+CD90+.

82. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 81, caracterizada pelo fato de que a célula (por exemplo, população de células) foi isolada da medula óssea, sangue periférico (por exemplo, sangue periférico mobilizado) ou sangue do cordão umbilical.

83. Célula, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 82, caracterizada pelo fato de que a célula é autóloga ou alogênica no que diz respeito a um paciente a ser administrado com a referida célula.

84. Uso de uma célula ou população de células, como definida em qualquer uma das reivindicações 39 a 57 ou 78 a 83, caracterizada pelo fato de que é para o preparo de um medicamento para o tratamento de uma hemoglobinopatia num paciente humano.

85. Uso de uma célula ou população de células, como definida em qualquer uma das reivindicações 39 a 57 ou 78 a 83, caracterizada pelo fato de que é para o preparo de um medicamento para aumentar a expressão de hemoglobina fetal num paciente humano.

86. Uso, de acordo com a reivindicação 84, caracterizada pelo fato de que a hemoglobinopatia é beta-talassemia ou doença falciforme.

87. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 84 a 86, caracterizada pelo fato de que é administrada ao paciente humano uma composição compreendendo pelo menos cerca de 2×10^6 células, como definidas em qualquer uma das reivindicações 39 a 57 ou 78 a 83, por kg de peso corporal do paciente humano, por exemplo, pelo menos cerca de 2×10^6 células CD34+, como definidas em qualquer uma das reivindicações 39 a 57, ou 78 a 83, por kg de peso corporal do paciente

humano.

88. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 84 a 87, caracterizado pelo fato de que a célula ou população de células, ou a sua descendência, é detectável no paciente humano a mais do que 16 semanas, mais do que 20 semanas, ou mais do que 24 semanas após a administração, opcionalmente, como detectado pela detecção de um indel em ou perto de uma sequência de DNA genômico complementar ao domínio-alvo de uma molécula de gRNA, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, opcionalmente em que o indel é selecionado a partir de um indel listado na Tabela 2-7; opcionalmente, em que o nível de detecção do indel em uma população de células de referência (por exemplo, células CD34+) a mais de 16 semanas, mais de 20 semanas ou mais de 24 semanas após administração é reduzido em não mais de 50%, não mais de 40%, não mais de 30 %, não mais de 20%, não mais de 10%, não mais de 5% ou não mais de 1%, em relação ao nível de detecção do indel na população de células imediatamente antes da administração.

89. Molécula de gRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, uma composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 23 a 28 ou 58, um ácido nucléico, como definido na reivindicação 29, um vetor, como definido na reivindicação 30, uma célula ou população de células, como definidas em qualquer uma das reivindicações 39 a 57, ou 78 a 83, caracterizada pelo fato de que é para uso como medicamento.

90. Uso de uma molécula de gRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, uma composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 23 a 28 ou 58, um ácido nucléico, como definido na reivindicação 29, um vetor, como definido na reivindicação 30, uma célula ou população de células, como definidas em qualquer uma das reivindicações 39 a 57, ou 78 a 83, caracterizado

pelo fato de que é na fabricação de um medicamento.

91. Uso de uma molécula de gRNA, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, uma composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 23 a 28 ou 58, um ácido nucléico, como definido na reivindicação 29, um vetor, como definido na reivindicação 30, uma célula ou população de células, como definidas em qualquer uma das reivindicações 39 a 57, ou 78 a 83, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença.

92. Uso de uma molécula de gRNA, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, uma composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 23 a 28 ou 58, um ácido nucléico, como definido na reivindicação 29, um vetor, como definido na reivindicação 30, uma célula ou população de células, como definidas em qualquer uma das reivindicações 39 a 57, ou 78 a 83, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença, em que a doença é uma hemoglobinopatia, opcionalmente em que a hemoglobinopatia é doença falciforme ou uma talassemia (por exemplo, beta-talassemia).

93. Invenção, caracterizada por quaisquer de suas concretizações ou categorias de reivindicação englobadas pela matéria inicialmente revelada no pedido de patente ou em seus exemplos aqui apresentados.

