



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

(21) BR 112020003026-0 A2



* B R 1 1 2 0 2 0 0 0 3 0 2 6 A 2 *

(22) Data do Depósito: 14/08/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 25/08/2020

(54) Título: ÁCIDOS NUCLEICOS ESTABILIZADOS CODIFICANDO ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAGEIRO (mRNA)

(51) Int. Cl.: C12N 15/11.

(30) Prioridade Unionista: 15/08/2017 US 62/545,883.

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

(72) Inventor(es): CHRISTIAN DOMBROWSKI.

(86) Pedido PCT: PCT US2018046772 de 14/08/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/036513 de 21/02/2019

(85) Data da Fase Nacional: 13/02/2020

(57) Resumo: Esta divulgação refere-se ao campo de caudas poliadeniladas (poli-A). Em algumas modalidades, um DNA codifica uma cauda poli-A localizada 3' para nucleotídeos codificando uma proteína de interesse, em que a cauda poli-A compreende um ou mais nucleotídeos de não adenina.

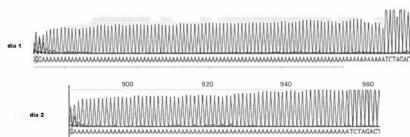


Fig. 1

"ÁCIDOS NUCLEICOS ESTABILIZADOS CODIFICANDO ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAGEIRO (mRNA)".

[001] Esta descrição se refere ao campo do ácido ribonucleico mensageiro estabilizado (mRNA) e do DNA codificando o mRNA estabilizado.

FUNDAMENTOS

[002] A poliadenilação é o processo de adicionar vários nucleotídeos de adenina à extremidade 3' de um RNA mensageiro (mRNA), formando uma cauda poli-A. A cauda poli-A consiste em múltiplos nucleotídeos de adenina repetidos, como adenosina monofosfatos, sem que outras bases interrompam a sequência. A cauda poli-A é crítica para a exportação, tradução e estabilidade nuclear do mRNA. Na natureza, como o mRNA é produzido a partir do DNA, uma transferase terminal adiciona nucleotídeos de adenina à extremidade 3' do mRNA. Este processo enzimático pode ser aplicado ao produzir mRNA ex vivo, mas o processo é difícil de controlar e resulta em caudas poli-A de diferentes comprimentos. Ao codificar uma cauda poli-A no plasmídeo, é possível diminuir a heterogeneidade na cauda poli-A. No entanto, não elimina a heterogeneidade e possui desvantagens adicionais, como a potencial instabilidade do plasmídeo.

[003] A cauda poli-A atua como o sítio de ligação da proteína de ligação ao poli-A. A proteína de ligação ao poli-A auxilia na exportação de mRNA do núcleo, na tradução e na inibição da degradação do mRNA. Na ausência de exportação do núcleo, os mRNAs são tipicamente degradados pelo exossomo. A proteína de ligação ao poli-A recruta as proteínas necessárias para a tradução.

[004] O mRNA agora está sendo usado como uma molécula terapêutica, por exemplo, para o tratamento de várias doenças e distúrbios. O mRNA é distribuído a um sujeito em vez da proteína, de modo que as células do sujeito produzam a proteína codificada pelo

mRNA dentro da célula. Para estes e outros fins, o mRNA pode ser preparado via transcrição de um modelo de DNA, frequentemente contido em um plasmídeo. Durante a produção de mRNA, a cauda poli-A pode ser adicionada enzimaticamente ao mRNA após a transcrição de um plasmídeo ou codificada no próprio plasmídeo. Quando a cauda poli-A é codificada em um plasmídeo, a cauda poli-A pode se tornar mais curta (ou seja, perder nucleotídeos de adenina) ao longo dos ciclos de replicação do DNA do plasmídeo, levando potencialmente a grandes variações no DNA resultante e na população de mRNA subsequente. Assim, existe uma necessidade na técnica de conceber plasmídeos codificando caudas poli-A que sejam estáveis e resistentes à perda gradual de nucleotídeos codificando nucleotídeos de poli-A adenina durante a replicação do DNA.

SUMÁRIO

[005] São divulgadas aqui codificação de DNA e mRNA compreendendo caudas poli-Adeniladas (poli-A) compreendendo nucleotídeos de adenina consecutivos localizados 3' para nucleotídeos codificando uma proteína de interesse, em que a cauda poli-A é estabilizada através da inserção de "âncoras" de nucleotídeo não adenina.

[006] Como utilizado neste documento, o termo "cauda poli-A" refere-se a uma cauda poli-A em uma molécula de mRNA ou uma sequência codificando uma cauda poli-A dentro de um plasmídeo de DNA. Uma cauda poli-A pode ser codificada por uma sequência de DNA complementar dentro de um plasmídeo. Uma sequência de nucleotídeos de timina (T) de repetição em uma sequência de DNA, por exemplo, uma sequência de homopolímero T, pode codificar uma cauda poli-A em um mRNA. Duas ou mais adenosinas consecutivas (por exemplo, adenosina ou desoxiadenosina), timidina ou outros nucleotídeos são chamados homopolímeros. As caudas poli-A de

ocorrência natural compreendem sequências longas e ininterruptas de homopolímero A.

[007] As âncoras de nucleotídeo não adenina aqui divulgadas interrompem a cauda poli-A em intervalos regulares ou irregulares e estabilizam o DNA codificando a cauda poli-A, bem como o mRNA produzido a partir do DNA. Âncoras de nucleotídeo não adenina exemplificativas são fornecidas na Tabela 4. Uma sequência de âncora, por exemplo, é adjacente a duas sequências de homopolímeros de nucleotídeo de adenina dentro da cauda poli-A.

[008] Em algumas modalidades, uma composição de DNA compreendendo nucleotídeos codificando uma cauda poli-Adenilada (poli-A) localizada 3' para nucleotídeos codificando uma proteína de interesse, em que a cauda poli-A compreende pelo menos 8 nucleotídeos de adenina (A) consecutivos e um ou mais nucleotídeos não adenina (A) está incluída.

[009] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 ou 90 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0010] Em alguns casos, os um ou mais nucleotídeos não adenina impedem a perda de um ou mais nucleotídeos de adenina durante a replicação de DNA, em comparação com a perda que ocorre em um DNA compreendendo uma cauda 3' de um mesmo comprimento ou similar que contém apenas nucleotídeos de adenina.

[0011] Em algumas modalidades, os um ou mais nucleotídeos não adenina são posicionados para interromper os nucleotídeos de adenina consecutivos, de modo que uma proteína de ligação de poli(A) possa ligar a um trecho de nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0012] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende pelo menos 50 nucleotídeos de adenina no total.

[0013] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende 40-

500 nucleotídeos de adenina no total.

[0014] Em alguns casos, a cauda poli-A compreende 95-100 nucleotídeos de adenina no total.

[0015] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 ou 97 nucleotídeos de adenina no total.

[0016] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém 96 ou 97 nucleotídeos de adenina no total.

[0017] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina.

[0018] Em algumas modalidades, o(s) nucleotídeo(s) não adenina(s) está localizado após pelo menos 8, 9, 10, 11 ou 12 nucleotídeos adenina consecutivos.

[0019] Em alguns casos, os um ou mais nucleotídeos não adenina estão localizados após pelo menos 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0020] Em algumas modalidades, os um ou mais nucleotídeos não adenina estão localizados após pelo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0021] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos a cada 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina a cada 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A tem um ou mais nucleotídeos não adenina ou um ou mais trechos consecutivos de 2-10 nucleotídeos não

adenina espaçados irregularmente em qualquer lugar ao longo do comprimento da cauda poli-A, em que em algum lugar ao longo do comprimento de Na cauda poli-A existem pelo menos 8 adeninas consecutivas. Por exemplo, uma cauda poli-A pode ter 70-1000 nucleotídeos de comprimento e ter qualquer número de não adeninas (isoladas ou agrupadas) espaçadas irregularmente ao longo do comprimento, desde que haja um ou mais trechos de pelo menos 8 adeninas consecutivas.

[0022] Em alguns casos, a cauda poli-A comprehende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos a cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0023] Em alguns casos, a cauda poli-A comprehende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina a cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0024] Em algumas modalidades, a cauda poli-A comprehende ou contém 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0025] Em alguns casos, a cauda poli-A comprehende ou contém 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0026] Em algumas modalidades, a cauda poli-A comprehende ou

contém mais de um nucleotídeo não adenina ou mais de um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos como sequências de interrupção espaçadas irregularmente dentro da cauda poli-A.

[0027] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém mais de um nucleotídeo não adenina ou mais de um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina espaçados irregularmente dentro da cauda poli-A.

[0028] Em alguns casos, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 12 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0029] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 16 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0030] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 25 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0031] Em alguns casos, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 30 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0032] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 39 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0033] Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina é guanina, citosina ou timina. Em alguns casos, o nucleotídeo não adenina é um nucleotídeo guanina. Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina é um nucleotídeo de citosina. Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina é um nucleotídeo de timina.

[0034] Em alguns casos, onde mais de um nucleotídeo não adenina está presente, o nucleotídeo não adenina pode ser selecionado de: a)

nucleotídeos de guanina e timina; b) nucleotídeos de guanina e citosina; c) nucleotídeos de timina e citosina; ou d) nucleotídeos de guanina, timina e citosina.

[0035] Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina consiste em um nucleotídeo não adenina selecionado de guanina, citosina e timina.

[0036] Em alguns casos, os nucleotídeos não adenina compreendem dois nucleotídeos não adenina selecionados de um ou mais de guanina, citosina e timina.

[0037] Em algumas modalidades, os nucleotídeos não adenina compreendem três nucleotídeos não adenina selecionados de um ou mais de guanina, citosina e timina.

[0038] Os nucleotídeos de adenina podem ser adenosina monofosfato.

[0039] Em algumas modalidades, a proteína codificada pelo mRNA é uma proteína terapêutica. Em alguns casos, a proteína é uma citocina, quimiocina, fator de crescimento, Cas9 ou Cas9 modificado.

[0040] Em algumas modalidades, o mRNA codificado por qualquer um dos DNAs descritos aqui é abrangido.

[0041] Em algumas modalidades, o DNA está dentro de um vetor. O vetor pode estar dentro de uma célula hospedeira, incluindo células de insetos, bactérias ou mamíferos (por exemplo, seres humanos).

[0042] Em algumas modalidades, os um ou mais nucleotídeos não adenina previnem perda de nucleotídeos codificando a cauda poli-A dentro do vetor durante crescimento da célula hospedeira, em comparação com a perda que ocorre em um DNA compreendendo nucleotídeos codificando uma cauda poli-A de um mesmo comprimento ou semelhante que contém apenas nucleotídeos de adenina.

[0043] Os métodos de produção de mRNA a partir de qualquer um dos vetores de DNA aqui descritos são abrangidos compreendendo:

linearizar o vetor a jusante da cauda poli-A; desnaturar o vetor linearizado; e contatar o DNA desnaturado com uma RNA polimerase na presença de nucleotídeos de guanina, citosina, uracil e adenina.

[0044] Em algumas modalidades, esta descrição inclui um DNA que comprehende nucleotídeos codificando uma cauda poli-Adenilada (poli-A) localizada 3' para nucleotídeos codificando uma proteína de interesse, em que a cauda poli-A comprehende uma primeira sequência de homopolímero de pelo menos 8 nucleotídeos de adenina (A) consecutivos e uma sequência de interrupção compreendendo um ou mais nucleotídeos não-adenina (A). Em algumas dessas modalidades, a cauda poli-A comprehende ainda uma segunda sequência de homopolímero de pelo menos nucleotídeos de adenina (A) consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A comprehende três ou mais sequências homopoliméricas de pelo menos 8 nucleotídeos consecutivos de adenina (A). Em algumas modalidades, a primeira e/ou sequência homopolimérica subsequente comprehende pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35 ou 40 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, os um ou mais nucleotídeos não adenina impedem a perda de um ou mais nucleotídeos de adenina durante a replicação de DNA, em comparação com a perda que ocorre em um DNA comprehendendo uma cauda 3' de um mesmo comprimento ou similar que contém apenas nucleotídeos de adenina. Em algumas modalidades, os um ou mais nucleotídeos não adenina são posicionados para interromper os nucleotídeos de adenina consecutivos, de modo que uma proteína de ligação de poli(A) possa ligar a um trecho de nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A comprehende pelo menos 50 nucleotídeos de adenina no total. Em algumas modalidades, a cauda poli-A comprehende 40-1.000, 40-900, 40-800, 40-700, 40-600, 40-500, 40-400, 40-300, 40-200 ou 40-100 nucleotídeos de adenina no total. Em

algumas modalidades, a cauda poli-A compreende 95-100 nucleotídeos de adenina no total. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 ou 97 nucleotídeos de adenina no total. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém 96 ou 97 nucleotídeos de adenina no total. Em algumas modalidades, a uma ou mais sequência de interrupção compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina. Em algumas modalidades, a uma ou mais sequências de interrupção compreendem ou contêm um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos que inclui dois ou mais nucleotídeos não adenina. Em algumas modalidades, o(s) nucleotídeo(s) não adenina(s) está localizado após pelo menos 8, 9, 10, 11 ou 12 nucleotídeos adenina consecutivos. Em algumas modalidades, o um ou mais nucleotídeos não adenina está localizado após pelo menos 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, os um ou mais nucleotídeos não adenina estão localizados após pelo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0045] Em algumas modalidades, como descrito no parágrafo anterior, a sequência de interrupção é uma sequência de interrupção de trinucleotídeo, dinucleotídeo ou mononucleotídeo. Em algumas tais modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina a cada 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina a cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37,

38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém mais que um nucleotídeo não adenina ou mais que um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina. Em algumas modalidades, o mais que um nucleotídeo não adenina ou mais que um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina são espaçados irregularmente dentro da cauda poli-A. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 12 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 16 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 25 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 30 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 39 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina é guanina, citosina ou

timina. Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina é um nucleotídeo de guanina. Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina é um nucleotídeo de citosina. Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina é um nucleotídeo de timina. Em algumas modalidades, o DNA compreende mais de um nucleotídeo não adenina selecionado de: (a) nucleotídeos de guanina e timina; (b) nucleotídeos de guanina e citosina; (c) nucleotídeos de timina e citosina; ou (d) nucleotídeos de guanina, timina e citosina. Em algumas modalidades descritas acima, o nucleotídeo não adenina consiste em um nucleotídeo não adenina selecionado de guanina, citosina e timina. Em algumas modalidades, os nucleotídeos não adenina compreendem dois nucleotídeos não adenina selecionados de um ou mais de guanina, citosina e timina. Em algumas modalidades, nucleotídeos não adenina compreendem três nucleotídeos não adenina selecionados de um ou mais de guanina, citosina e timina. Em algumas modalidades, os nucleotídeos de adenina são adenosina monofosfato. Em algumas modalidades, a proteína é uma proteína terapêutica. Em algumas modalidades, a proteína é uma citocina ou quimiocina. Em algumas modalidades, a proteína é um fator de crescimento. Em algumas modalidades, a proteína é Cas9 ou Cas9 modificada.

[0046] Esta descrição também abrange um mRNA codificado pelo DNA, como descrito nos parágrafos anteriores.

[0047] Em algumas modalidades, o DNA descrito nos parágrafos anteriores também pode estar compreendido dentro de um vetor. Em algumas modalidades, o vetor é compreendido dentro de uma célula hospedeira. Em algumas modalidades, onde o DNA está dentro de um vetor, os um ou mais nucleotídeos não adenina previnem perda de nucleotídeos codificando a cauda poli-A dentro do vetor durante crescimento da célula hospedeira, em comparação com a perda que ocorre em um DNA compreendendo nucleotídeos codificando uma

cauda poli-A de um mesmo comprimento ou semelhante que contém apenas nucleotídeos de adenina.

[0048] Esta descrição também abrange métodos de produção de mRNA a partir dos vetores de DNA aqui descritos, compreendendo: (a) linearizar o vetor a jusante da cauda poli-A; (b) desnaturar o vetor linearizado; e (c) contatar o DNA desnaturado com uma RNA polimerase na presença de nucleotídeos de guanina, citosina, uracil e adenina.

LEGENDAS DAS FIGURAS

[0049] A FIG. 1 mostra uma sequência codificando uma cauda poli-A que contém apenas adenosinas com comprimento decrescente ao longo de ciclos de crescimento. Cada clone refere-se a um DNA gerado por ciclos sucessivos de crescimento/purificação de células hospedeiras que expressam o plasmídeo codificando os clones.

[0050] A FIG 2 mostra a retenção do tamanho de uma cauda poli-A compreendendo nucleotídeos não adeninas ao longo de 2 passagens de crescimento.

[0051] A FIG 3 mostra os níveis de fosfatase alcalina embrionária secretada (SEAP) medidos em um ensaio de mRNA de Cas9 usando mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A contendo apenas adenosinas ou mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina e RNA único guia direcionado para SEAP (SEQ ID NO: 8).

[0052] A FIG 4 mostra a porcentagem de inibição de SEAP medida em um ensaio de mRNA de Cas9 usando o mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A contendo apenas adenosinas ou mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina e RNA de guia único direcionado a SEAP (SEQ ID NO: 8) com uma incubação de 24 horas.

[0053] A FIG 5 mostra a porcentagem de inibição de SEAP medida em um ensaio de mRNA de Cas9 usando o mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A contendo apenas adenosinas ou mRNA de Cas9 com uma

cauda poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina e RNA de guia único direcionado a SEAP (SEQ ID NO: 8) com uma incubação de 48 horas.

[0054] A FIG 6 mostra os níveis séricos de transtirretina (TTR) em camundongos 7 dias após dosagem de um tampão de solução de transformação e armazenamento de controle (TSS) ou dosagem de nanopartículas líquidas (LNP) formuladas com o RNA de guia único da SEQ ID NO: 9 (direcionado ao gene TTR de camundongo) e um mRNA codificado pela SEQ ID NO: 6 (HiCas9 mRNA) ou pela SEQ ID NO: 7 (mRNA de poli-A interrompido).