Figura 1

Corante HbF Dia 7

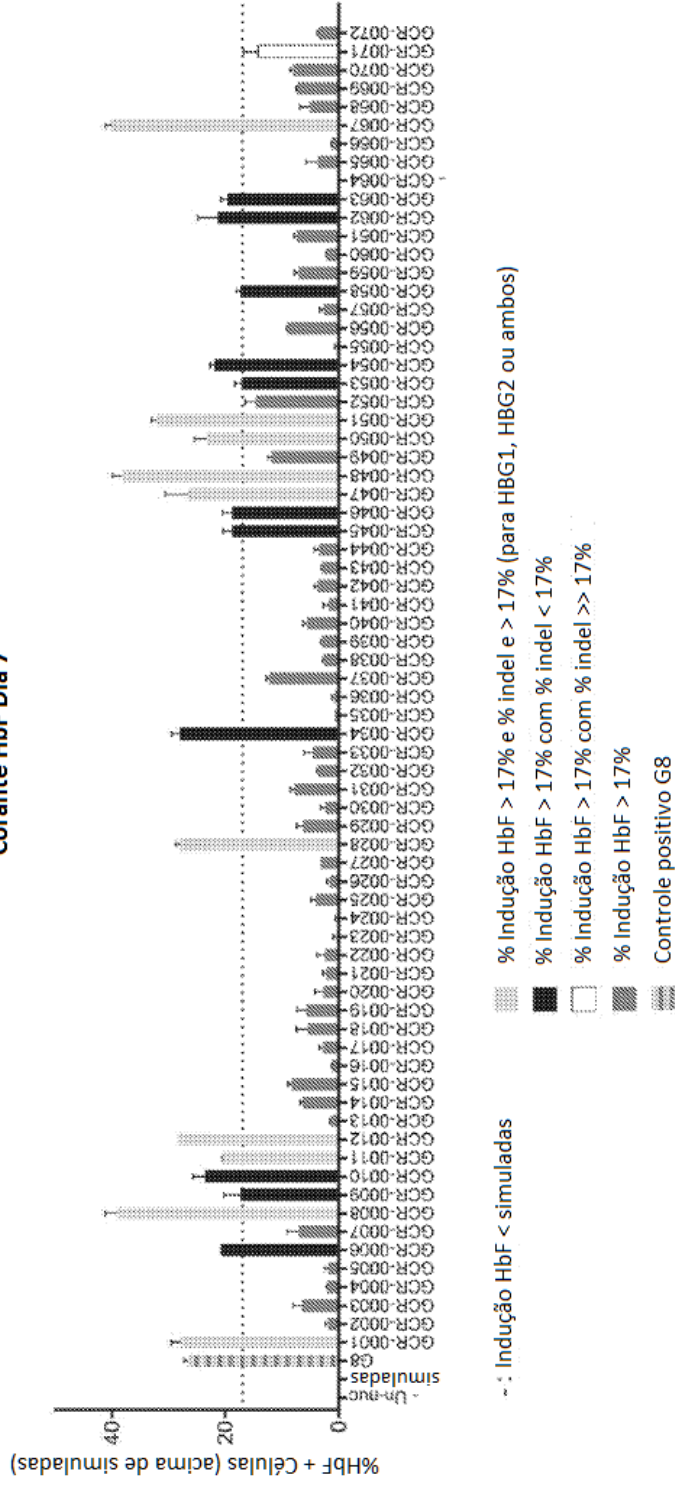


Figura 2

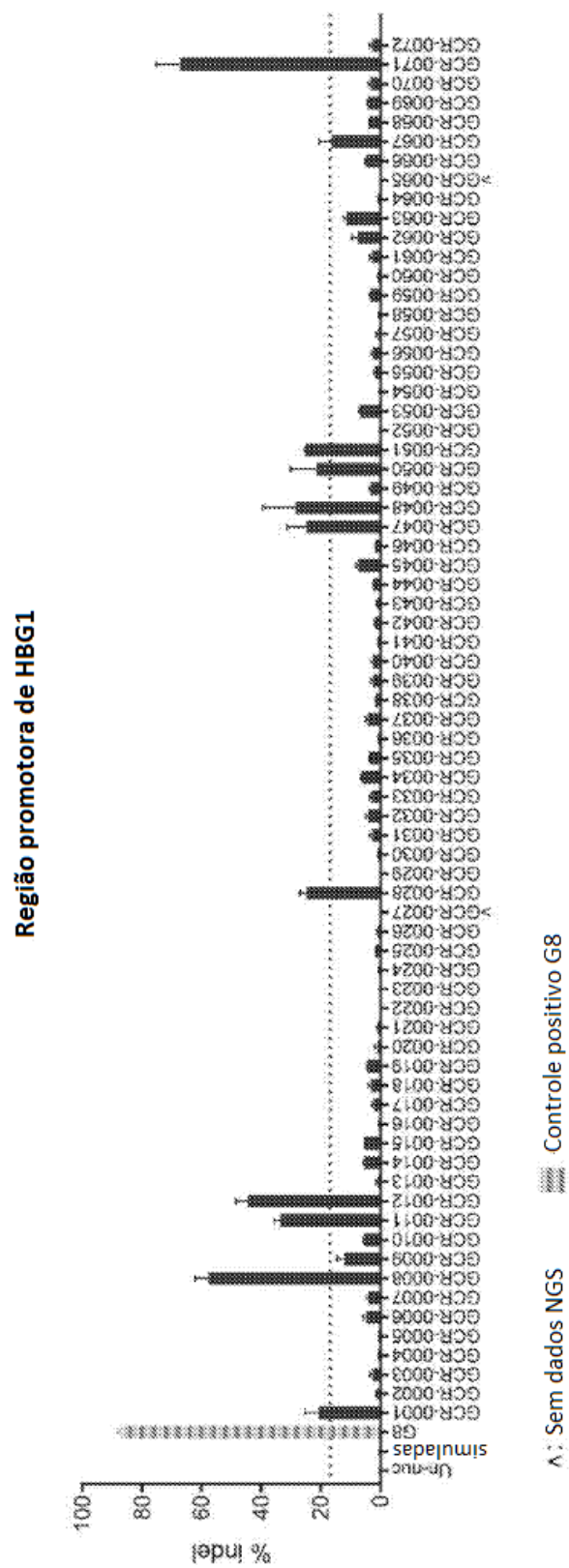


Figura 3

Região promotora de HBG2

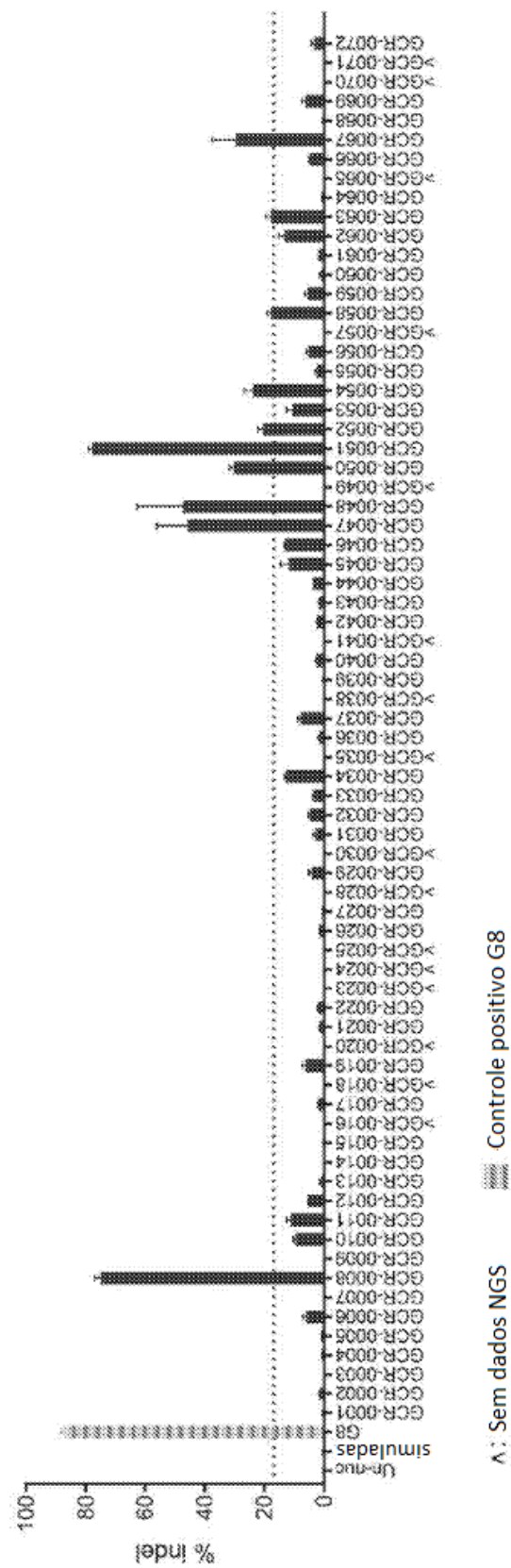


Figura 4

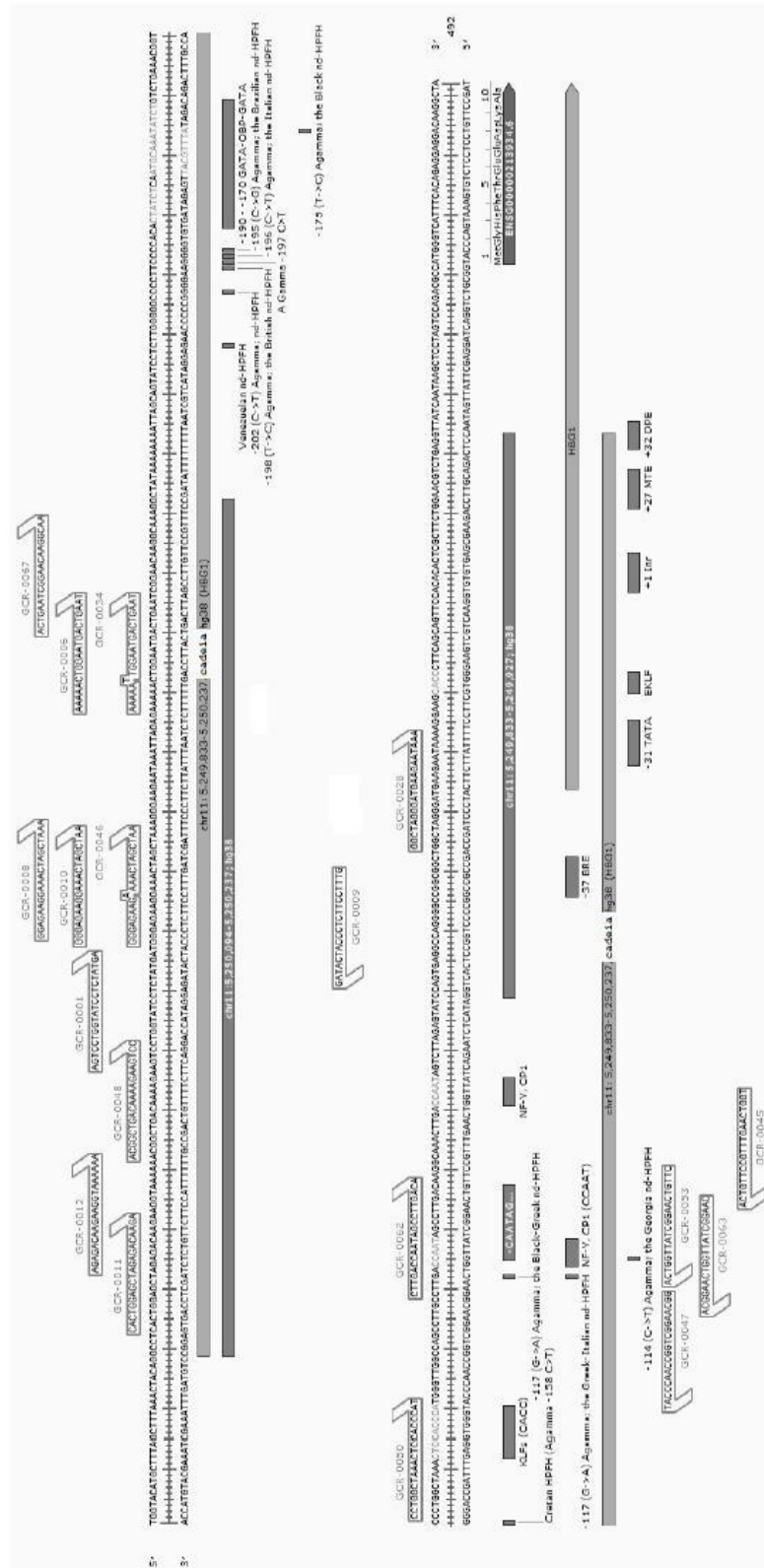


Figura 5

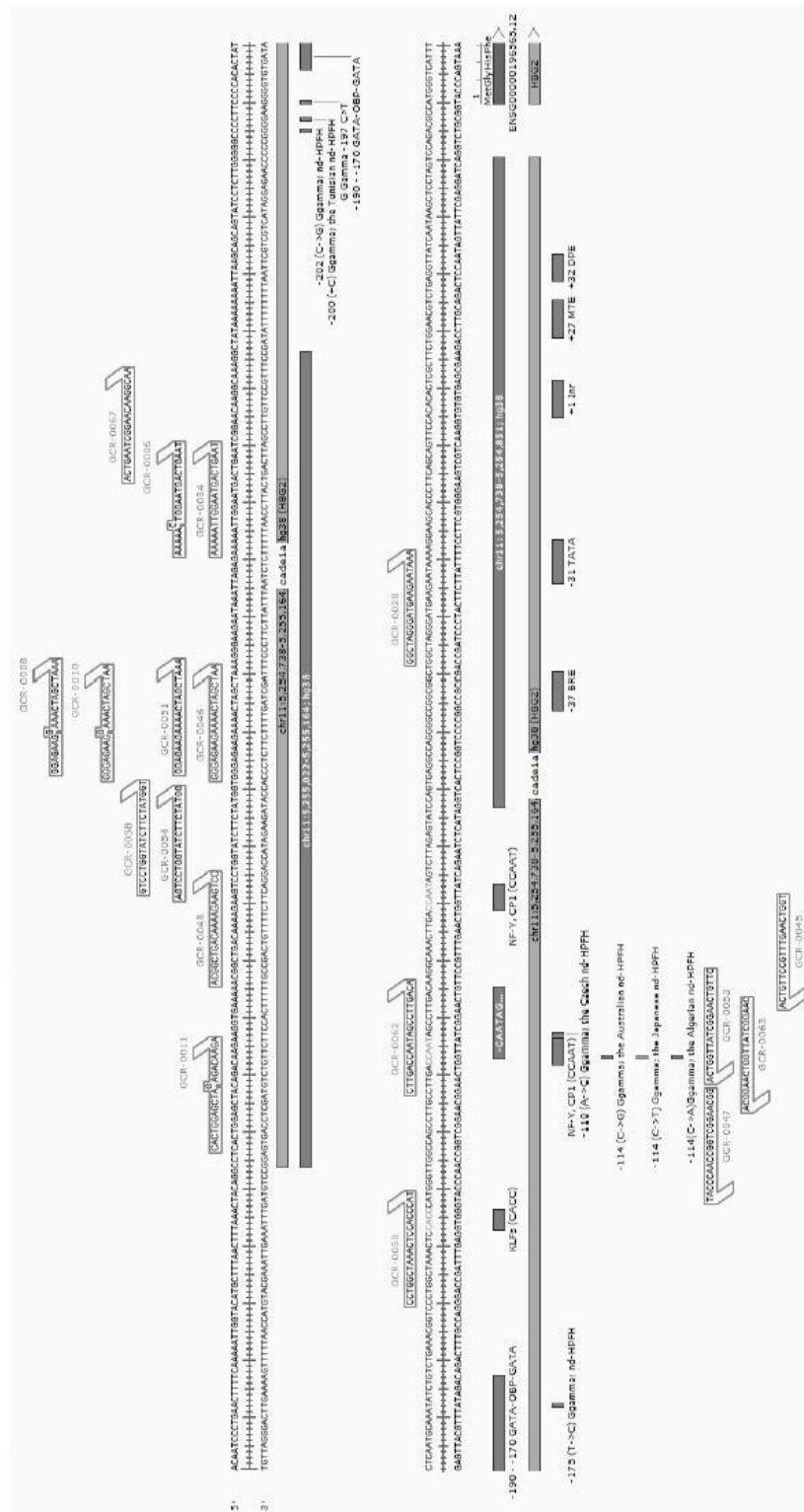
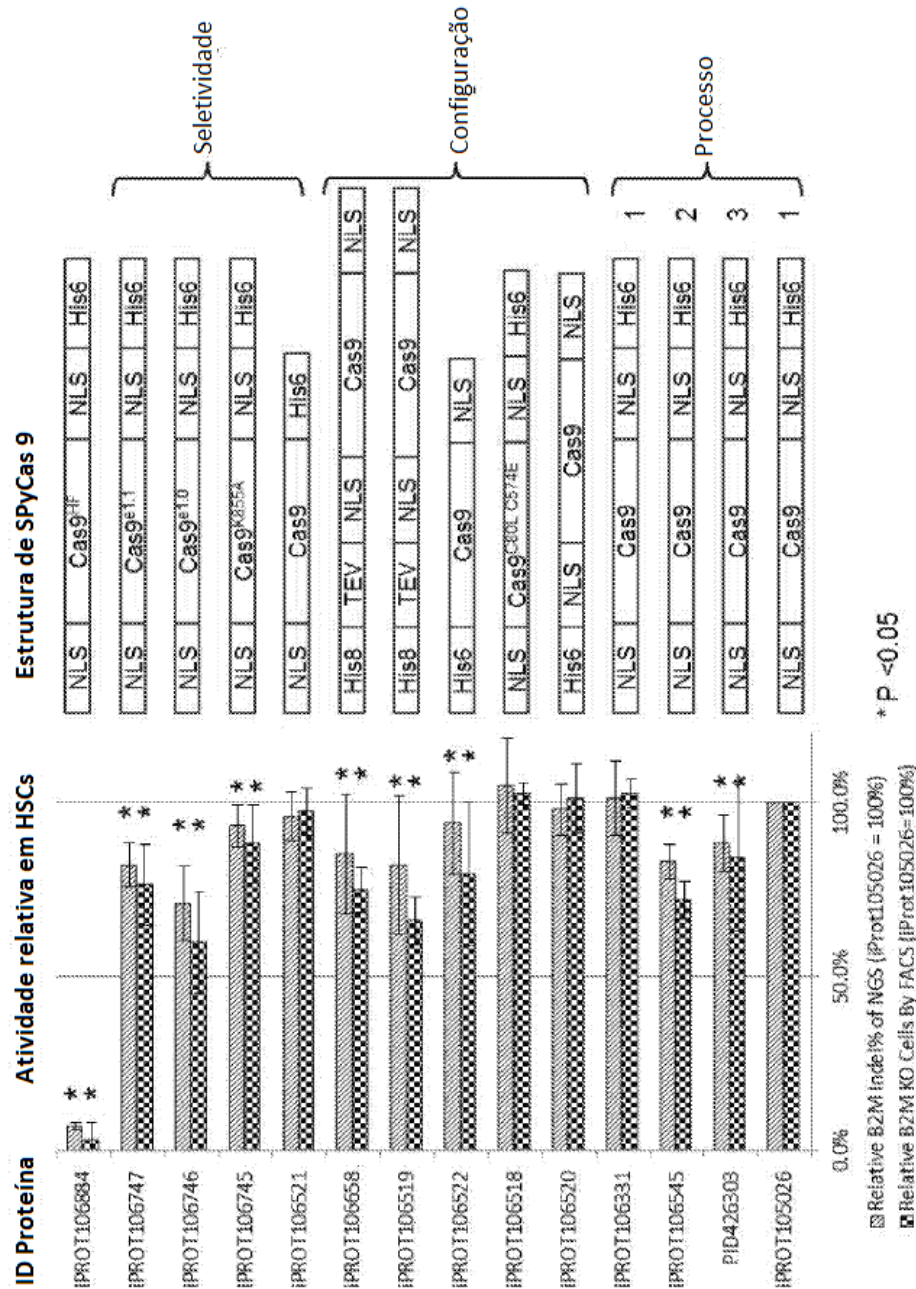