[0055] A FIG 7 mostra a porcentagem de inibição de SEAP medida em um ensaio de mRNA de Cas9 usando o mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A contendo apenas adenosinas ou mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina e RNA de guia único direcionado a SEAP (SEQ ID NO: 8) com uma incubação de 48 horas.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0056] São divulgados aqui DNAs codificando uma cauda poli-Adenilada localizada 3' para nucleotídeos codificando uma proteína de interesse, em que a cauda poli-A compreende um ou mais nucleotídeos não adenina. Durante a replicação do DNA, o DNA codificando uma cauda poli-A compreendendo um ou mais nucleotídeos não adenina pode mostrar perda menos gradual de nucleotídeos adenina dentro da cauda poli-A em comparação com as caudas poli-A que consistem apenas em nucleotídeos de adenina. Assim, são fornecidos plasmídeos compreendendo DNA codificando uma cauda poli-A compreendendo um ou mais nucleotídeos não adenina. O mRNA codificado por esse DNA também é abrangido. Tanto o DNA quanto o RNA podem exibir maior estabilidade contra a perda processativa de nucleotídeos de adenina do que moléculas semelhantes compreendendo caudas poli-A

não interrompidas.

[0057] A proteína de interesse pode ser qualquer proteína natural ou não natural. Como utilizado neste documento, "proteína" refere-se a qualquer sequência de aminoácidos consecutivos. Como tal, uma proteína pode se referir a uma proteína que compreende a sequência completa de aminoácidos de uma proteína de ocorrência natural. Além disso, uma proteína pode se referir a uma sequência de aminoácidos que compreende um fragmento de uma proteína completa. Uma proteína pode ser uma sequência de ocorrência natural, uma sequência de ocorrência natural com uma ou mais modificações ou uma sequência artificial que não ocorre na natureza.

[0058] A proteína de interesse pode ser de uso terapêutico em um sujeito, ou esta proteína pode ser de uso em uma reação bioquímica. As proteínas terapêuticas incluem, por exemplo, fatores de crescimento,抗ígenos para vacinas ou imuno-oncologia e enzimas, entre outros. As proteínas terapêuticas podem ser de ocorrência natural ou ser modificadas. Em certas circunstâncias, uma proteína modificada pode ser uma proteína de fusão.

[0059] Em algumas modalidades, a expressão de uma proteína por um mRNA é para uso como tratamento de uma doença. Em algumas modalidades, a expressão de uma proteína por um mRNA é para uso como imunoterapia contra câncer, vacinação contra doenças infecciosas, para induzir tolerância a uma alergia do tipo I, como uma terapia de substituição ou como um medicamento regenerativo (ver Sergeeva OV et al., *Biochemistry (Moscow)* 81(7):709-722 (2016)).

[0060] Em algumas modalidades, as células dendríticas autólogas são transfectadas *ex vivo* com um mRNA codificando antígeno específico da próstata (PSA) para modular a resposta imune da célula T em sujeitos com câncer de próstata metastático.

[0061] Em algumas modalidades, um mRNA é uma vacina

profilática. Em algumas modalidades, um mRNA codifica para uma ou mais proteínas antigênicas. Em algumas modalidades, a(s) proteína(s) antigênica(s) é uma proteína viral. Em algumas modalidades, o mRNA faz com que as células do corpo produzam e expressem uma proteína antigênica. Em algumas modalidades, o mRNA causa a expressão de proteínas antigênicas sem perigo ou doença ou propagação entre indivíduos. Em algumas modalidades, a expressão de proteínas antigênicas faz com que o sistema imunológico de um sujeito produza anticorpos. Em algumas modalidades, esses anticorpos podem neutralizar um vírus e prevenir infecções futuras após a exposição ao vírus. Em algumas modalidades, o mRNA é uma vacina profilática para uma doença infecciosa. Em algumas modalidades, o mRNA é uma vacina profilática contra influenza, chikungunya, zika, citomegalovírus, metapneumovírus humano (HMPV) ou vírus da parainfluenza tipo 3 (PIV3). Em algumas modalidades, o mRNA é uma vacina profilática contra os subtipos de influenza H10 ou H7.

[0062] Em algumas modalidades, um mRNA é uma vacina personalizada contra o câncer. Em algumas modalidades, um mRNA inicia o sistema imunológico de um sujeito com câncer para reconhecer células cancerígenas e montar uma resposta. Em algumas modalidades, essa resposta é adaptada ao câncer ou tumor do paciente individual. Em algumas modalidades, um mRNA codifica os neoantígenos específicos de um paciente (proteínas únicas com mutações presentes no câncer ou tumor do paciente). Em algumas modalidades, um mRNA causa a expressão de neoantígenos específicos de um paciente. Em algumas modalidades, a expressão de neoantígenos provoca uma resposta imune específica no paciente para reconhecer e destruir células cancerígenas. Em algumas modalidades, um mRNA é de uso como uma vacina personalizada contra o câncer. Em algumas modalidades, um mRNA é útil como uma vacina

personalizada contra o câncer, juntamente com um ou mais anticorpos inibidores do ponto de verificação, como terapias anti-PD-1.

[0063] Em algumas modalidades, um mRNA é útil para imuno-oncologia intratumoral. Em algumas modalidades, a injeção de um mRNA em um tumor reduz os efeitos fora do alvo e/ou pode ser mais potente em comparação com a administração sistêmica. Em algumas modalidades, o mRNA causa a expressão de OX40L (CD252), o ligando para CD134. Em algumas modalidades, o mRNA causa a expressão de citocinas, como a interleucina 12 (IL-12).

[0064] Em algumas modalidades, um mRNA causa a expressão de uma proteína para terapia localizada. Em algumas modalidades, um mRNA causa a criação de mais vasos sanguíneos e melhora o suprimento de sangue em um tecido local. Em algumas modalidades, o mRNA causa a expressão do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A). Em algumas modalidades, a expressão de VEGF-A é local e transitória. Em algumas modalidades, a expressão local e transitória de VEGF-A é útil para tratamento de insuficiência cardíaca ou após um ataque cardíaco, de cicatrização de feridas diabéticas ou de outras doenças vasculares isquêmicas.

[0065] Em algumas modalidades, um mRNA causa a expressão de uma proteína para terapia de substituição. Em algumas modalidades, a proteína é a proteína-B surfactante.

[0066] Em algumas modalidades, um mRNA causa a expressão de uma nuclease guiada por RNA, como endonuclease Cas associada a CRISPR classe 2, por exemplo, Cas9/Csn1 (Cas9). Uma sequência Cas9 exemplificativa é UniProt Q99ZW2. Em algumas modalidades, a proteína é uma Cas9 modificada ou uma proteína Cas9 fundida com outra proteína ou peptídeo funcional. As versões modificadas do Cas9 com um domínio catalítico, RuvC ou HNH, que está inativo são denominadas "nickases". Em algumas modalidades, as composições e

métodos compreendem nickases. Em algumas modalidades, as composições e métodos compreendem uma nickase Cas9 que induz um corte em vez de uma quebra de fita dupla no DNA alvo.

[0067] Em algumas modalidades, a proteína Cas pode ser modificada para conter apenas um domínio de nuclease funcional. Por exemplo, a proteína Cas pode ser modificada de modo que um dos domínios da nuclease seja mutado ou totalmente ou parcialmente excluído para reduzir sua atividade de clivagem de ácido nucleico. Em algumas modalidades, uma nickase Cas é usada tendo um domínio RuvC com atividade reduzida. Em algumas modalidades, uma nickase Cas é usada com um domínio RuvC inativo. Em algumas modalidades, uma nickase Cas é usada tendo um domínio HNH com atividade reduzida. Em algumas modalidades, uma nickase Cas é usada com um domínio HNH inativo.

[0068] Em algumas modalidades, as proteínas Cas quiméricas são codificadas pelo DNA, onde um domínio ou região da proteína é substituído por uma porção de uma proteína diferente. Em algumas modalidades, um domínio de Cas nuclease pode ser substituído por um domínio de uma nuclease diferente, como Fok1. Em algumas modalidades, uma proteína Cas pode ser uma nuclease modificada.

I. DNA codificando caudas poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina

[0069] Como utilizado neste documento, uma "cauda poli-A" refere-se a uma sequência compreendendo adenosinas ou outros nucleotídeos de adenina na extremidade 3' de um mRNA. Embora as caudas poli-A naturais possam ser compostas apenas por nucleotídeos de adenina, uma "cauda poli-A" da presente invenção é estabilizada por uma ou mais "âncoras" de nucleotídeos não adenina. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende pelo menos 8 nucleotídeos de adenina consecutivos e uma ou mais sequência de interrupção

compreendendo um nucleotídeo não adenina. Por outras palavras, as caudas poli-A da presente invenção compreendem pelo menos 8 adeninas consecutivas, mas também compreendem um ou mais nucleotídeos não adenina nas sequências de interrupção ou âncora. As sequências de interrupção aqui divulgadas interrompem a cauda poli-A em intervalos regulares ou irregulares e estabilizam o DNA codificando a cauda poli-A, bem como o mRNA produzido a partir do DNA. Sequências de interrupção exemplificativas são fornecidas na Tabela 4.

[0070] Como utilizado neste documento, "nucleotídeos não adeninas" refere-se a nucleotídeos naturais ou não naturais que não compreendem adenina. Os nucleotídeos de guanina, timina e citosina são nucleotídeos não adenina exemplificativos.

[0071] As caudas poli-A nativas são adicionadas em um processo de poliadenilação que começa após a transcrição de um DNA no mRNA. Nos métodos de biologia molecular, no entanto, as caudas poli-A são frequentemente codificadas por uma seção de DNA dentro de um plasmídeo codificando uma proteína de interesse. Nesse caso, o tamanho da cauda poli-A (isto é, o número de nucleotídeos de adenina compreendidos na cauda poli-A) é diretamente dependente do número de nucleotídeos de DNA no plasmídeo codificando para esses nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0072] O número de nucleotídeos de DNA codificando a cauda poli-A pode diminuir gradualmente durante a replicação do DNA durante, por exemplo, o crescimento do plasmídeo em uma célula hospedeira. Quando o número de nucleotídeos codificando adenina consecutivos em um plasmídeo diminui, o rendimento do plasmídeo codificando a cauda poli-A de comprimento total é reduzido e o mRNA resultante com caudas poli-A mais curtas pode ter estabilidade reduzida e/ou degradação aumentada. Por exemplo, pode-se esperar que um mRNA com uma cauda poli-A de 40 nucleotídeos de adenina consecutivos

tenha menor estabilidade do que um mRNA com uma cauda poli-A de 90 ou mais nucleotídeos. Por menor estabilidade, significa que um mRNA pode ser degradado mais rapidamente e, consequentemente, a expressão de uma proteína alvo é reduzida a partir de um mRNA com uma cauda poli-A mais curta. Como tal, é benéfico manter o comprimento de uma cauda poli-A dentro de um plasmídeo de DNA durante várias rodadas de replicação de DNA dentro das células hospedeiras. Além disso, a cauda poli-A pode ser importante para a tradução, e a manutenção de uma cauda poli-A mais longa pode resultar em melhor expressão da proteína do mRNA.

[0073] A inclusão de um ou mais nucleotídeos não adenina em uma cauda poli-A localizada 3' nos nucleotídeos codificando uma proteína de interesse pode impedir a perda de um ou mais nucleotídeos de adenina durante a replicação do DNA, em comparação com a perda que ocorre em um DNA compreendendo uma cauda poli-A 3' de comprimento semelhante ou igual que contém apenas nucleotídeos de adenina. A presença de uma cauda poli-A mais longa também pode melhorar a eficiência da tradução de proteínas de um mRNA.

A. Nucleotídeos de adenina

[0074] O número de nucleotídeos de adenina consecutivos em uma cauda poli-A desta invenção é projetado para permitir que a proteína de ligação a poli-A se ligue às adenosinas consecutivas. Como utilizado neste documento, "proteína de ligação a poli-A", "proteína de ligação a poli A" ou "proteína de ligação a poliadenilato" refere-se a uma proteína que se liga a uma cauda poli-A de um mRNA. Uma proteína de ligação a poli-A pode funcionar para regular a iniciação da tradução. Ao se ligar às caudas poli-A, uma proteína de ligação a poli-A pode protegê-las da uridilação por ZCCHC6/ZCCHC11 e, portanto, contribuir para a estabilidade do mRNA. Uma proteína de ligação a poli-A pode ser localizada em grânulos de ribonucleoproteína mensageira

citoplasmática (mRNP) contendo mRNAs não traduzidos que se alternam entre o citoplasma e o núcleo. Uma proteína de ligação a poli-A exemplificativa é PABPC1 (Número de Referência Uniprot: P11940). O DNA da presente invenção pode codificar nucleotídeos de adenina consecutivos suficientes, de modo que, quando transcritos no mRNA, uma ou mais proteínas de ligação a poli-A retêm a capacidade de se ligar à cauda poli-A. Uma âncora de nucleotídeo não adenina de interrupção é colocada após esse número funcional de nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0075] Em algumas modalidades, o um ou mais nucleotídeos não adenina são posicionados para interromper os nucleotídeos de adenina consecutivos, de modo que uma proteína de ligação a poli-A possa se ligar a um trecho de nucleotídeos de adenina consecutivos (ou seja, um homopolímero de nucleotídeo de adenina ou "homopolímero A". Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende pelo menos 8 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, os pelo menos 8 nucleotídeos de adenina consecutivos são 8, 9, 10, 11 e/ou 12 nucleotídeos consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35 e/ou 40 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 e/ou 90 nucleotídeos de adenina consecutivos. Um homopolímero, por exemplo, em uma sequência de RNA poli-A, pode compreender pelo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35 ou 40 nucleotídeos de adenosina consecutivos. Um homopolímero, por exemplo, em uma sequência de plasmídeo codificando a cauda poli-A, pode compreender pelo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35 ou 40 nucleotídeos de timidina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende duas ou mais sequências de

homopolímeros A de comprimentos diferentes, por exemplo, as sequências de interrupção na cauda poli-A são espaçadas irregularmente. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende sequências de interrupção espaçadas regularmente e dois ou mais homopolímeros do mesmo comprimento.

[0076] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende uma primeira sequência de homopolímero de pelo menos 8 nucleotídeos de adenina consecutivos, uma segunda sequência de homopolímero de pelo menos 5 nucleotídeos de adenina consecutivos e uma âncora compreendendo um ou mais nucleotídeos não adenina.

[0077] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende um ou mais conjuntos de 8 a 50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende um ou mais conjuntos de 8 a 100 nucleotídeos de adenina consecutivos. Para caudas poli-A com vários conjuntos de nucleotídeos de adenina consecutivos, isto é, várias sequências de homopolímeros, cada conjunto de nucleotídeos de adenina não precisa ter o mesmo comprimento.

[0078] Além do número de nucleotídeos de adenina consecutivos, uma cauda poli-A também pode ser caracterizada pelo número de nucleotídeos de adenina total. O número total de nucleotídeos de adenina é simplesmente a soma de todos os nucleotídeos de adenina em uma cauda poli-A. Todos os nucleotídeos de adenina em diferentes grupos de agrupamentos consecutivos ou não consecutivos de nucleotídeos de adenina seriam, portanto, incluídos no número total de nucleotídeos de adenina em uma cauda poli-A.

[0079] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-210, 210-220, 220-230, 230-240, 240-250, 250-260, 260-270, 270-280,

280-290, 290-300, 300-310, 310-320, 320-330, 330-340, 340-350, 350-360, 360-370, 370-380, 380-390, 390-400, 400-410, 410-420, 420-430, 430-440, 440-450, 450-460, 460-470, 470-480, 480-490, 490-500, 500-510, 510-520, 520-530, 530-540, 540-550, 550-560, 560-570, 570-580, 580-590, ou 590-600 nucleotídeos de adenina no total. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende uma ou mais sequências de homopolímeros A de pelo menos 8, 9, 10, 12, 25, 30, 50 nucleotídeos de comprimento.

[0080] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende 40-1.000, 40-900, 40-800, 40-700, 40-600, 40-500, 40-400, 40-300, 40-200 ou 40-100 nucleotídeos de adenina no total.

[0081] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende pelo menos 40 nucleotídeos de adenina no total. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende pelo menos 50 nucleotídeos de adenina no total. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende pelo menos 40, 50, 60, 70 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280 ou 300 nucleotídeos de adenina.

[0082] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 ou 97 nucleotídeos de adenina no total. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém 96 ou 97 nucleotídeos de adenina no total.

[0083] Em algumas modalidades, os nucleotídeos de adenina são adenosina monofosfato. Os nucleotídeos podem ser modificados.

B. Sequências de interrupção compreendendo nucleotídeos não adenina

[0084] Os nucleotídeos não adeninas da presente invenção podem compreender ou consistir em nucleotídeos naturais ou não naturais, como guanina, citosina ou timina. Os nucleotídeos podem ser modificados.

[0085] Em algumas modalidades, uma cauda poli-A compreende

um nucleotídeo não adenina em uma cauda poli-A que, de outra forma, consiste apenas em nucleotídeos de adenina. O nucleotídeo não adenina pode interromper uma sequência de nucleotídeos de adenina. O um nucleotídeo não adenina pode ser selecionado de guanina, citosina e timina. Em algumas modalidades, o um nucleotídeo não adenina é um nucleotídeo de guanina. Em algumas modalidades, o um nucleotídeo não adenina é um nucleotídeo de citosina. Em algumas modalidades, o um nucleotídeo não adenina é um nucleotídeo de timina. A sequência de interrupção pode ser uma sequência mononucleotídica, dinucleotídica, trinucleotídica. A sequência de interrupção pode compreender 1, 2, 3, 4, 5 ou mais nucleotídeos não adenina e pode ter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais nucleotídeos de comprimento.