Figura 6



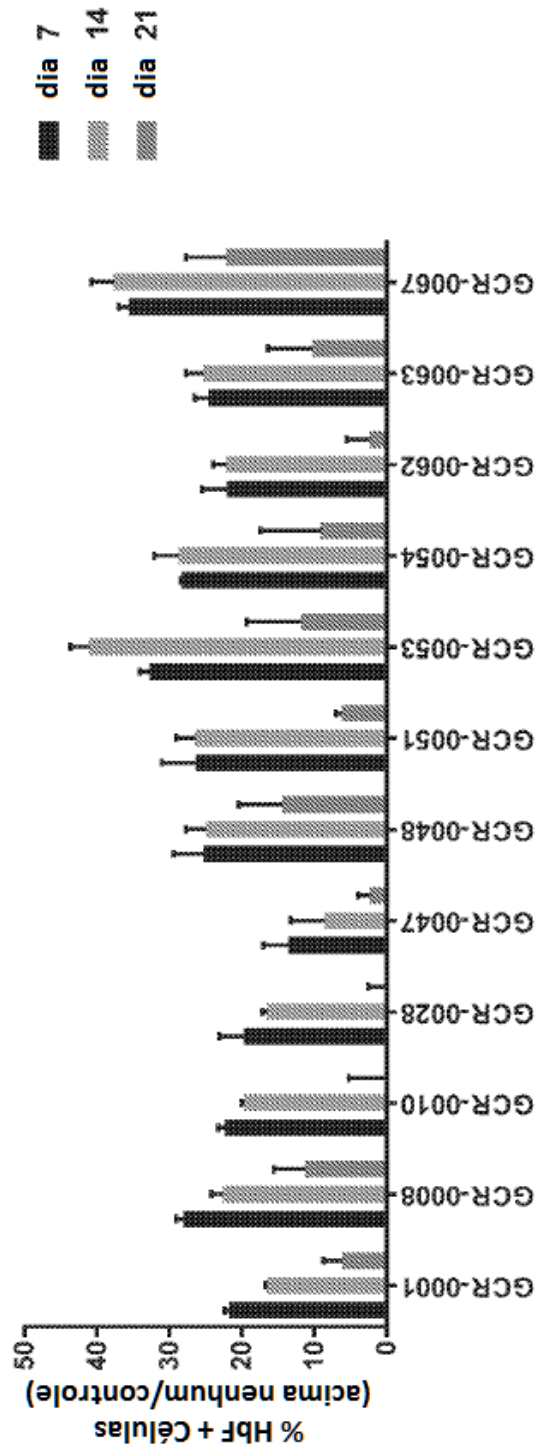


Figura 7

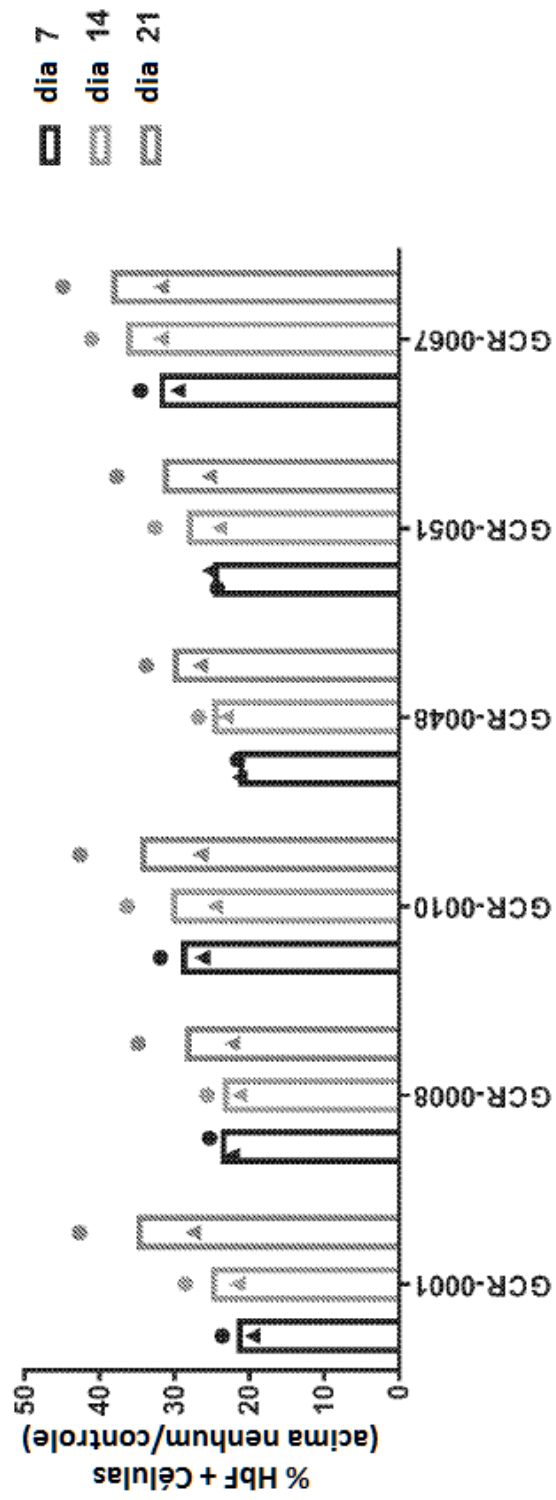


Figura 8

Figura 9

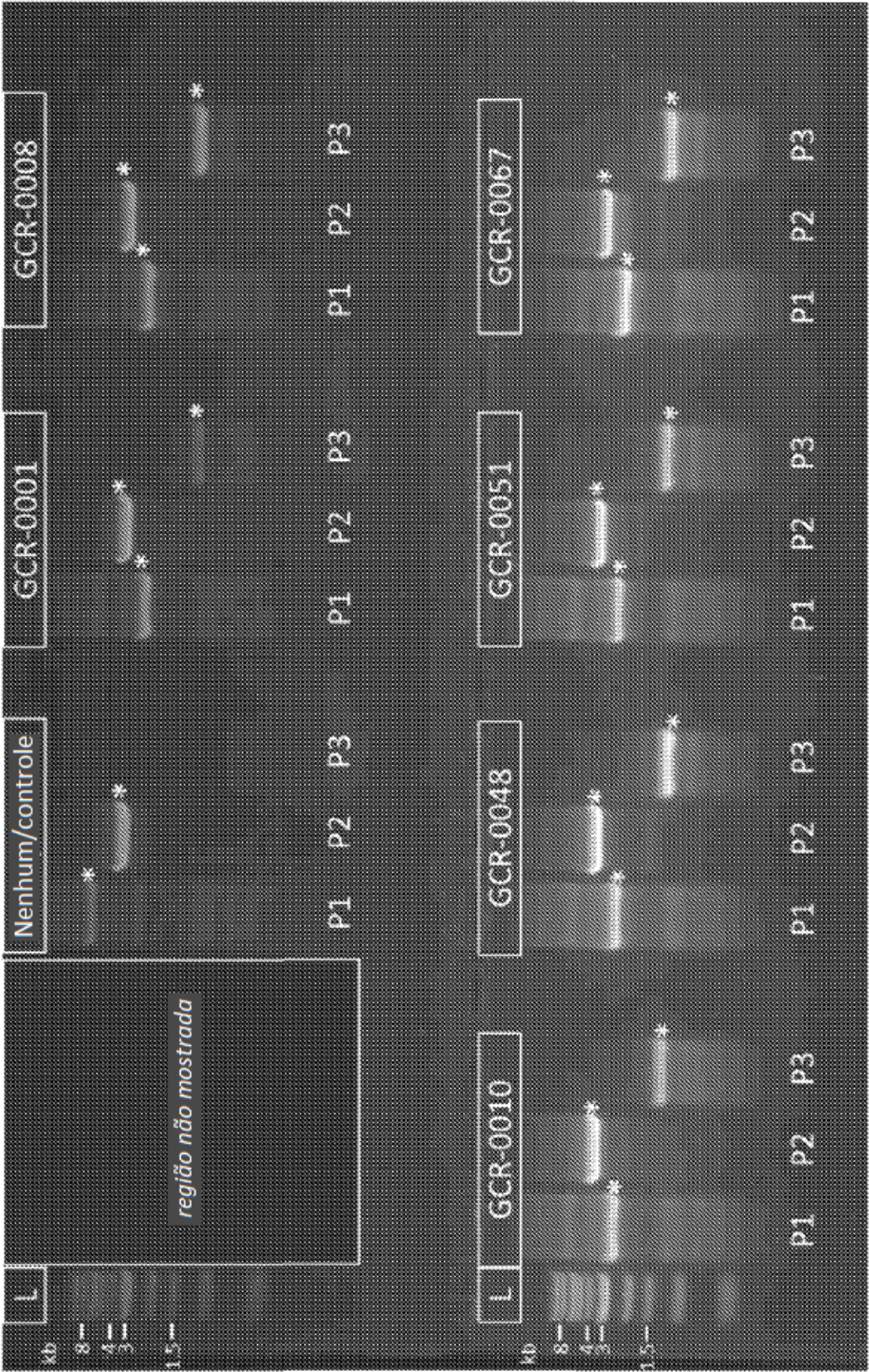


Figura 10



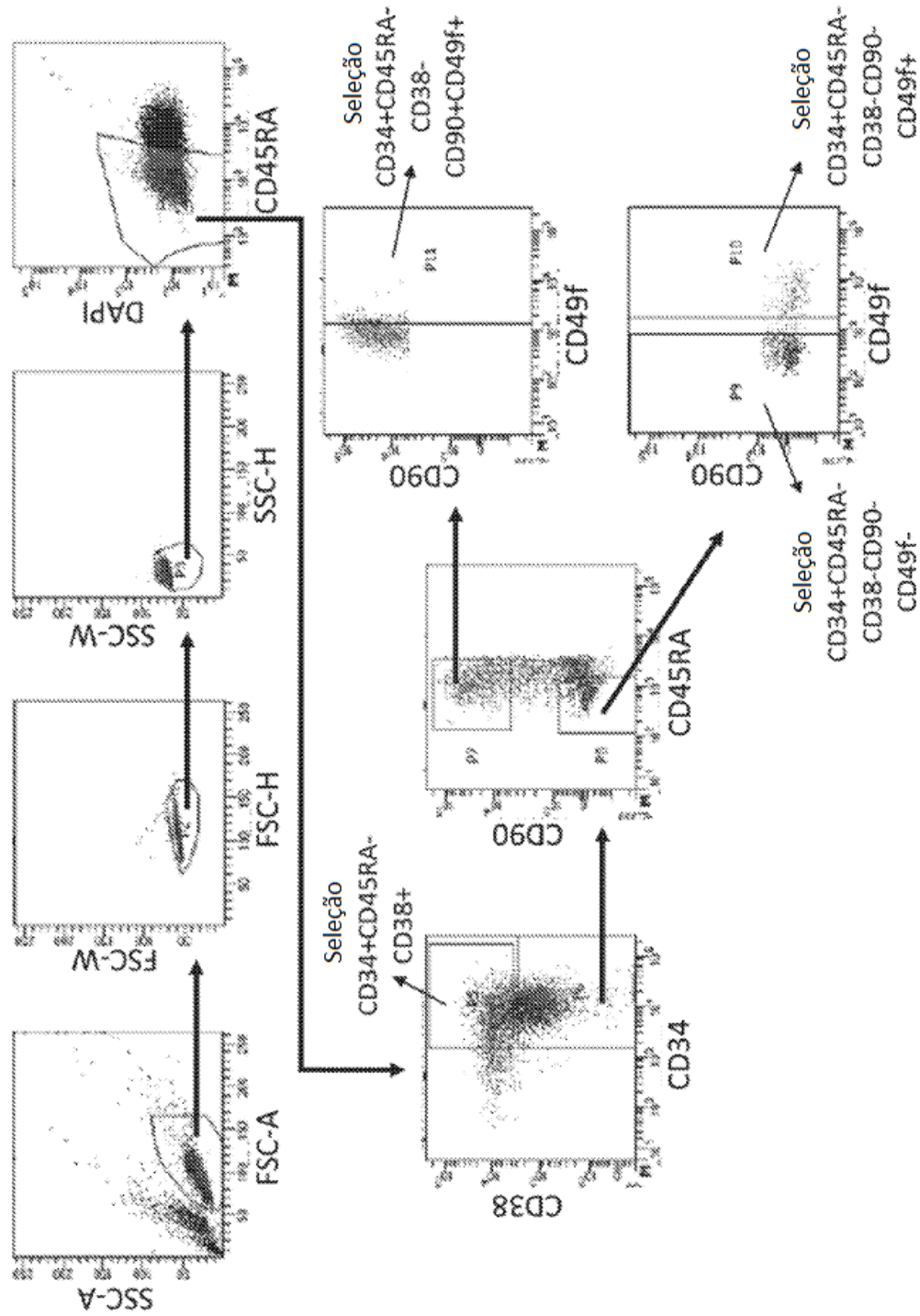


Figura 11

Figura 12

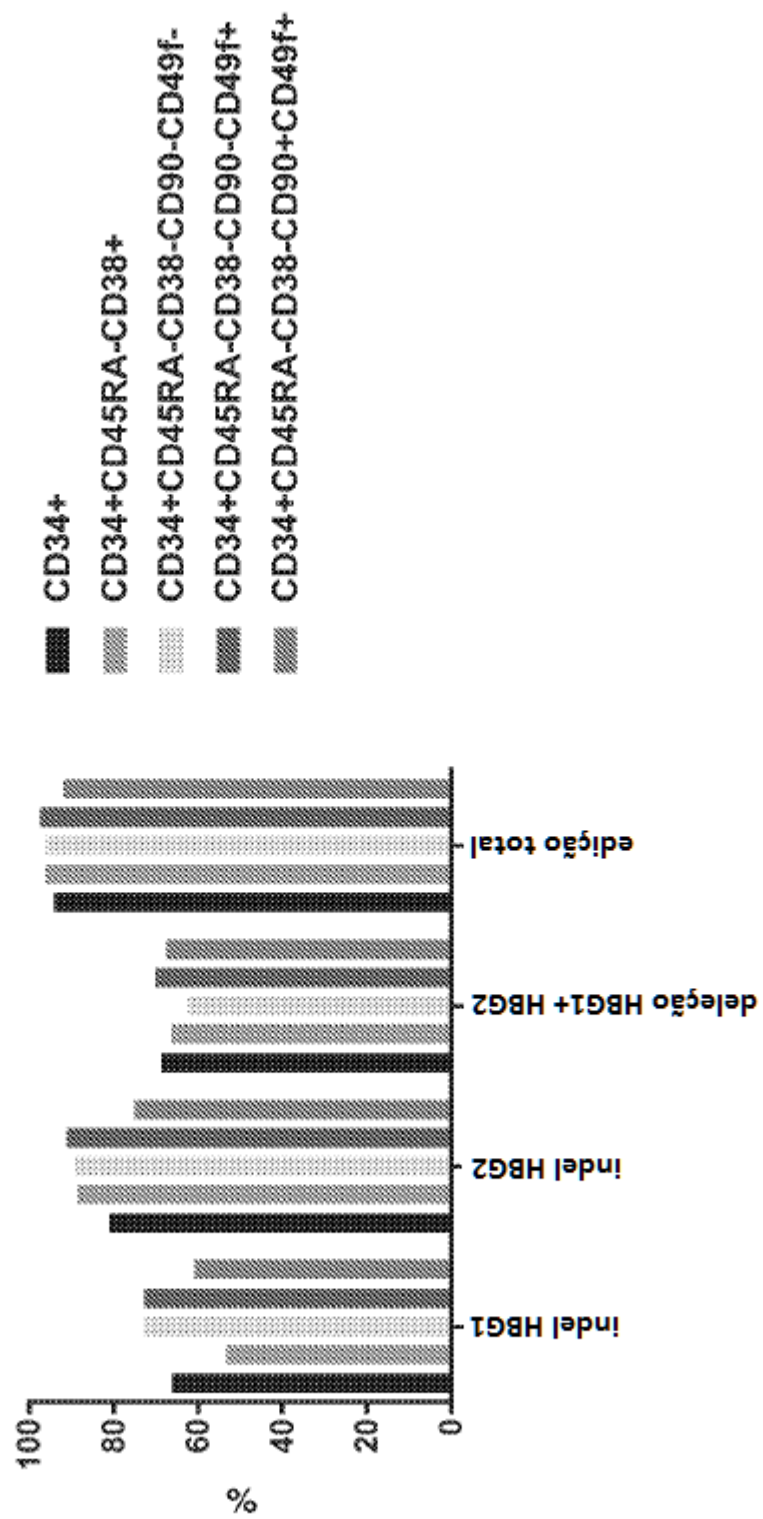


Figura 13A

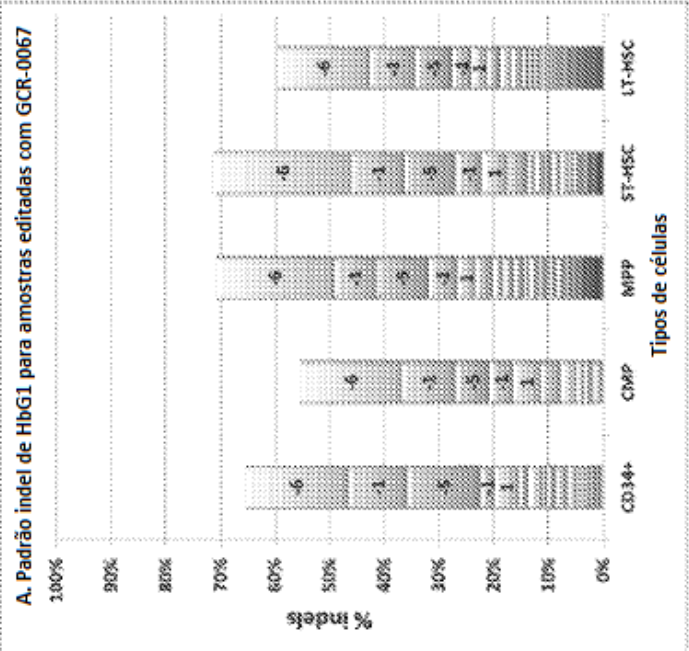


Figura 13B

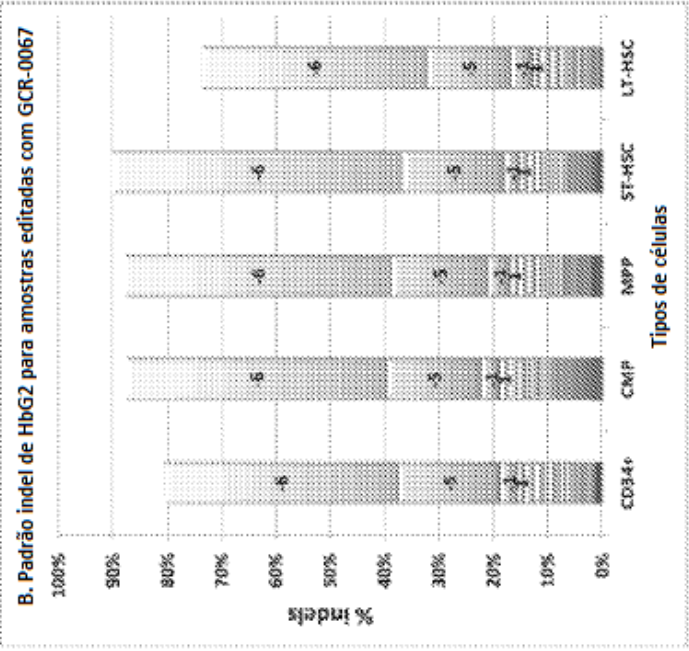


Figura 14

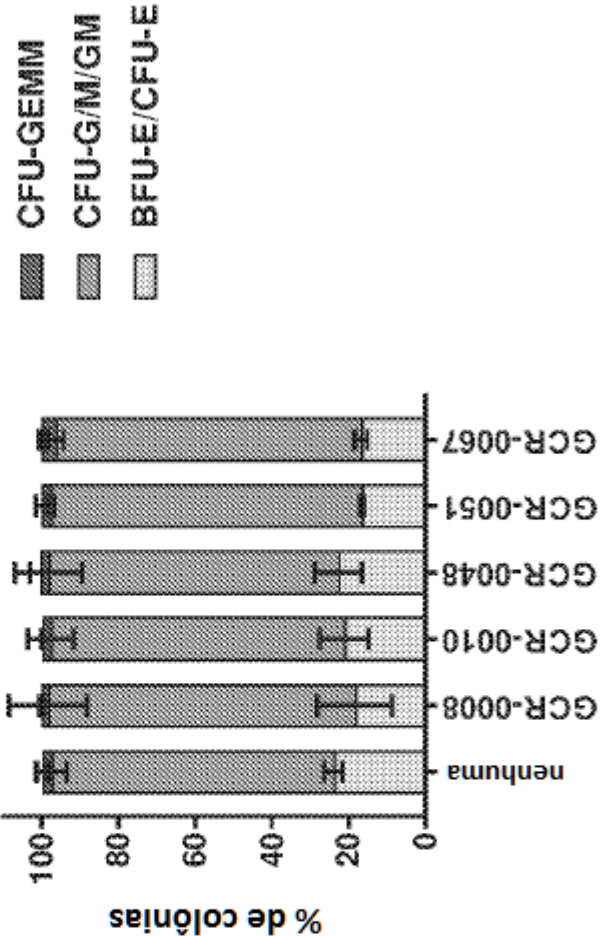


Figura 15

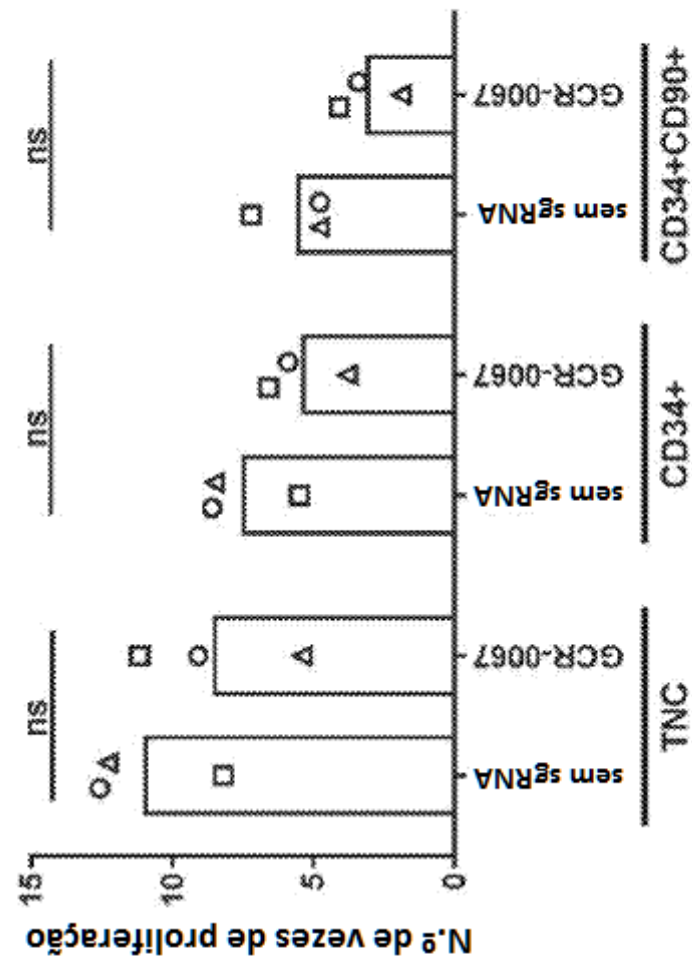


Figura 16

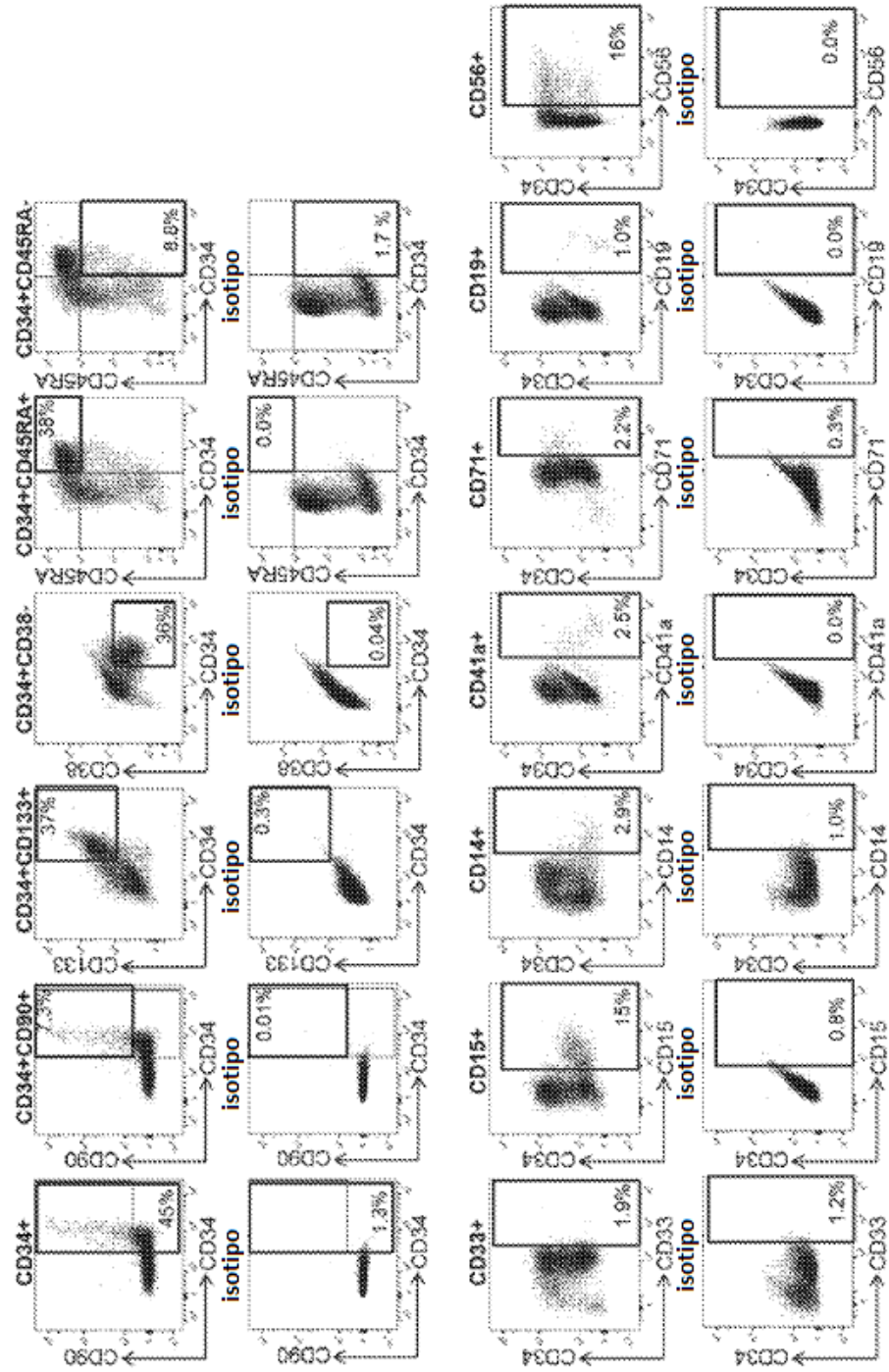


Figura 17

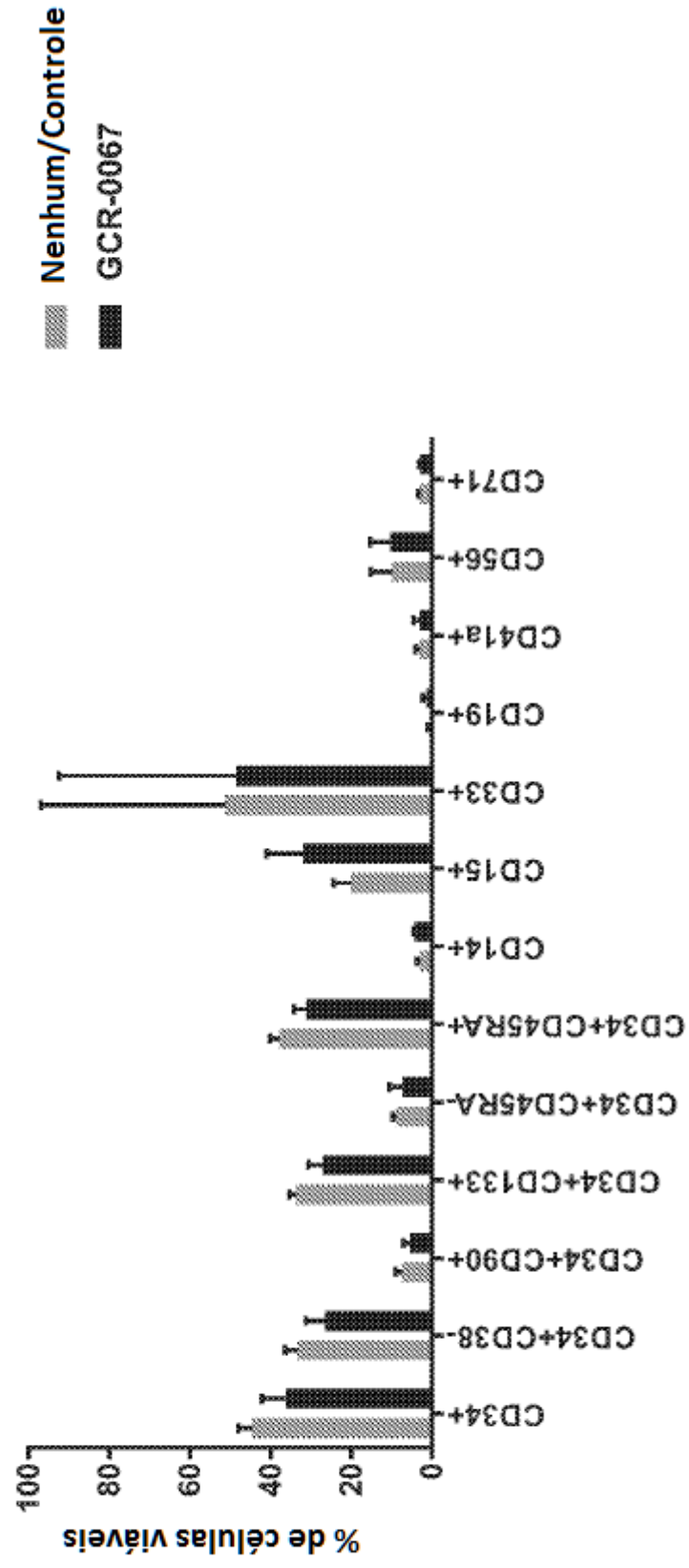


Figura 18A

SCD1 simulado editado

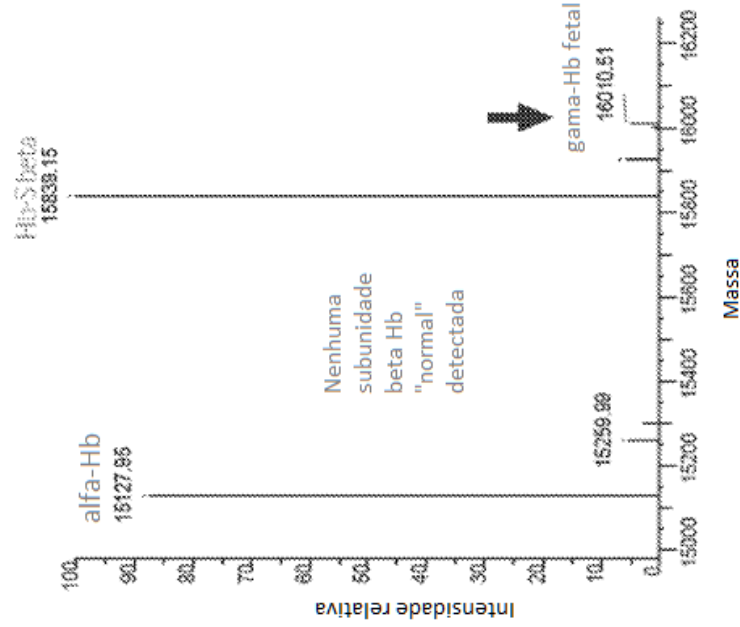


Figura 18B

SCD1 simulado editado com sg0067

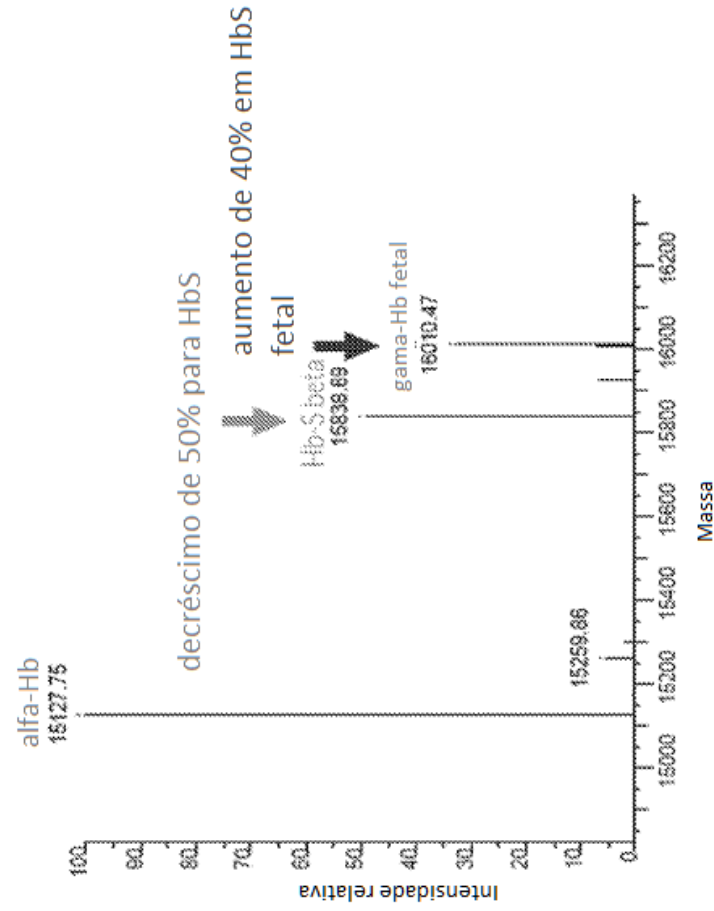


Figura 19

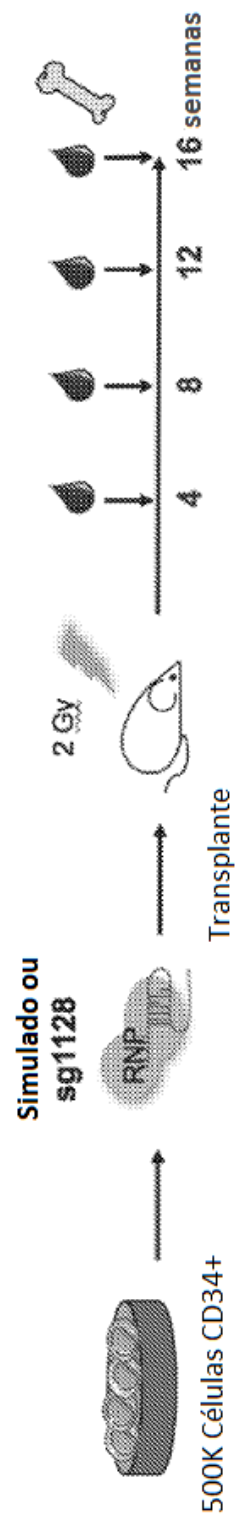


Figura 20

BM

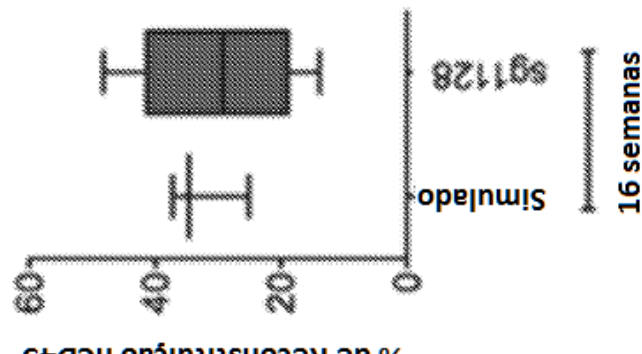


Figura 21

Reconstituição de várias linhagens em Sangue Periférico e Medula Óssea

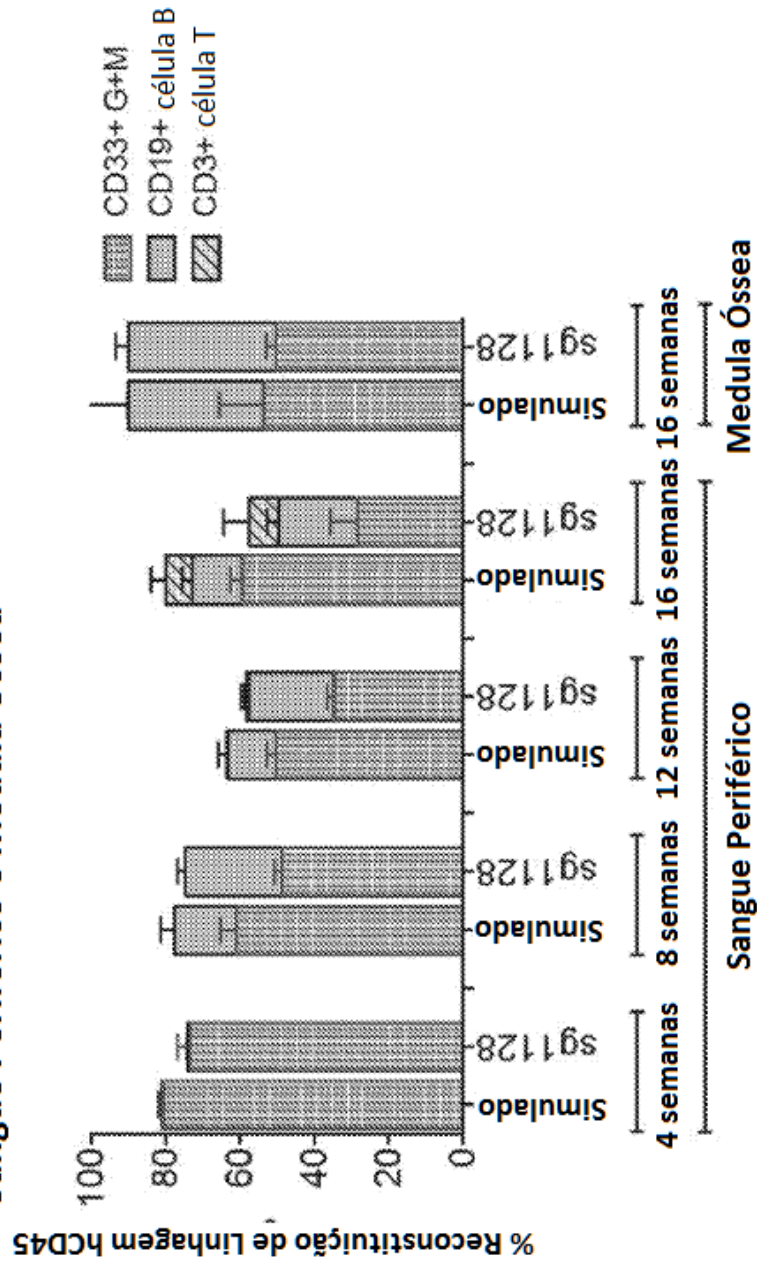


Figura 22

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
	Simulado - com Cas9, sem gRNA	sg1128	sg0008	sg0051	sg0010	sg0048	sg0067
sgRNA	Simulado	sg G1128	sg G0008	sg G0051	sg G0010	sg G0048	sg G0067
500,00 Células/ camundongo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
N=	10	10	10	10	10	10	10

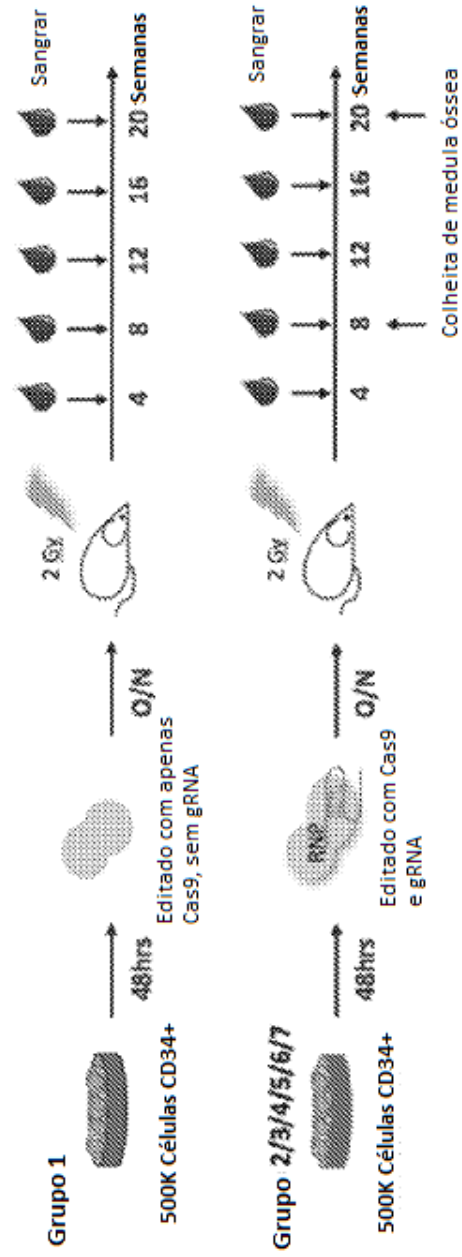


Figura 23

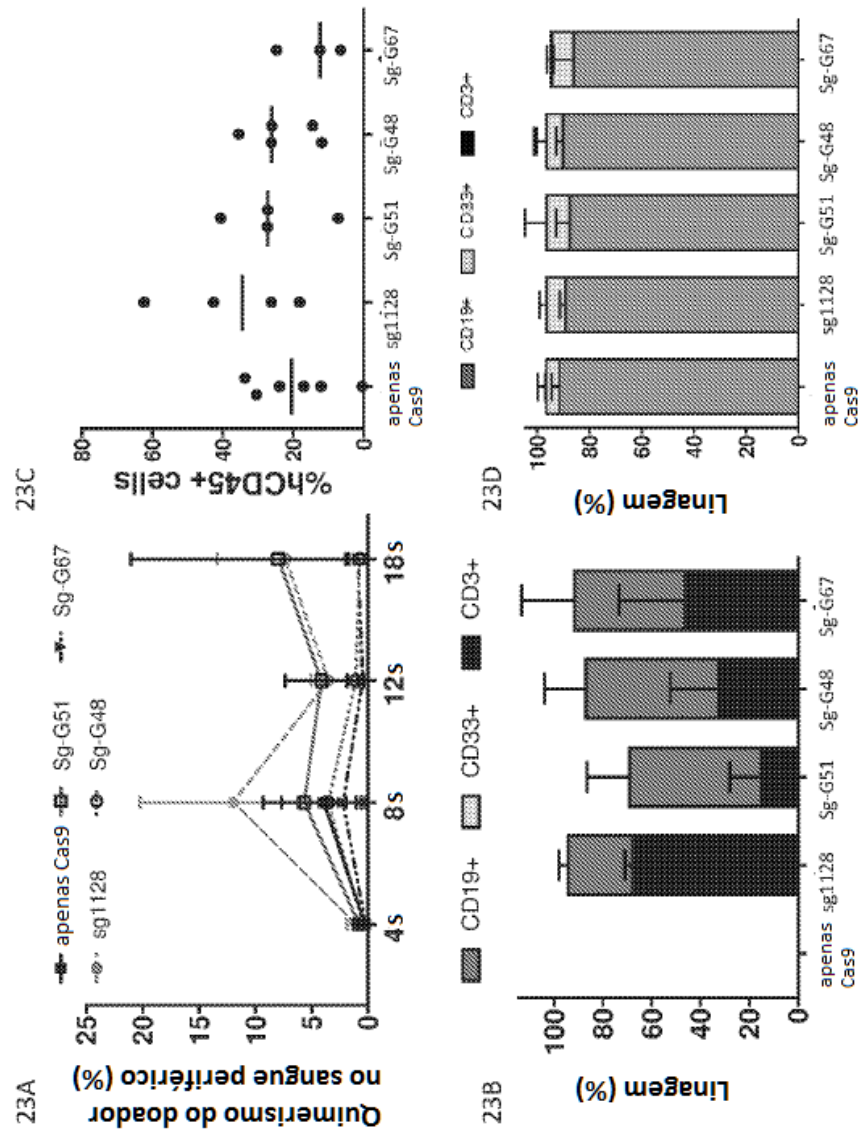


Figura 23 (continuação)