[0086] Em algumas modalidades, um único nucleotídeo não adenina pode interromper conjuntos ou grupos de nucleotídeos adenina consecutivos. O um nucleotídeo não adenina pode ser posicionado para interromper nucleotídeos de adenina consecutivos de tal maneira que uma proteína de ligação a poli-A possa se ligar a um trecho de nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0087] Em algumas modalidades, há mais de um nucleotídeo não adenina em uma cauda poli-A. O mais de um nucleotídeo não adenina pode ser posicionado para interromper nucleotídeos de adenina consecutivos de tal maneira que uma proteína de ligação a poli-A possa se ligar a um trecho de nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, os nucleotídeos não adenina são intercalados entre mais de um conjunto de nucleotídeos adenina consecutivos, com o número de nucleotídeos adenina em cada série de nucleotídeos adenina consecutivos sendo suficientes para permitir a ligação de uma proteína de ligação poli-A.

[0088] Os nucleotídeos não adenina podem estar em trechos de mais que um nucleotídeo não adenina. Os nucleotídeos não adenina

podem estar em trechos de 2-10 nucleotídeos consecutivos que compreendem um ou mais nucleotídeos não adenina. Os nucleotídeos não adeninas podem estar em sequências de interrupção que são intercaladas entre mais de um conjunto de nucleotídeos adenina consecutivos, por exemplo, mais de uma sequência homopolimérica A. Em algumas modalidades, o número de nucleotídeos não adenina consecutivos pode ser um, dois, três, quatro ou cinco. Em algumas modalidades, há trechos consecutivos de 2-10 nucleotídeos não adenina. Em algumas modalidades, há trechos consecutivos de 2-10 nucleotídeos compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina.

[0089] Os nucleotídeos não adenina consecutivos podem ser mais de um mesmo nucleotídeo ou os nucleotídeos não adenina consecutivos podem ser diferentes um do outro. Por exemplo, os nucleotídeos não adenina podem ser mais de um nucleotídeo guanina, citosina ou timina. Os nucleotídeos não adenina também podem ser nucleotídeos de guanina e timina; nucleotídeos de guanina e citosina; nucleotídeos de timina e citosina; ou nucleotídeos de guanina, timina e citosina. Os nucleotídeos não adenina podem compreender dois nucleotídeos não adenina selecionados de um ou mais de guanina, citosina e timina. O nucleotídeo não adenina pode compreender três nucleotídeos não adenina selecionados de um ou mais de guanina, citosina e timina. O nucleotídeo não adenina pode compreender mais de três nucleotídeos não adenina selecionados de um ou mais de guanina, citosina e timina. A cauda poli-A pode compreender nucleotídeos de adenina entre nucleotídeos não adenina em intervalos regulares ou irregulares. Por exemplo, pode-se ver a cauda poli-A como tendo um padrão, onde o padrão é regular ou irregular. A chave para o padrão é a presença de um ou mais nucleotídeos não adenina em qualquer lugar da cauda poli-A, desde que haja pelo menos 8 adeninas

consecutivas em qualquer lugar ao longo do comprimento. Em algumas modalidades, um poli-A pode compreender um trecho de pelo menos 8 nucleotídeos de adenina consecutivos em qualquer lugar ao longo do comprimento, onde os nucleotídeos de adenina são "interrompidos" em qualquer lugar após 8 ou mais adeninas com um ou mais nucleotídeos não adenina. A sequência de interrupção pode ser um nucleotídeo não adenina ou 2 a 10 nucleotídeos consecutivos, opcionalmente compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina. Cada um ou trecho consecutivo de nucleotídeos compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina pode ser seguido por uma ou mais adeninas, opcionalmente seguido por um ou mais nucleotídeos não adenina, opcionalmente seguido por um ou mais de um nucleotídeo de adenina e assim por diante até a extremidade da cauda poli-A. Este padrão de nucleotídeos de adenina/nucleotídeos não adenina pode se repetir em intervalos regulares ou irregulares. Alternativamente, pode não haver padrão, tal como onde existe apenas um ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos, opcionalmente compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina ao longo de todo o comprimento de poli-A.

II. Padrões exemplificativos de nucleotídeos de adenina e não adenina em caudas poli-A

[0090] As caudas poli-A desta invenção podem compreender ou consistir em vários padrões diferentes de sequências de interrupção, como nucleotídeos de adenina consecutivos e um ou mais nucleotídeos não adenina.

[0091] Uma cauda poli-A pode começar com um ou uma série de nucleotídeos de adenina consecutivos seguidos por um nucleotídeo não adenina. Uma cauda poli-A que começa com uma série de nucleotídeos de adenina significa que a extremidade 5' da cauda poli-A consiste em um ou uma série de nucleotídeos de adenina consecutivos com um ou mais nucleotídeos não adenina que vêm após os nucleotídeos de

adenina consecutivos. "Depois" significa que os nucleotídeos não adenina estão 3' para uma série de nucleotídeos adenina consecutivos.

[0092] Em algumas modalidades, a extremidade 5' da cauda poli-A pode consistir em uma série de nucleotídeos de adenina consecutivos seguidos por um ou mais nucleotídeos não adenina. Em algumas modalidades, um ou mais nucleotídeo(s) não adenina(s) está(ão) localizado(s) após pelo menos 8, 9, 10, 11 ou 12 nucleotídeos adenina consecutivos. Em algumas modalidades, o um ou mais nucleotídeos não adenina está localizado após pelo menos 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, o um ou mais nucleotídeos não adenina está localizado após pelo menos 8-100 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina está após um, dois, três, quatro, cinco, seis ou sete nucleotídeos de adenina e é seguido por pelo menos 8 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0093] Em algumas modalidades, a extremidade 5' da cauda poli A consiste em um a oito nucleotídeos de adenina seguidos por um ou mais nucleotídeos não adenina. Em tais modalidades, os nucleotídeos não adenina são seguidos por mais nucleotídeos de adenina. Os nucleotídeos de adenina que seguem o um ou mais nucleotídeos não adenina compreendem pelo menos 8 nucleotídeos de adenina antes de outro nucleotídeo não adenina.

[0094] A faixa de tamanho de um grupo de nucleotídeos de adenina consecutivos que inicia a cauda poli-A pode variar. Em algumas modalidades, a extremidade 5' da cauda poli-A consiste em 1, 2, 3 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 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

nucleotídeos de adenina consecutivos. Quando o primeiro nucleotídeo não adenina cai após 1-7 nucleotídeos de adenina, a cauda poli-A compreende ainda um trecho de pelo menos 8 nucleotídeos de adenina após o nucleotídeo não adenina.

[0095] Em algumas modalidades, os um ou mais nucleotídeos não adenina estão localizados após pelo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[0096] A cauda poli-A pode terminar com um trecho de nucleotídeos não adenina na extremidade 3'. O número de nucleotídeos não adenina na extremidade 3' da cauda poli-A pode ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos não adenina. Alternativamente, a extremidade 3' da cauda poli-A pode consistir em um ou mais nucleotídeos de adenina.

[0097] A cauda poli-A da presente invenção pode compreender uma sequência de nucleotídeos de adenina consecutivos seguidos por um ou mais nucleotídeos não adenina, opcionalmente seguidos por nucleotídeos de adenina adicionais. A cauda poli-A da presente invenção também pode compreender mais de uma sequência de nucleotídeos de adenina consecutivos interrompidos por um ou mais nucleotídeos não adenina. A sequência de nucleotídeos de adenina consecutivos pode ser pelo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos. O número de nucleotídeos não adenina em uma sequência de interrupção pode ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos não adenina.

[0098] Uma cauda poli-A da invenção também pode compreender mais de uma série de nucleotídeos de adenina consecutivos que são interrompidos ou intercalados com nucleotídeos não adenina. O

comprimento da sequência de interrupção pode ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos. O comprimento da sequência de interrupção pode ser 1-3, 1-5, 1-10, 2-10, 2-8, 2-6 ou 2-5 nucleotídeos. As caudas poli-A da invenção podem compreender mais de um conjunto de nucleotídeos de adenina consecutivos e uma sequência de interrupção compreendendo um nucleotídeo não adenina ou mais de um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina entre cada conjunto de nucleotídeos de adenina consecutivos. As caudas poli-A da invenção podem compreender mais de um conjunto de nucleotídeos de adenina consecutivos e um nucleotídeo não adenina ou mais de um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina entre cada conjunto de nucleotídeos de adenina consecutivos. As caudas poli-A da invenção podem compreender mais de um conjunto de nucleotídeos de adenina consecutivos e uma ou mais sequências de interrupção, cada uma compreendendo um ou mais nucleotídeos não adenina. Os conjuntos podem cada um compreender o mesmo ou diferente número de nucleotídeos de adenina. Em modalidades com vários conjuntos de nucleotídeos de adenina consecutivos, cada conjunto de nucleotídeos de adenina consecutivos pode ter comprimento suficiente para permitir a ligação de uma proteína de ligação a poli-A.