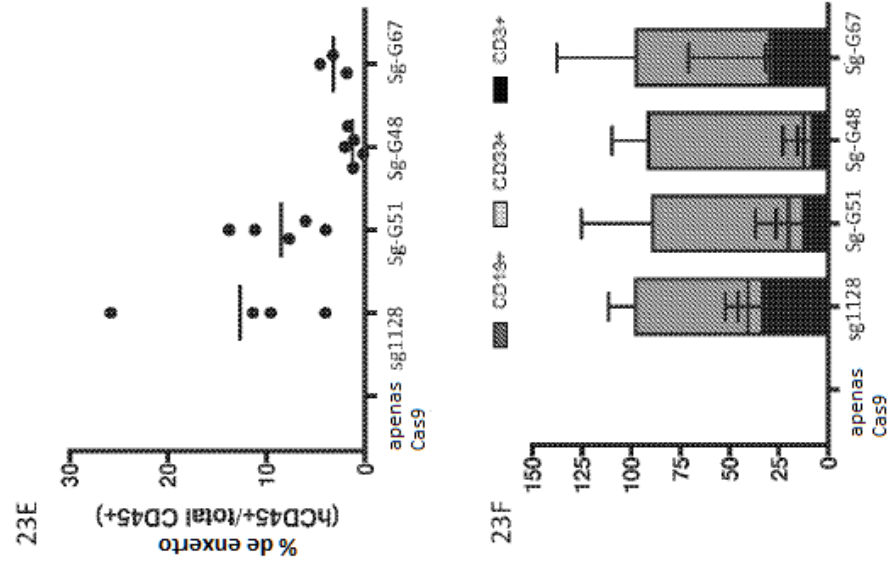


Figura 24A

Eficiência de enxerto na medula óssea às 8 semanas pós-transplante

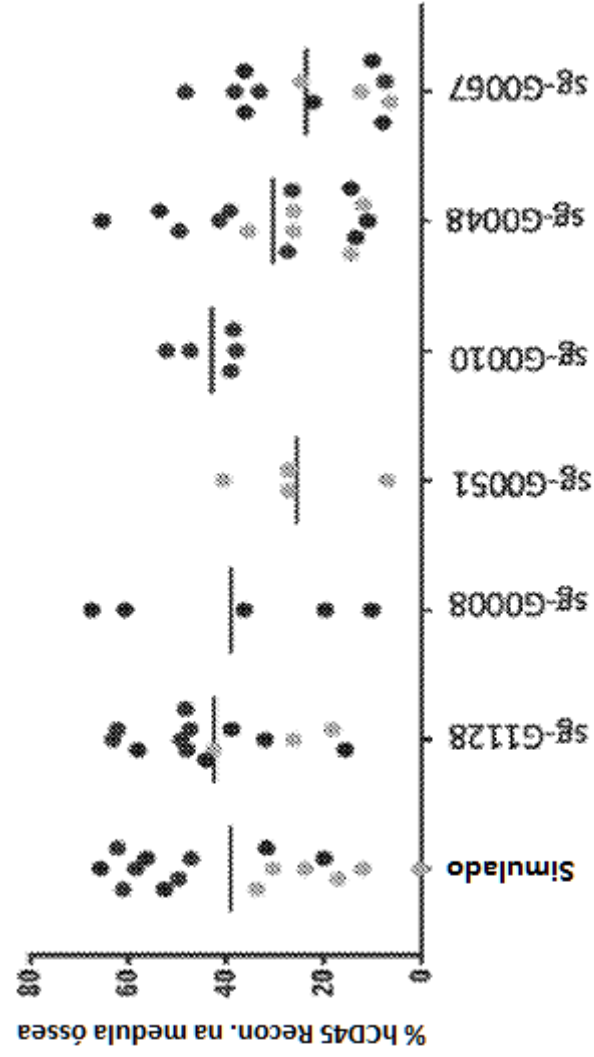


Figura 24B

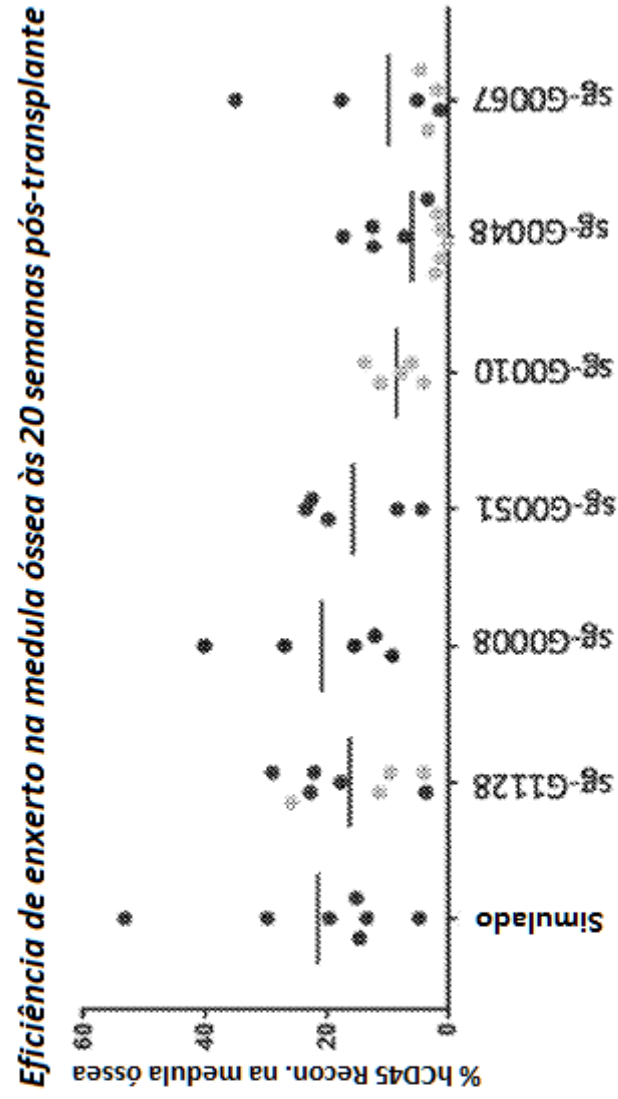


Figura 25

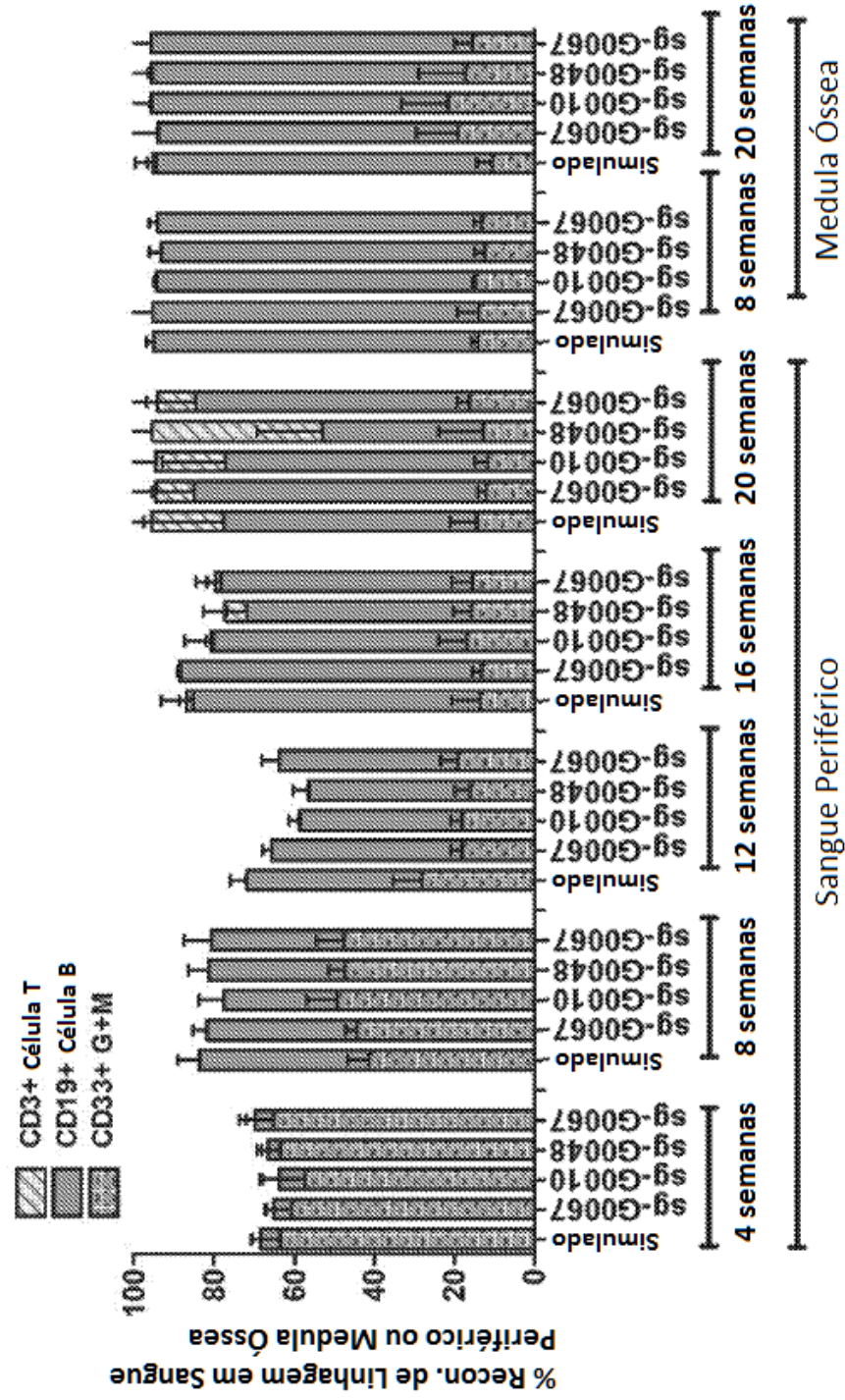


Figura 26

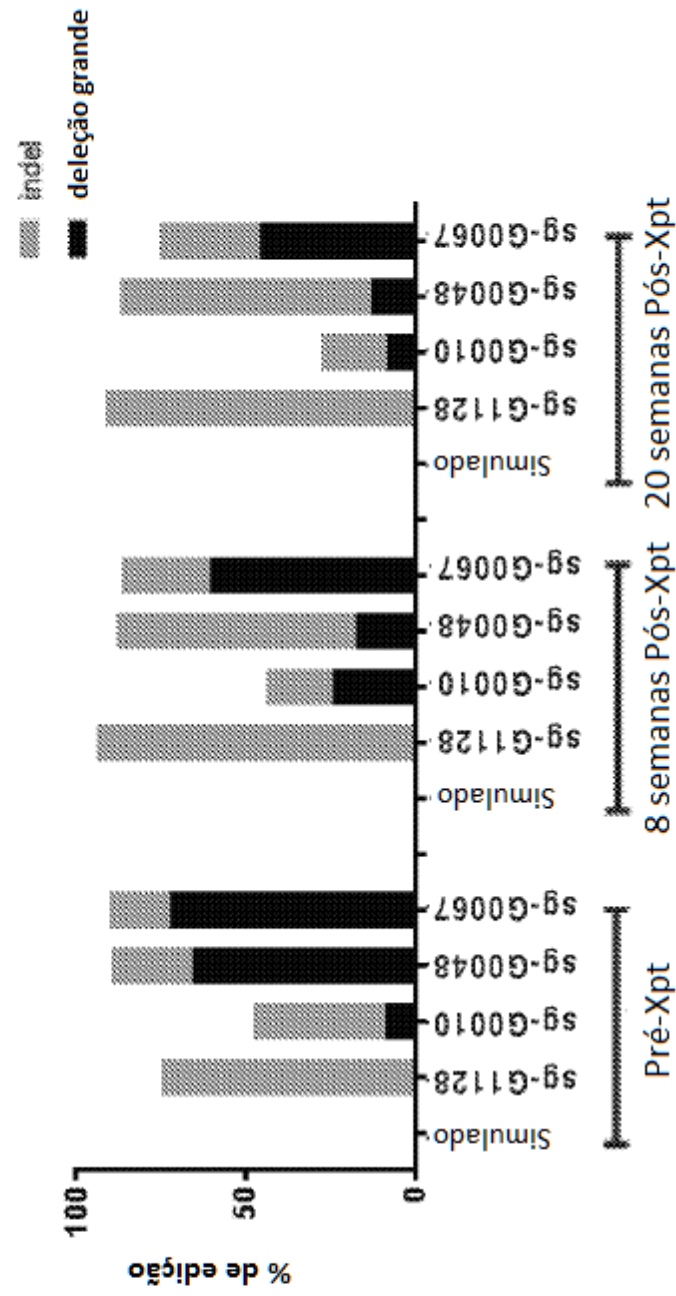


Figura 27

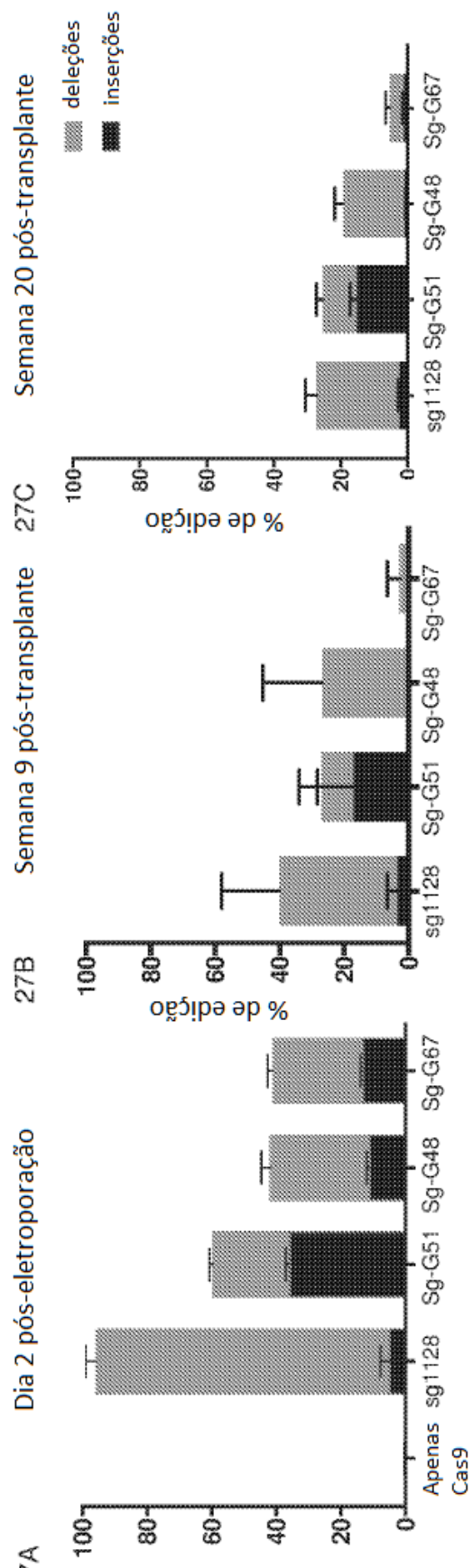


Figura 28

Produção de Células Fa partir de HSCs enxertadas

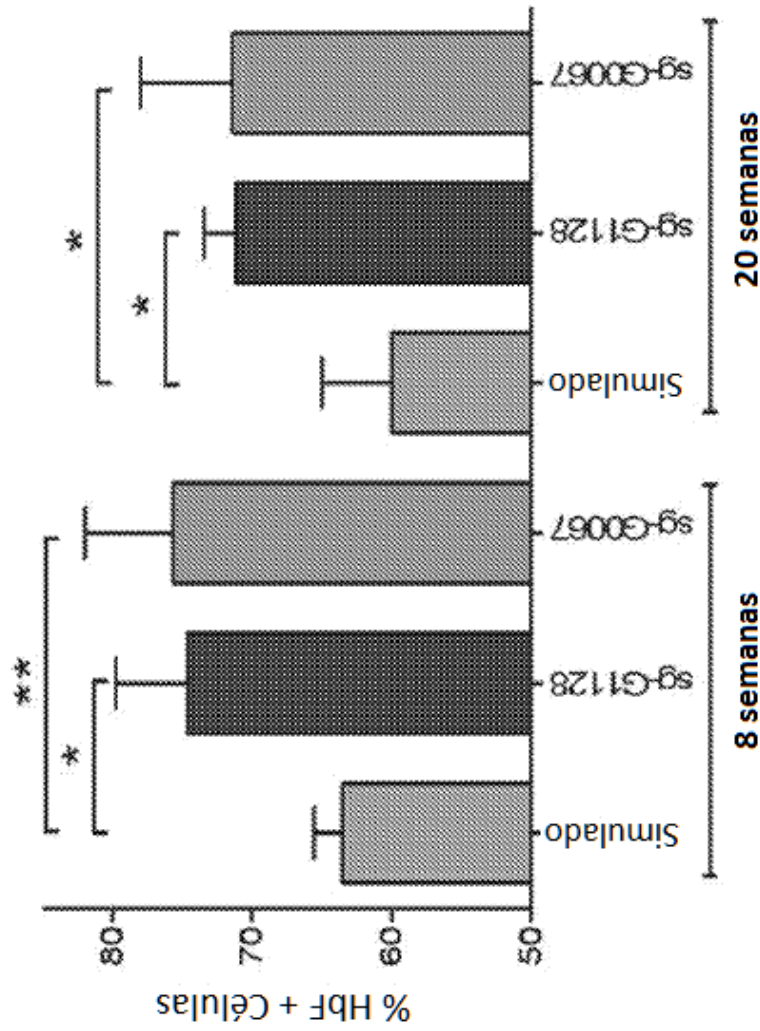


Figura 29

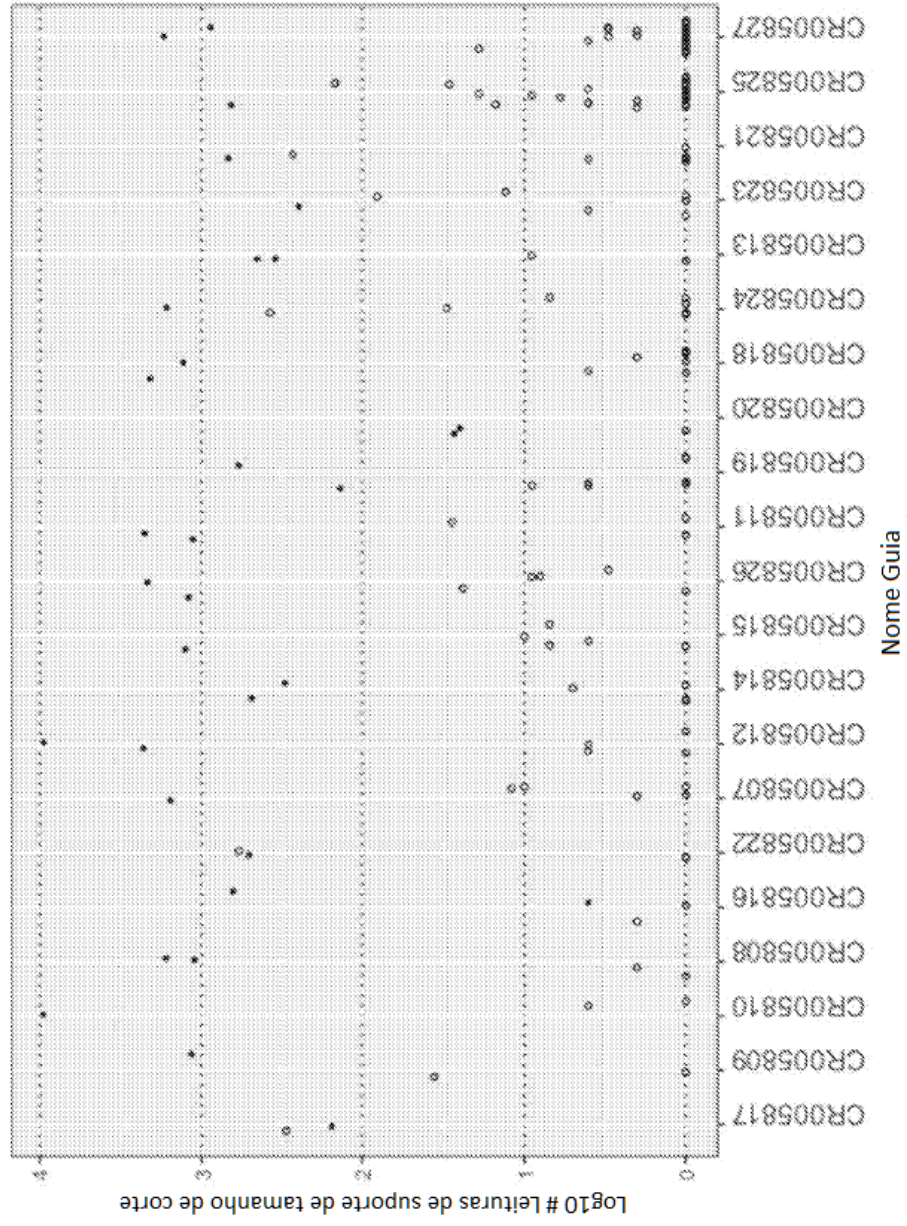


Figura 30

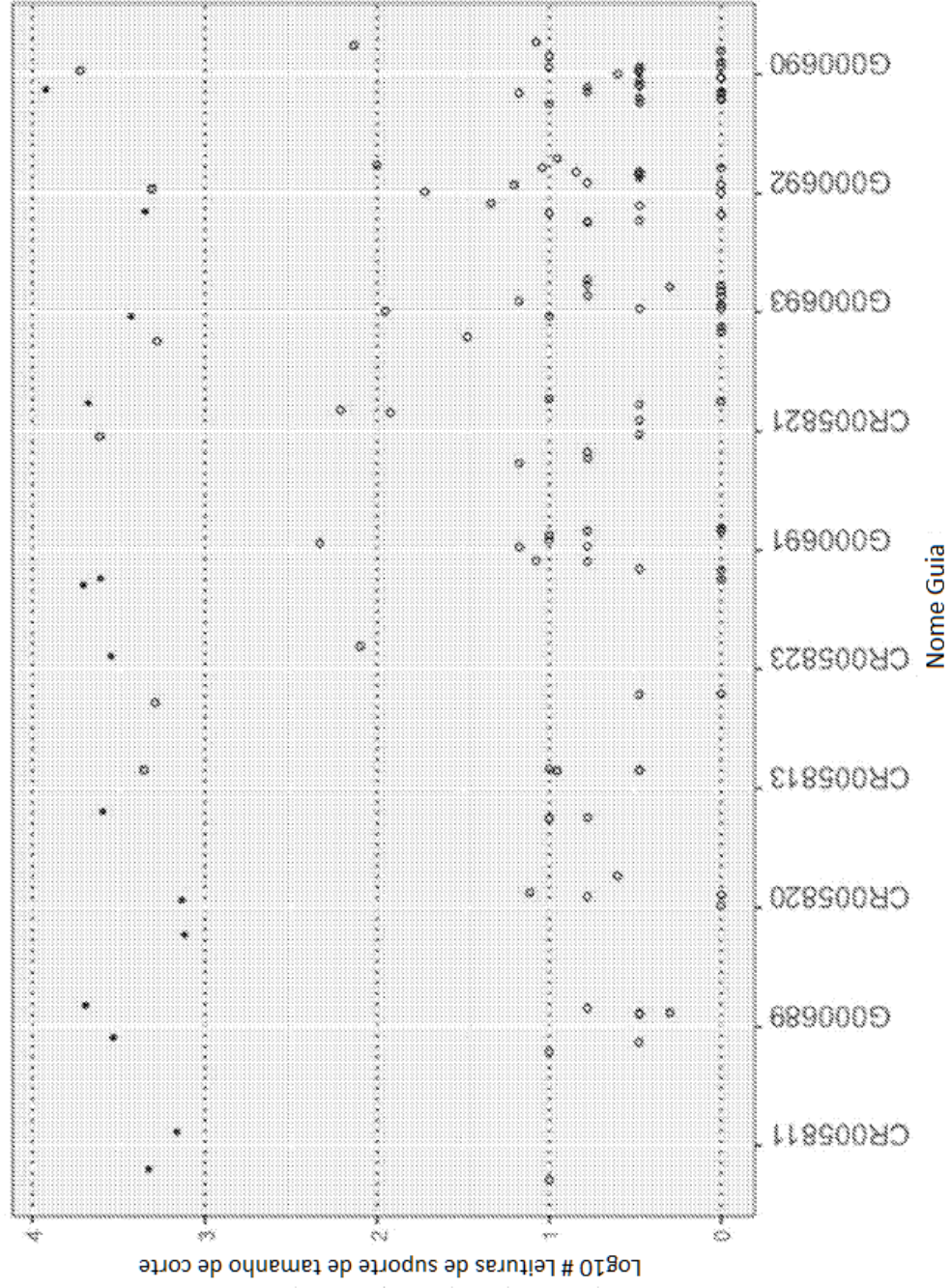


Figura 31A

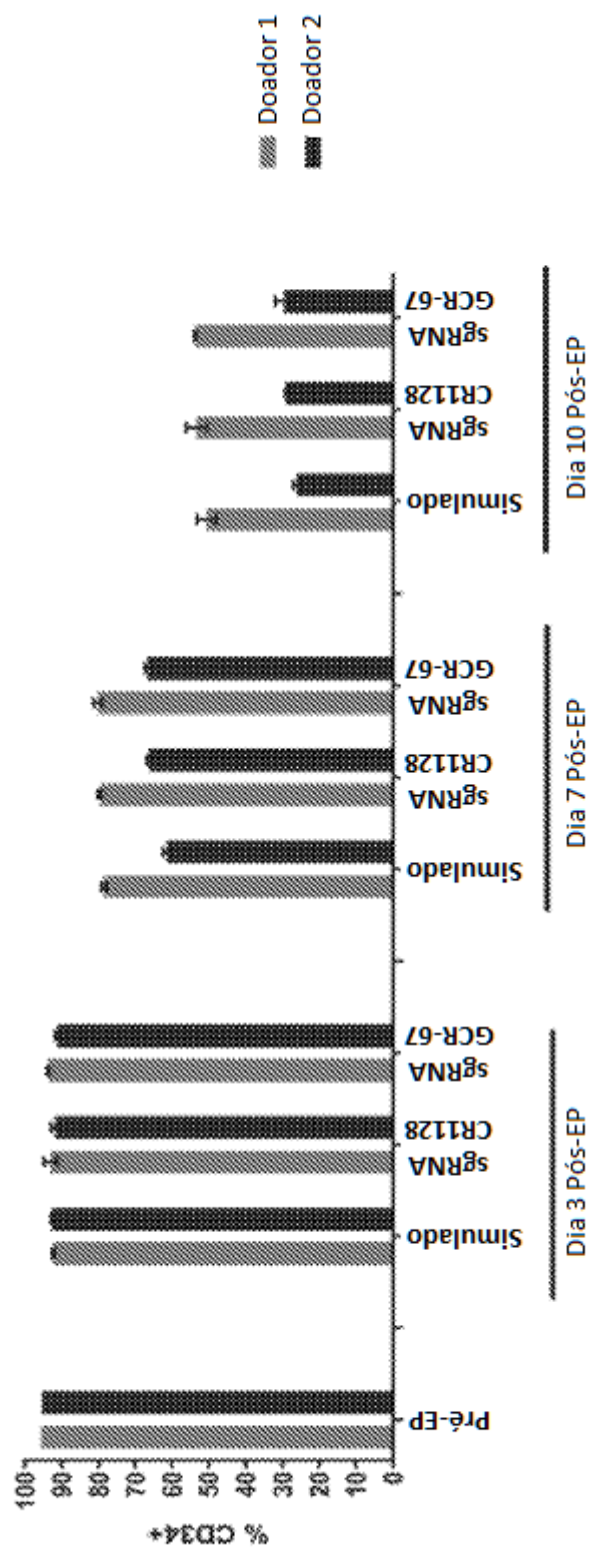


Figura 31B

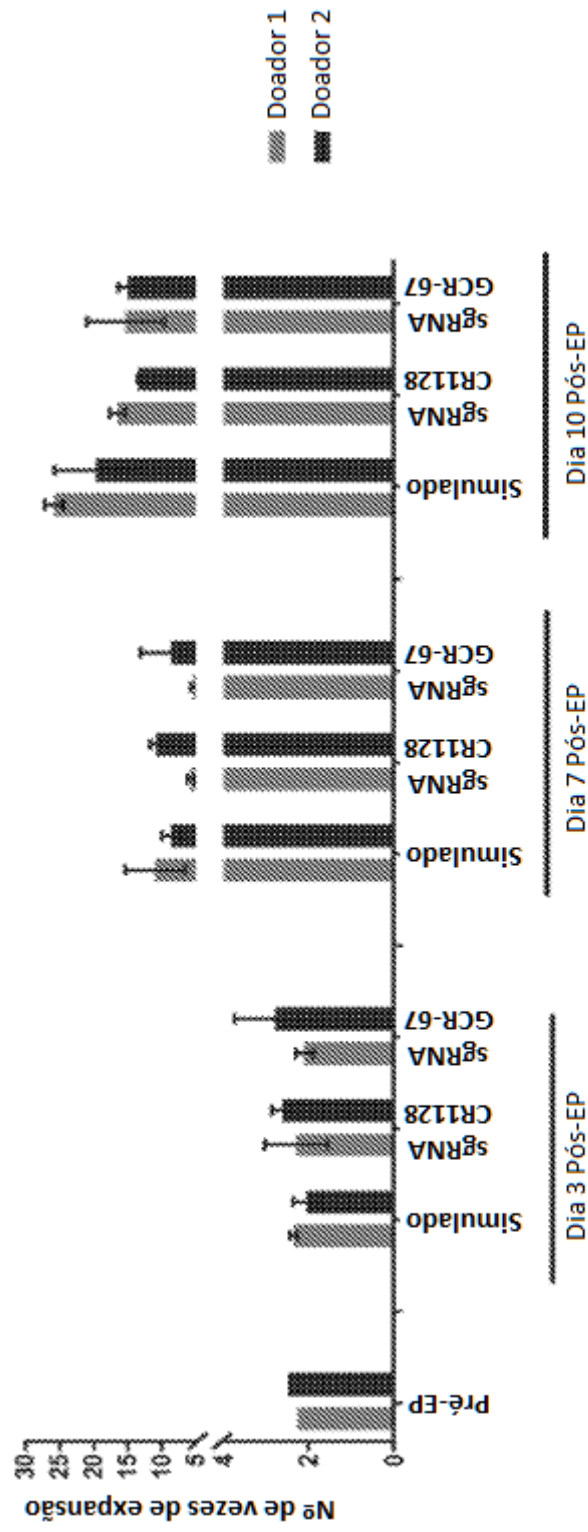
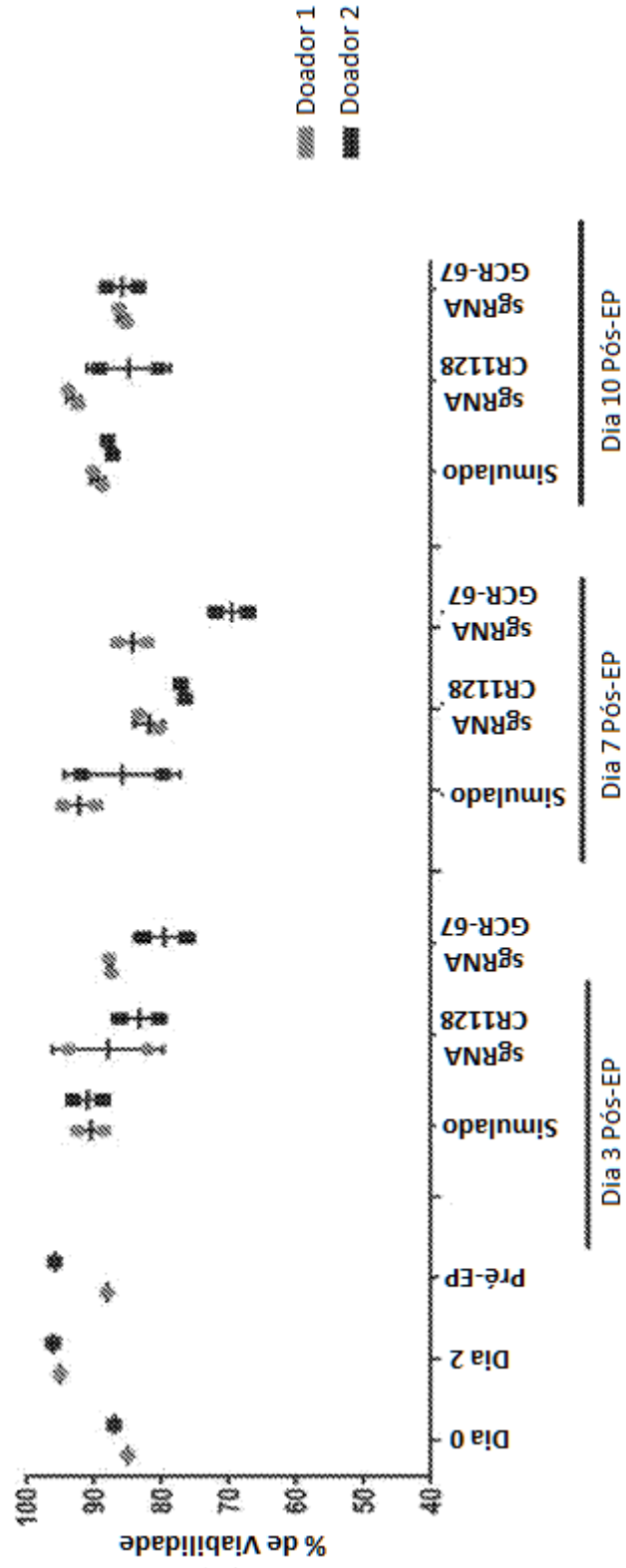