[0099] Em algumas modalidades, um ou mais nucleotídeos não adenina é uma sequência de interrupção localizada em intervalos regulares com a cauda poli-A. Por intervalos regulares, entende-se que um número definido de nucleotídeos de adenina consecutivos é seguido por nucleotídeos não adenina de maneira repetida.

[00100] Em algumas modalidades, um ou mais nucleotídeos não adenina estão localizados em intervalos irregulares com a cauda poli-A. Por intervalos irregulares, entende-se que um número definido de nucleotídeos de adenina consecutivos é seguido por nucleotídeos não

adenina seguidos por outro conjunto de nucleotídeos de adenina consecutivos que compreendem um número diferente de adeninas que o primeiro conjunto.

[00101] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina a cada 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina a cada 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina a cada 8-100 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas tais modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina a cada 8-100 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[00102] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina a cada 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina a cada 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina a cada 8-100 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10

nucleotídeos compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina a cada 8-100 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[00103] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos compreendendo um nucleotídeo não adenina a cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[00104] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos compreendendo pelo menos dois nucleotídeos não adenina a cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[00105] Em algumas modalidades, o número de nucleotídeos não adenina pode ser 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos. Em algumas modalidades, o número de nucleotídeos de adenina consecutivos pode ser de 8 a 50 nucleotídeos de adenina. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

[00106] O número de nucleotídeos de adenina consecutivos em uma cauda poli-A pode ser 12, 16, 25, 30 ou 39. O número de nucleotídeos de adenina consecutivos também pode ser maior que 39. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 12 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A

compreende ou contém 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 16 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A comprehende ou contém 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 25 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A comprehende ou contém 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 30 nucleotídeos de adenina consecutivos. Em algumas modalidades, a cauda poli-A comprehende ou contém 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos não adenina consecutivos a cada 39 nucleotídeos de adenina consecutivos. O número de nucleotídeos não adenina consecutivos também pode ser maior que 5.

[00107] Sequências de interrupção de trinucleotídeos exemplificativas incluem GCG, CCG, GTG, TGG, CGG, GGT, TAT, CAT, CGT, CTC, GAT, CCT, TGT, CGC, CAC, TGC, TCG, TCT, CCC, GAC, TAG, GTT, CTG e TTT. Existem 63 possíveis sequências de interrupção de trinucleotídeo e 36 sequências de interrupção de trinucleotídeo que omitem um terminal A. Em algumas modalidades, a cauda poli-A comprehende uma ou mais sequências de interrupção de trinucleotídeo escolhidas entre TGG, CGG, GGT, TAT, CAT, CGT, CTC, GAT, CCT, TGT, CGC, CAC, TGC, TCG, TCT, CCC, GAC, TAG, GTT, CTG e TTT. Em algumas modalidades, a cauda poli-A comprehende múltiplas sequências de interrupção projetadas para minimizar a hibridação e o recozimento entre 3 ou mais nucleotídeos dentro da sequência codificando a cauda poli-A ou dentro da cauda poli-A. Em certas modalidades, as sequências de interrupção que minimizam o recozimento entre 3 ou mais nucleotídeos são escolhidas das 34 sequências de interrupção de trinucleotídeos que omitem um terminal A. Em algumas modalidades, as sequências de interrupção que minimizam o recozimento entre 3 ou mais nucleotídeos são escolhidas de TGG, CGG, GGT, TAT, CAT, CGT, CTC, GAT, CCT, TGT, CGC,

CAC, TGC, TCG, TCT, CCC, GAC, TAG, GTT, CTG e TTT. Em algumas modalidades, por exemplo, SEQ ID NO: 18, a cauda poli-A compreende sequências de interrupção de di- e/ou trinucleotídeos escolhidas entre TGG, CGG, GGT, TAT, CAT, CGT, CTC, GAT, CCT, TGT, CGC, CAC, TGC, TCG, TCT, CCC, GAC, TAG, GTT, CTG, TTT e CG. Em certas modalidades, a cauda poli-A compreende sequências de interrupção de trinucleotídeo escolhidas entre GCG, CCG e GTG. Sequências de interrupção de dinucleotídeos exemplificativos incluem CG, GC, CC, GG, TT, CT, TC, GT e TG. Existem 15 possíveis sequências de interrupção de dinucleotídeo e 9 dinucleotídeos que não incluem um terminal A. As sequências de interrupção de mononucleotídeo podem ser C, G e T. Observe que, com relação a qualquer sequência de nucleotídeo acima, quando se refere a uma sequência de RNA (como um mRNA), em oposição a uma sequência de DNA, T é substituído por U.

[00108] Um versado na técnica seria capaz de projetar vários padrões diferentes de DNA codificando caudas poli-A com nucleotídeos de adenina consecutivos e um ou mais nucleotídeos não adenina. Algumas caudas poli-A exemplificativas compreendendo pelo menos 8 nucleotídeos de adenina consecutivos e um ou mais nucleotídeos de adenina são apresentadas, por exemplo, nas SEQ ID Nos: 1-5, 10, 11 e 18.

III. Métodos de Uso

[00109] O DNA desta invenção pode ser utilizado para a produção de mRNA codificado pelo DNA. Em algumas modalidades, um mRNA é codificado pelo DNA da invenção.

[00110] Em algumas modalidades, o DNA da invenção é preparado para a produção de mRNA. Em algumas modalidades, o DNA está dentro de um vetor. Em algumas modalidades, o vetor está dentro de uma célula hospedeira. Em algumas modalidades, um mRNA codificado

pelo DNA desta invenção é usado para traduzir a proteína de interesse codificada pelo DNA.

[00111] Em algumas modalidades, os um ou mais nucleotídeos não adenina impedem a perda de um ou mais nucleotídeos de adenina durante a replicação de DNA, em comparação com a perda que ocorre em um DNA compreendendo uma cauda 3' de um mesmo comprimento ou similar que contém apenas nucleotídeos de adenina. A replicação do DNA é uma etapa necessária no crescimento do plasmídeo para purificação do DNA. Como tal, um plasmídeo compreendendo o DNA desta invenção codificando uma cauda poli-A compreendendo pelo menos 8 nucleotídeos de adenina consecutivos e um ou mais nucleotídeos não adenina pode mostrar estabilidade aprimorada ao longo de mais um ciclo de crescimento e purificação do plasmídeo, em comparação a um plasmídeo codificando uma cauda poli-A que consiste apenas em nucleotídeos de adenina.

[00112] Um plasmídeo compreendendo o DNA desta invenção compreendendo uma sequência codificando uma cauda poli-A compreendendo pelo menos 8 nucleotídeos de adenina consecutivos e um ou mais nucleotídeos não adenina pode ter maior estabilidade quando cultivado em uma célula hospedeira em comparação com um plasmídeo compreendendo um DNA compreendendo uma sequência codificando uma cauda poli-A que consiste apenas em nucleotídeos de adenina consecutivos. Durante o crescimento da célula hospedeira que expressa um plasmídeo com uma sequência de DNA, uma sequência de DNA codificando uma cauda poli-A que compreende nucleotídeos de adenina consecutivos e um ou mais nucleotídeos não adenina pode ser resistente a uma diminuição no comprimento do DNA codificando a cauda poli-A em comparação com uma cauda poli-A que consiste apenas em nucleotídeos de adenina. Em algumas modalidades, um plasmídeo compreendendo um DNA codificando uma cauda poli-A

compreendendo um ou mais nucleotídeos não adenina impede a perda de adeninas durante o crescimento de uma célula hospedeira em comparação com um plasmídeo compreendendo um DNA codificando uma cauda poli-A compreendendo apenas nucleotídeos de adenina.

[00113] Qualquer meio de crescimento e purificação de um vetor conhecido por um versado na técnica pode ser usado para o crescimento de uma célula hospedeira codificando um plasmídeo. O processo de crescimento e purificação de um vetor também pode ser referido como preparação de plasmídeo. As etapas padrão da purificação de plasmídeo incluem crescimento de uma cultura bacteriana, colheita e lise das bactérias e purificação do DNA de plasmídeo. Muitos kits estão disponíveis em vários fabricantes para purificar o DNA de plasmídeo. A etapa de preparação do plasmídeo pode ser minipreparação (com rendimento esperado de 20 a 40 µg ou 50 a 100 µg de DNA do plasmídeo), preparação intermediária (com rendimento esperado de 100 a 350 µg de DNA de plasmídeo), maxipreparação (com rendimento esperado de 500- 850 µg de DNA de plasmídeo), megapreparação (com rendimento esperado de 1,5-2,5 mg de DNA de plasmídeo) ou gigapreparação (com rendimento esperado de 7,5-10 mg de DNA de plasmídeo). Para a produção terapêutica de mRNA, os plasmídeos podem ser produzidos em escalas de 100 mg, 1 g, 10 g ou mais. A estabilidade aumentada e a eficiência de replicação de plasmídeos codificando caudas poli-A com nucleotídeos não adeninas, conforme descrito aqui, podem melhorar a consistência e a eficiência dos plasmídeos produzidos nessas escalas.