Figura 31C



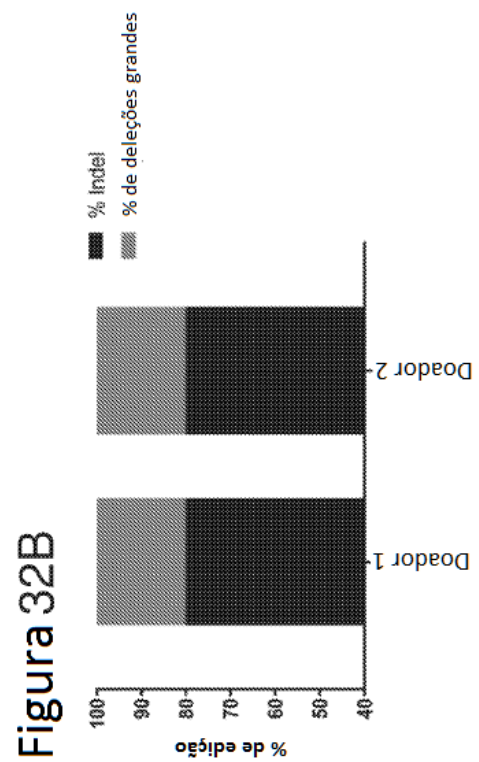
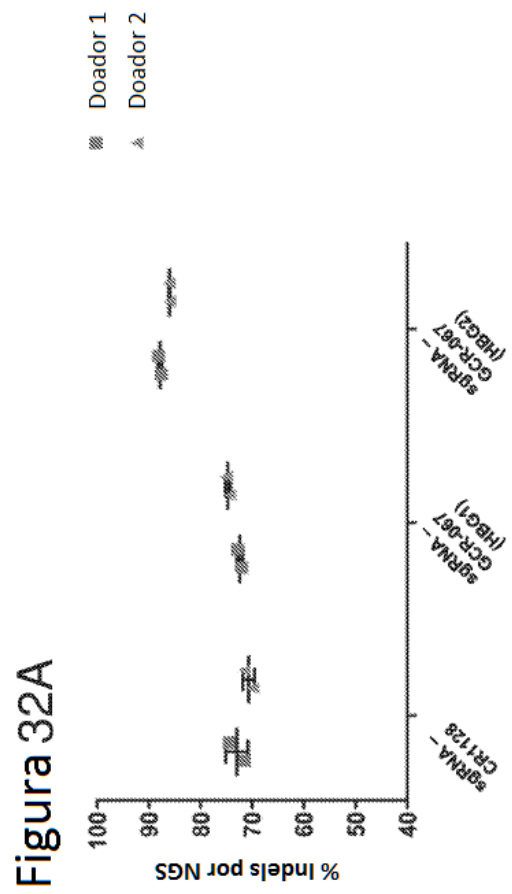


Figura 33

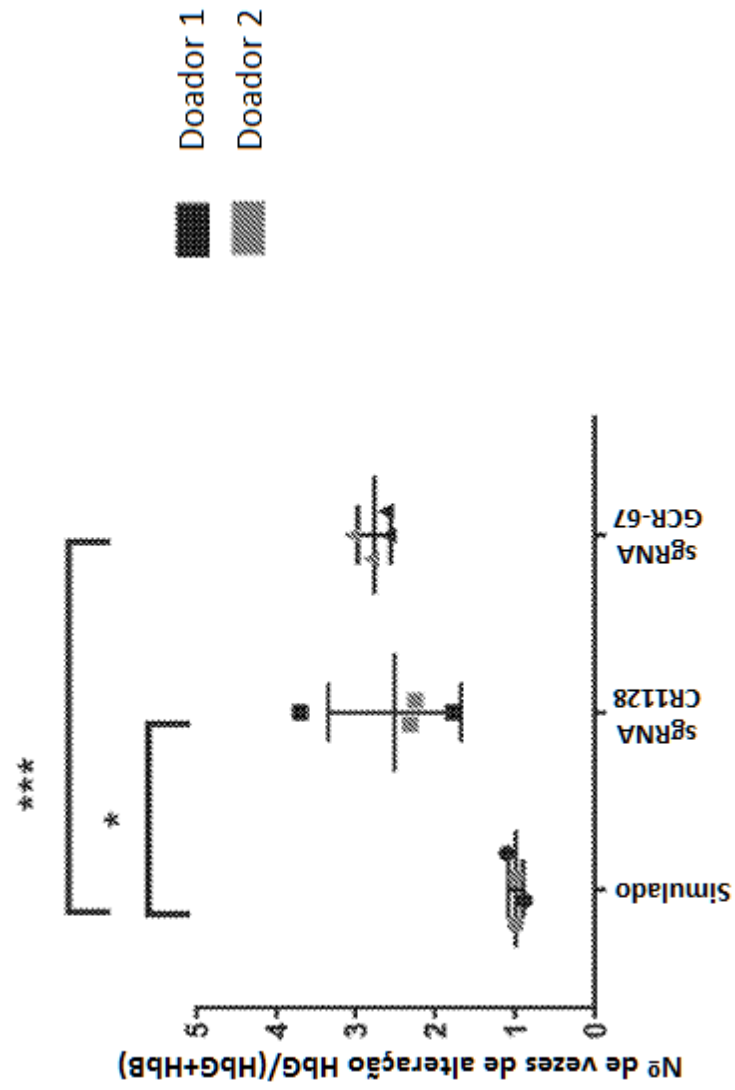


Figura 34

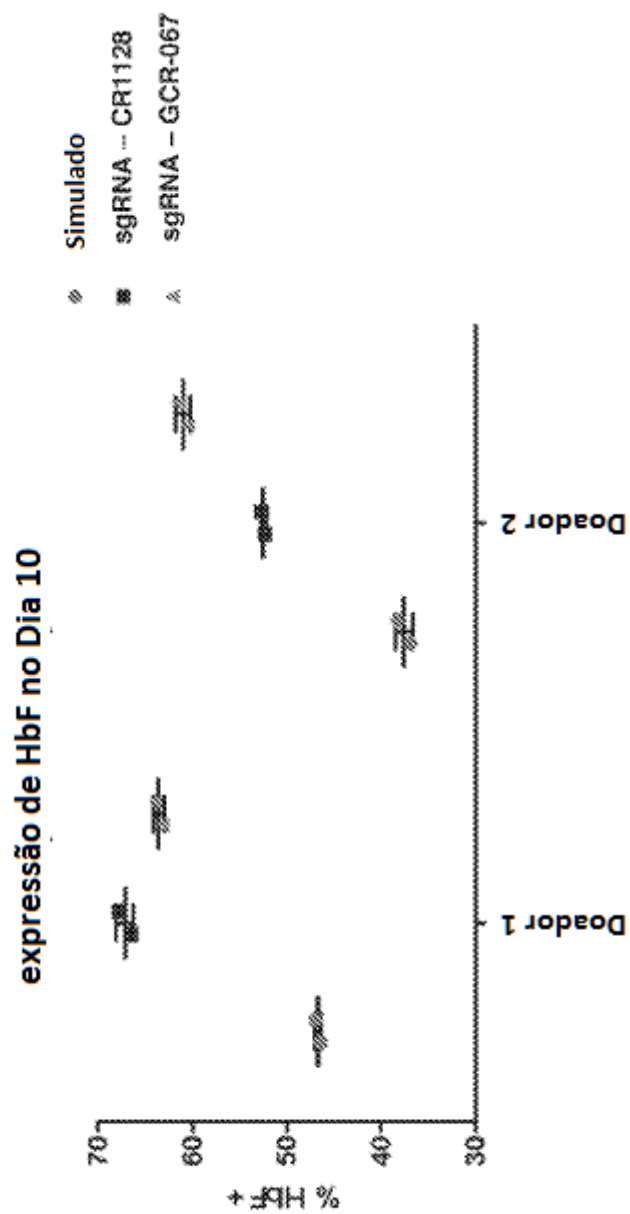


Figura 35

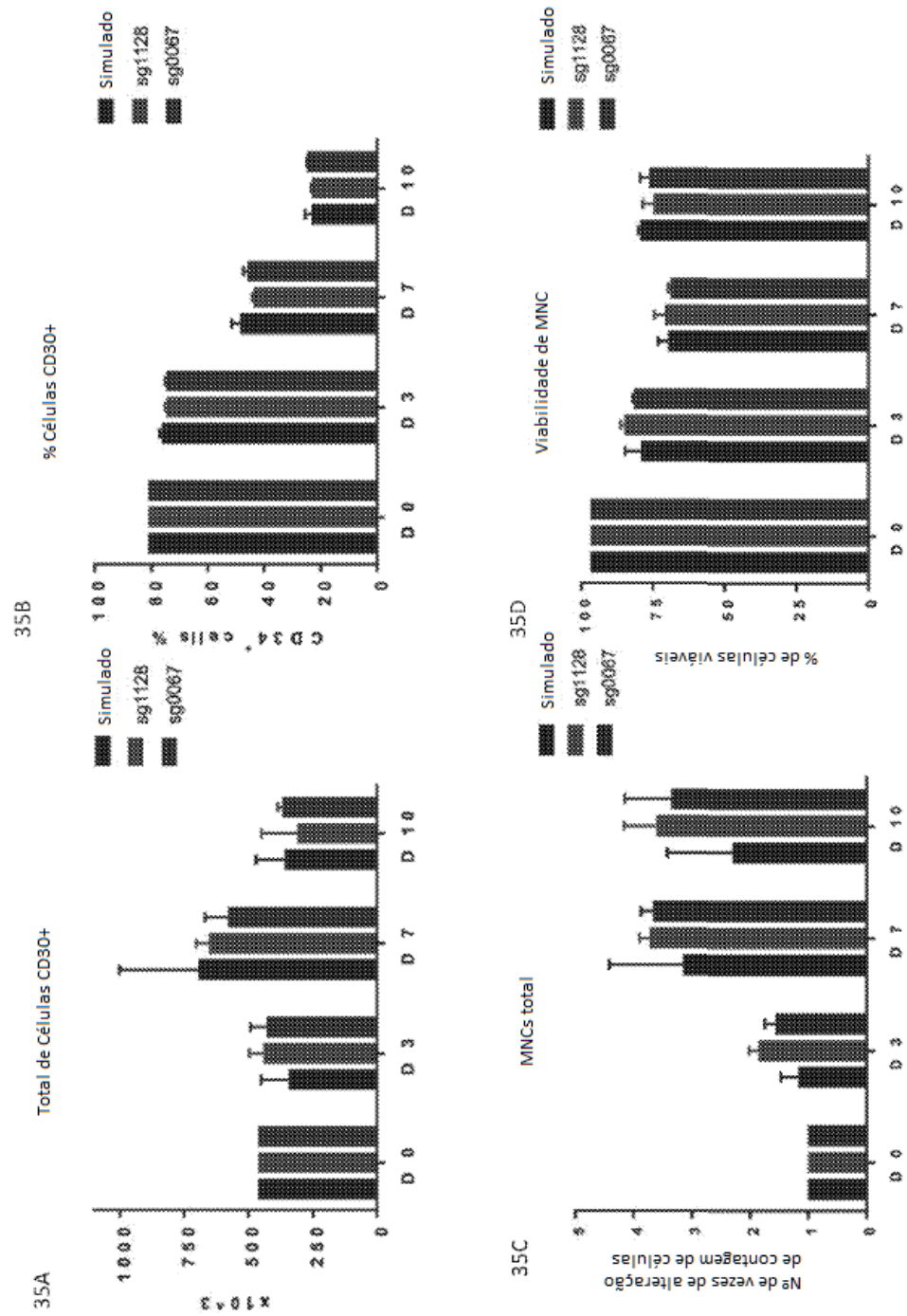


Figura 36

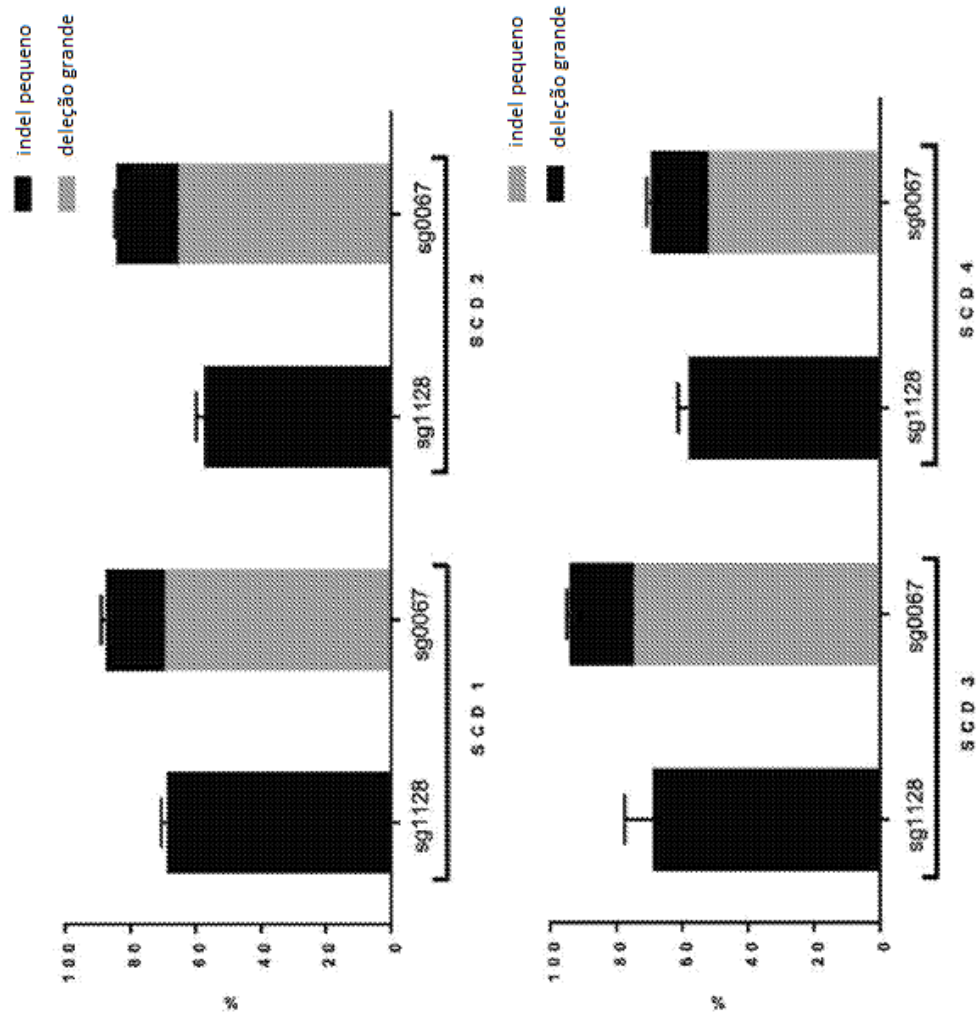


Figura 37

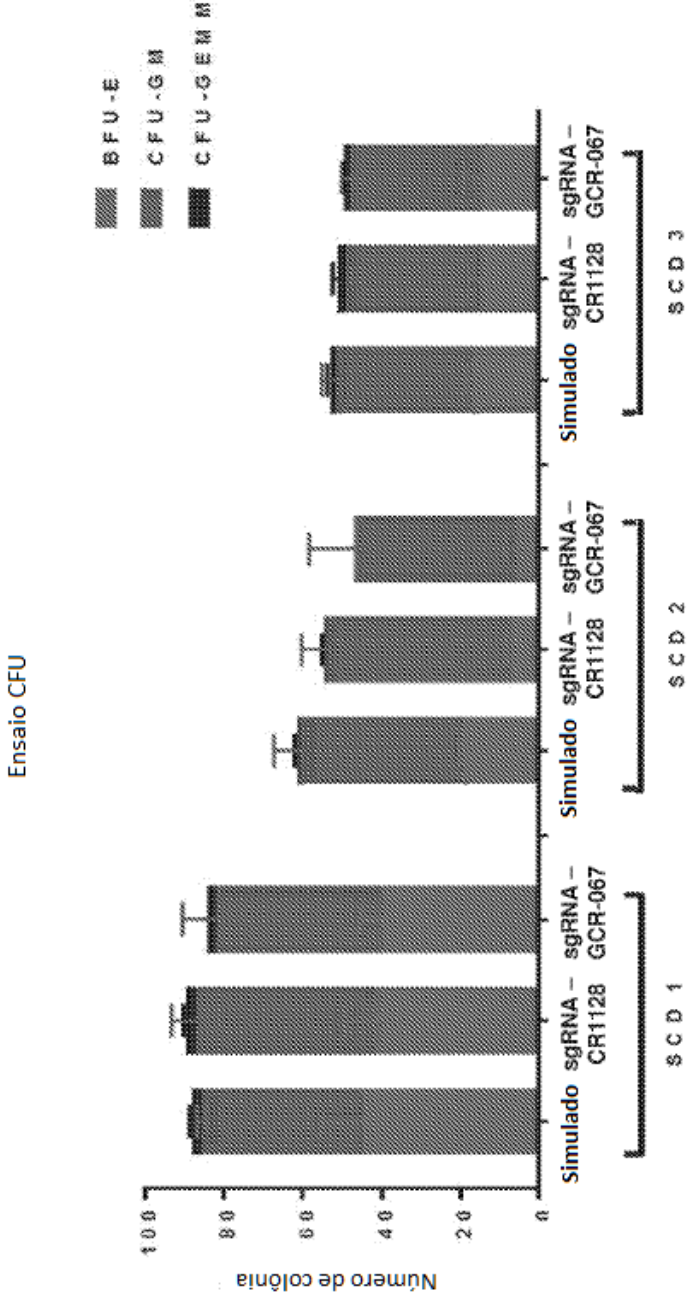


Figura 38

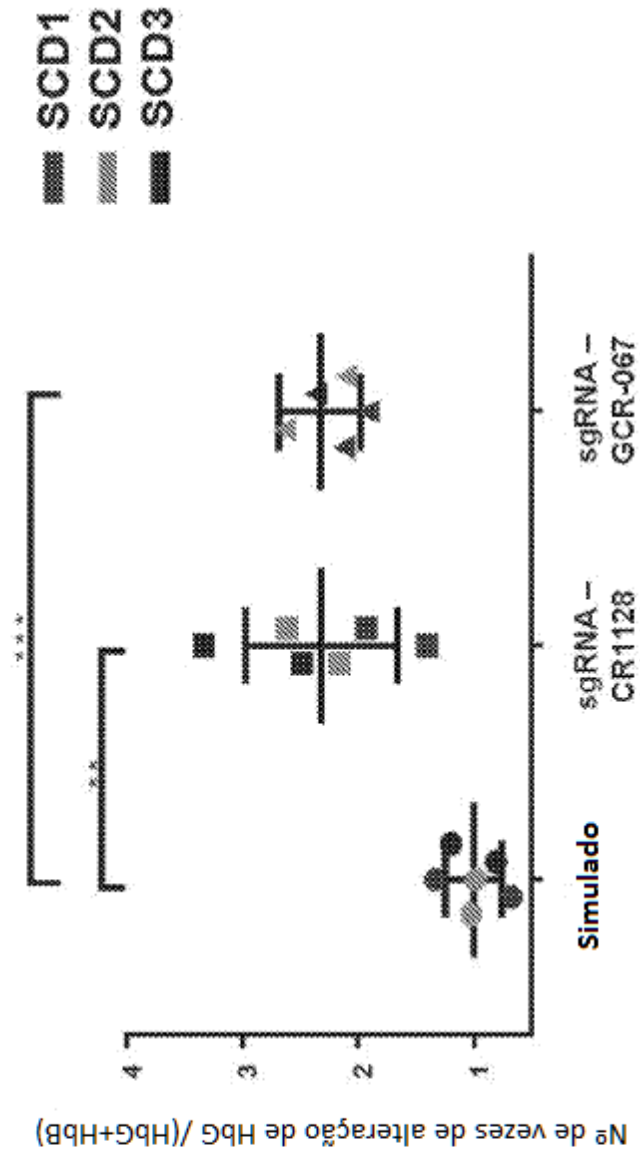


Figura 39

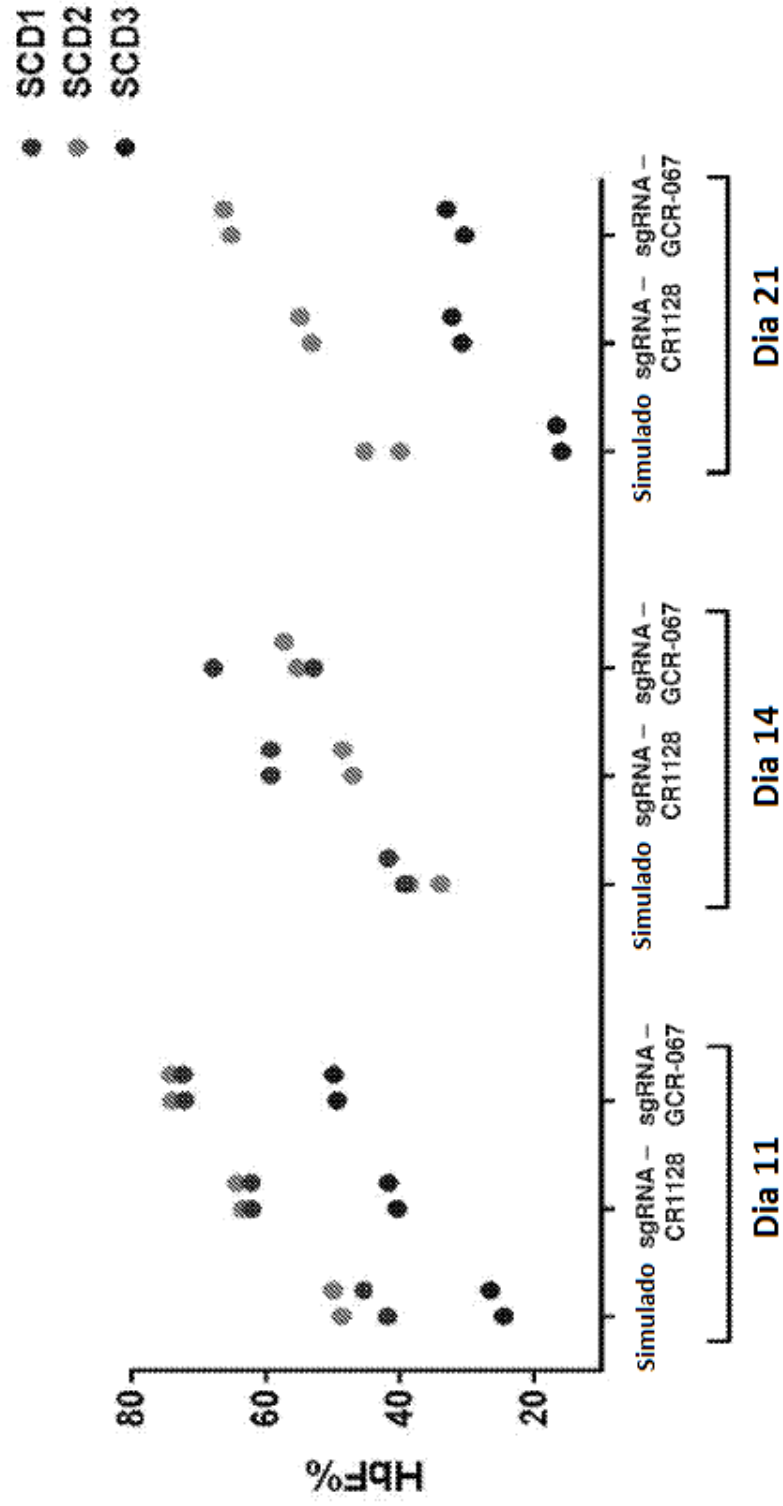


Figura 40

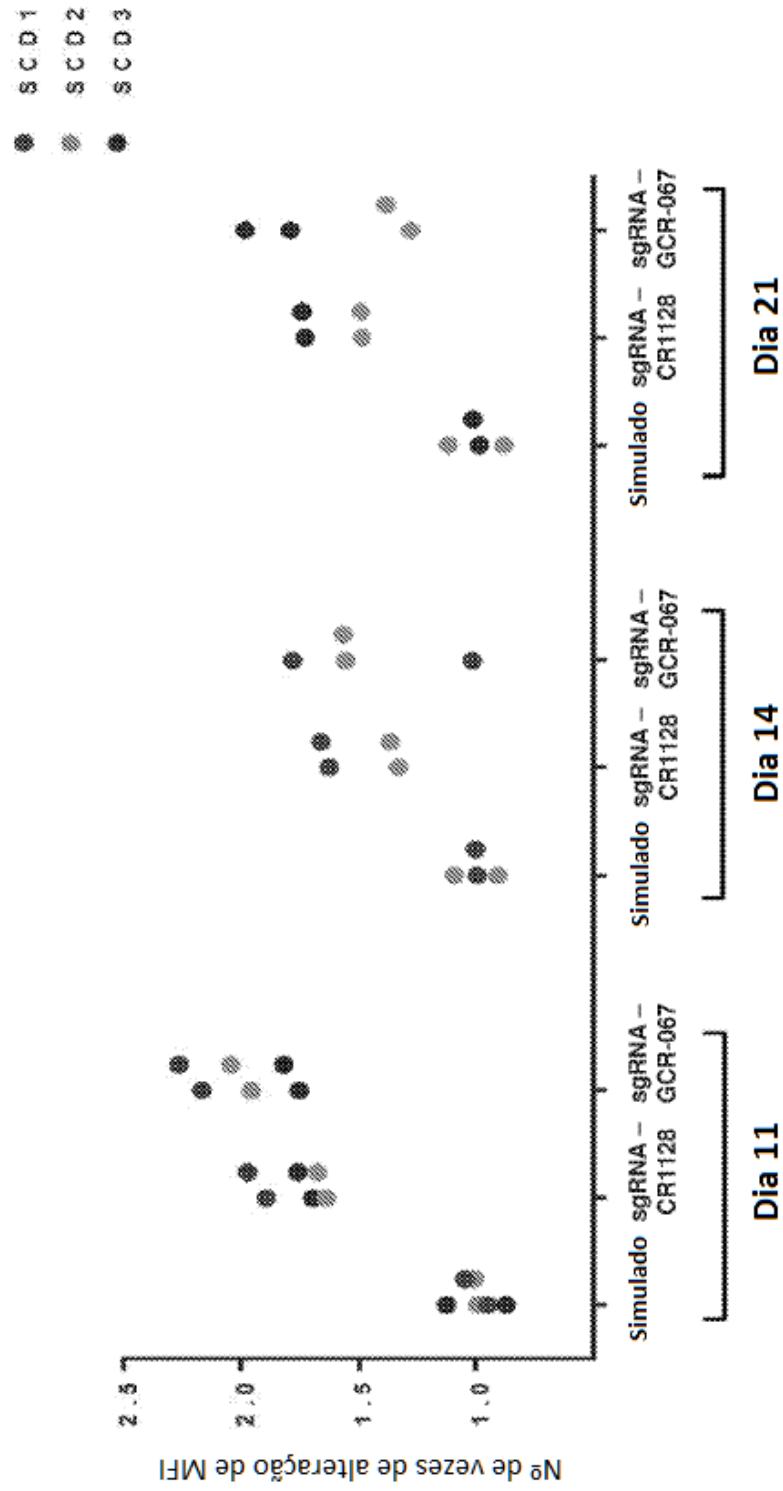
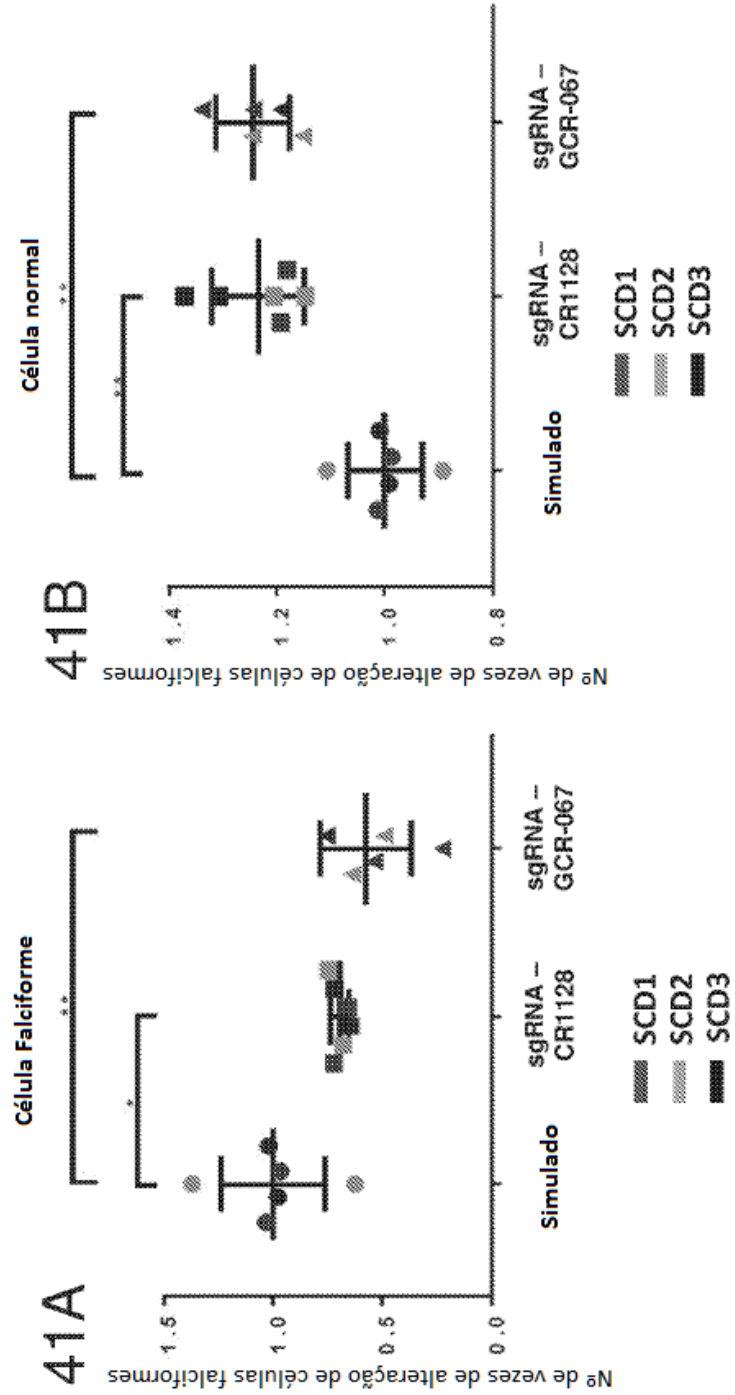


Figura 41



RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE HEMOGLOBINOPATIAS"**.

A presente invenção está dirigida a sistemas de edição do genoma, reagentes e métodos para o tratamento de hemoglobinopatias.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA (1.5 RPI 2571) - 06-2020 -
- Data de Geração do Código: 10/06/2020
- Hora de Geração do Código: 13:35:07
- Código de Controle:
 - Campo 1: A6352DAFA67194E8
 - Campo 2: 164EC7C178AAADB8