[00114] Em algumas modalidades, um método de produção de mRNA a partir de um vetor de DNA da presente invenção é abrangido. Em algumas modalidades, o método de produção de mRNA a partir do vetor de DNA compreende linearizar o vetor a jusante da cauda poli-A; desnaturar o vetor linearizado; e entrar em contato com o DNA

desnaturado com uma RNA polimerase na presença de nucleotídeos de RNA, como guanina, citosina, uracil, adenina, ou versão quimicamente modificada de tais nucleotídeos, como pseudouridina, N-1-metil pseudouridina, metoxiuridina, entre outros. Resíduos modificados, como modificações de base, açúcar e cadeia principal de resíduos de nucleotídeos, podem ser usados nos mRNAs, polinucleotídeos e métodos descritos aqui.

[00115] Esta descrição e modalidades exemplificativas não devem ser consideradas limitativas. Para os fins deste relatório descritivo e reivindicações anexas, a menos que indicado de outra forma, todos os números que expressam quantidades, porcentagens ou proporções e outros valores numéricos usados no relatório descritivo e reivindicações devem ser entendidos como modificados em todas as instâncias pelo termo "cerca de", na medida em que ainda não estejam tão modificados. Por conseguinte, a menos que indicado o contrário, os parâmetros numéricos estabelecidos no seguinte relatório descritivo e nas reivindicações anexas são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas se buscam obter. Ao final, e não como uma tentativa de limitar a aplicação da doutrina de equivalentes ao escopo das reivindicações, cada parâmetro numérico deve ser pelo menos interpretado à luz do número de dígitos significativos relatados e pela aplicação de técnicas de arredondamento ordinárias.

[00116] Note-se que, conforme usado neste relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" e "o/a", e qualquer uso singular de qualquer palavra, incluem referentes plurais, a menos que expressamente e inequivocamente limitado a um referente. Como utilizado neste documento, o termo "incluir" e suas variantes gramaticais têm o objetivo de não ser limitativos, de modo que a recitação de itens em uma lista não exclua outros itens semelhantes que

podem ser substituídos ou adicionados aos itens listados.

DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

[00117] Esta tabela fornece uma lista de determinadas sequências aqui referenciadas. Observe novamente que, quando se refere à versão de RNA de uma sequência de DNA na tabela abaixo, T é substituído por U. Ao se referir a uma versão de DNA de uma sequência de RNA na tabela abaixo, U é substituído por T.

Tabela 1

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	CGAGCATCACCAAGGATCTCACGCTGCTCAAAG CGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTAC AAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGG GTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCCTAGCC AGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCC TGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACGTGCTG GTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAA ACAGAGAACCTTGACAACGGATCCATTCCCCA CCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCT TGC GGCGCCAGGAGGACTTTACCCATTCTC AAGGACAACCAGGGAAAAGATCGAGAAAATTCT GACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCAC TGGCGCGCGCAATT CGCGCTTCGCGTGGAT GA C T A G A A A T C A G A G G A A A C C A T C A C T C C T G GA ATTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTT CGGCACAAAGCTTCATCGAACGAATGACCAAC TTCGACAAGAACCTCCAAACGAGAACGGTGCTT CCTAAGCACAGCCTCCTTACGAATACTTCAC GTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAATACGTT ACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCTTCTGTC CGGAGAACAGAACAGCAATTGTCGATCTGC TGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAG CAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAACGATCGA GTGTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGGTG AGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGAACCTAT CATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGA CTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCC TGGAAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCCTTC AGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAG ACCTACGCTCATCTCTCGACGATAAGGTATG AAACAACCTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTT GGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTA TTCGCGATAAACAGAGCGGTAAA ACTATCCTG GATTT CCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGT AACTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTG ACCTTAAGGAGGACATCCAAAAGCACAAAGT GTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACA TCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAG AAGGGAATTCTGCAAACGTGAAGGTGGTCGA CGAGCTGGTGAAGGTATGGACGGCACAAAC CGGAGAACATCGTGAATTGAAATGGCCCGAGAA AACCAAGACTACCCAGAACGGGCCAGAAAAACTC CCGCGAACAGGATGAAGCGGATCGAACAGGAA TCAAGGAGCTGGCAGCCAGATCCTGAAAGAG CACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGA GAAGCTCTACCTGTACTATTGCAAATGGACG GGACATGTACGTGGACCAAGAGACTGGACATCA ATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCAACATC GTTCCACAGTCCTTCTGAAGGATGACTCGATC GATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAA	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	CAGAGGGAAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGG AGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGG CAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAG AAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCG GCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATT ATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGAT TACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGGACTCCC GCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAG CTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCCTGAA AAGCAAACTTGTGTGGACTTCGGAAGGACTT TCAGTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACTA CCATCACGCGCATGACGCATAACCTAACGCTG TGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCCT AAACTTGAATCGGAGTTGTGTACGGAGACTAC AAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAA GTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGA AATACTTCTTTACTCAAACATCATGAACCTTTT CAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAA TCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGA GAAACGGGGCAAATCGTGTGGACAAGGGCA GGGACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGCTCTCT ATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACGAA GTGCAAACCGGCGGATTTCAAAGGAATCGAT CCTCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATCG CACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTAC GGAGGATTGATTGCCGACTGTCGCATACTC CGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAACGGGA AAGAGCAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCT GCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGT TCGAGAAGAACCGATTGATTTCCTCGAGGCG AAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAACGGATCTGAT CATCAAACCCCCAAGTACTCACTGTTCGAACT GGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGG CCGGAGAACTCCAAAAGGAATGAGCTGGCC TTGCCTAGCAAGTACGTCAAACCTCCTATCTT GCTTCGCACTACGAAAAACTCAAAGGGTCACC GGAAGATAACGAACAGAACGAGCTTTCGTGG AGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCG AACAAATCTCCGAGTTCAAAGCGCGTGTCC TCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTG GCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAG AGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCAC CCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCTTCA AGTACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGAT ACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACCGCGACC CTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAA ACTAGGATCGATCTGTCGAGCTGGGTGGCGA TGGCGGTGGATCTCCGAAAAAGAACGGAGAACGG TGTAATGAGCTAGCCATCACATTAAAGCATC TCAGCCTACCATGAGAACATAAGGAGAACATG	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	CGCAAACAGA GAACCTTGA CAACGGAAAGC ATTCCACACC AGATCCATCT GGGTGAGCTG CACGCCATCT TGCGGCGCCA GGAGGACTTT TACCCATTCC TCAAGGACAA CCGGGAAAAG ATCGAGAAAA TTCTGACGTT CCGCATCCCG TATTACGTGG GCCCACTGGC GCGCGGCAAT TCGCGCTTCG CGTGGATGAC TAGAAAATCA GAGGAAACCA TCACTCCTG GAATTCGAG GAAGTTGTGG ATAAGGGAGC TTCCGCACAA TCCTTCATCG AACGAATGAC CAACTTCGAC AAGAATCTCC CAAACGAGAA GGTGCTTCCT AAGCACAGCC TCCTTACGA ATACTTCACT GTCTACAACG AACTGACTAA AGTGAAATAC GTTACTGAAG GAATGAGGAA GCCGGCCTTT CTGAGCGGAG AACAGAAGAA AGCGATTGTC GATCTGCTGT TCAAGACCAA CCGCAAGGTG ACCGTCAAGC AGCTTAAAGA GGACTACTTC AAGAAGATCG AGTGTTCGA CTCAGTGGAA ATCAGCGGAG TGAGGGACAG ATTCAACGCT TCGCTGGAA CCTATCATGA TCTCCTGAAG ATCATCAAGG ACAAGGACTT CCTTGACAAC GAGGAGAACG AGGACATCCT GGAAGATATC GTCCTGACCT TGACCCCTTT CGAGGATCGC GAGATGATCG AGGAGAGGCT TAAGACCTAC GCTCATCTCT TCGACGATAA GGTGATGAAA CAACTCAAGC GCCGCCGGTA CACTGGTTGG GGCCGCCTCT CCCGCAAGCT GATCAACGGT ATTCGCGATA AACAGAGCGG TAAAACATAC CTGGATTTCG AATCGTAACT TCATGCAGTT GATCCACGAC GACAGCCTGA CCTTTAAGGA GGACATCCAG AAAGCACAAG TGAGCGGACA GGGAGACTCA CTCCATGAAC ACATCGCGAA TCTGGCCGGT TCGCCGGCGA TTAAGAAGGG AATCCTGCAA ACTGTGAAGG TGGTGGACGA GCTGGTGAAG GTCATGGGAC GGCACAAACC GGAGAATATC GTGATTGAAA TGGCCCCGAGA AAACCAGACT ACCCAGAAGG GCCAGAAGAA CTCCCGCGAA AGGATGAAGC GGATCGAAGA AGGAATCAAG GAGCTGGCA GCCAGATCCT GAAAGAGCAC CCGGTGGAAA ACACGCAGCT GCAGAACGAG AAGCTCTACC TGTACTATTT GCAAATGGA CGGGACATGT ACGTGGACCA AGAGCTGGAC ATCAATCGGT TGTCTGATTA CGACGTGGAC CACATCGTTC CACAGTCCTT TCTGAAGGAT GAETCCATCG ATAACAAAGGT GTTGACTCGC AGCGACAAGA ACAGAGGGAA GTCAGATAAT GTGCCATCGG AGGAGGTCGT GAAGAAGATG AAGAATTACT GGCAGGCAGCT CCTGAATGCG AAGCTGATTA CCCAGAGAAA GTTTGACAAT	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	CTCACTAAAG CCGAGCGCGG CGGACTCTCA GAGCTGGATA AGGCTGGATT CATCAAACGG CAGCTGGTCG AGACTCGGCA GATTACCAAG CACGTGGCGC AGATCCTGGA CTCCCGCATG AACACTAAAT ACGACGAGAA CGATAAGCTC ATCCGGGAAG TGAAAGGTGAT TACCCCTGAAA AGCAAACATTG TGTCCGGACTT TCGGAAGGAC TTTCAGTTTT ACAAAAGTGAG AGAAAATCAAC AACTACCATC ACGCGCATGA CGCATACCTC AACGCTGTGG TCGGCACCGC CCTGATCAAG AA GTACCCCTA AACTTGAATC GGAGTTTG TACGGAGACT ACAAGGTCTA CGACGTGAGG AAGATGATAG CCAAGTCCGA ACAGGAAATC GGGAAAGCAA CTGCGAAATA CTTCTTTAC TCAAACATCA TGAACTTCTT CAAGACTGAA ATTACGCTGG CCAATGGAGA AATCAGGAAG AGGCCACTGA TCGAAACTAA CGGAGAAACG GGCGAAATCG TGTGGGACAA GGGCAGGGAC TTCGCAACTG TTCGCAAAGT GCTCTCTATG CCGCAAGTCA ATATTGTGAA GAAAACCGAA GTGCAAACCG GC GGATTTTC AAAGGAATCG ATCCTCCCAA AGAGAAATAG CGACAAGCTC ATTGCACGCA AGAAAGACTG GGACCCGAAG AAGTACGGAG GATTGATTC GCCGACTGTC GCATACTCCG TCCTCGTGGT GGCCAAGGTG GAGAAGGGAA AGAGCAAGAA GCTCAAATCC GTCAAAGAGC TGCTGGGAT TACCATCATG GAACGATCCT CGTTCGAGAA GAACCCGATT GATTTCCTGG AGGCGAAGGG TTACAAGGAG GTGAAGAAGG ATCTGATCAT CAAACTGCC AAGTACTCAC TGTTCGAACT GGAAAATGGT CGGAAGCGCA TGCTGGCTTC GGCCGGAGAA CTCCAGAAAG GAAATGAGCT GGCCCTGCCT AGCAAGTACG TCAACTTCCT CTATCTTGCT TCGCACTACG AGAAACTCAA AGGGTCACCG GAAGATAACG AACAGAAAGCA GCTTTCGTG GAGCAGCACA AGCATTATCT GGATGAAATC ATCGAACAAA TCTCCGAGTT TTCAAAGCGC GTGATCCTCG CCGACGCCA CCTCGACAAA GTCCTGTCGG CCTACAATAA GCATAGAGAT AAGCCGATCA GAGAACAGGC CGAGAACATT ATCCACTTGT TCACCCCTGAC TAACCTGGGA GCTCCAGCCG CCTTCAAGTA CTTCGATACT ACTATCGACC GCAAAAGATA CACGTCCACC AAGGAAGTTC TGGACGCGAC CCTGATCCAC CAAAGCATCA CTGGACTCTA CGAAACTAGG ATCGATCTGT CGCAGCTGGG TGGCGATGGT GGCGGTGGAT CCTACCCATA CGACGTGCCT GA CTACGCCT CCGGAGGTGG TGGCCCCAAG AAGAACCGGA AGGTGTGATA GCTAGCCATC	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	ACATTTAAAAA GCATCTCAGC CTACCATGAG AATAAGAGAA AGAAAATGAA GATCAATAGC TTATTTCATCT CTTTTTCTTT TTCGTTGGTG TAAAGCCAAC ACCCTGTCTA AAAAACATAA ATTTCTTAA TCATTTGCC TCTTTCTCT GTGCTTCAAT TAATAAAAAA TGAAAGAAC CTCGAGAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAGCGA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAAC CGAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAA AAAAAAAA A	
RNA de guia único direcionado a SEAP	mC*mU*mC*C CUGAUGGAGA UGACAGGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAUA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAmA mAmAmAmGmU mGmGmCmAmC mCmGmAmGmU mCmGmGmUmG mCmU*mU*mU *mU	8
RNA de guia único direcionado a TTR de camundongo	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUU GAmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	9
12PA - sequência de uma cauda poli-A exemplificativa compreendendo nucleotídeos não adenina com nove conjuntos de 12 sequências consecutivas de interrupção de adenosinas e mononucleotídeos	AAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAA AAAACAAAAAAATAAAAAAAAAACAAA AAAAAAAAAGAAAAAAACAAAAACAAAAAA ATAAAAAAAAAAA	10
8PA - sequência de uma cauda poli-A exemplificativa compreendendo nucleotídeos não adenina com doze conjuntos de 8 sequências consecutivas de	AAAAAAAATAAAAAAAATAAAAAAAACAAAAAAA AAAAAAAAAGAAAAAAATAAAAAAAACAAAAAA AACAAAAAAATAAAAAAAAGAAAAAAACAAAA AAAATAAAAAAA	11

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
interrupção de adenosinas e mononucleotídeos		
PoliA-1 Sequência de flanqueamento de sítios de reconhecimento do iniciador Bcl11a comprendendo cinco sequências de interrupção que separam seis repetições de 12 adenosinas consecutivas	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGCTCGAGAA AAAAAAAAAAATGGAAAAAAAACGGAAAAAA AAAAAAAGGTAAAAAAAAAAATATAAAAAAAA AAACATAAAAAAAAACGTTCATATCGGTTCT AGACCACACTTCTTACTGAGGTCCC	12
PoliA-2 Sequência de flanqueamento de sítios de reconhecimento do iniciador Bcl11a comprendendo cinco sequências de interrupção que separam seis conjuntos de 12 adenosinas consecutivas	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGAATTCTCATCT AGCTCGAGAAAAAATCGAAAAAAAACGT AAAAAAAAAAACTCAAAAAAAAAAGATAAAA AAAAAAACCTAAAAAAAAAAATGTAAAAAAA AAAAGGGAAAGTCTCCATATCGGTTCTAGACC ACACTTCTTACTGAGGTCCC	13
PoliA-3 Sequência de flanqueamento de sítios de reconhecimento do iniciador Bcl11a comprendendo cinco sequências de interrupção que separam seis conjuntos de 12 adenosinas consecutivas	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGCTCGAGGA AGACAAGGGAAAAAAAACGCAAAAAAAA AAACACAAAAAAAATGCAAAAAAAAAAT CGAAAAAAAATCTAAAAAAAAACGTT CATATCGGTTCTAGACCACACTTCTTACTGAGG TCCC	14
PoliA-4 Sequência de flanqueamento de sítios de reconhecimento	TCTTCCTTCAGTCTGTAAACCTCAGCTCGAGAA AAAATTGAAAAAAAACCCAAAAAAAA AAGACAAAAAAAATAGAAAAAAAAG TTAAAAAAAACGTGAAAAAAAATTAA AAAAAAAATCTAGACCACACTTCTTACTGAG	15

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
iniciador Blc11a compreendendo seis sequências de interrupção que separam sete conjuntos de 12 adenossinas consecutivas	GTCCC	
PoliA 1-2 Sequência de flanqueamento de sítios de reconhecimento do iniciador Blc11a compreendendo 11 sequências de interrupção que separam 12 conjuntos de 12 adenossinas consecutivas	TCTTCCTTCAGTCTGAAACCTCAGAACATTCT AGCTCGAGAAAAAAAAAAAAATGGAAAAAAA AACGGAAAAAAAAGGTAAAAAAAAT ATAAAAAAAAAACATAAAAAAAAAACGAAA AAAAAAAACGTAAAAAAAAACTCAAAAAAA AAAAGATAAAAAAAAAACCTAAAAAAA ATGTAAAAAAAAAGGGAAAGTCTTCCATAT CGGTTCTAGACCACACTTCTTACTGAGGTCCC	16
PoliA 3-4 Sequência de flanqueamento de sítios de reconhecimento do iniciador Blc11a compreendendo 12 sequências de interrupção que separam 13 conjuntos de 12 adenossinas consecutivas	TCTTCCTTCAGTCTGAAACCTCAGCTCGAGGA AGACAAGGGAAAAAAAACGCAAAAAAAA AAACACAAAAAAAATGCAAAAAAAAAT CGAAAAAAAATCTAAAAAAAACGAA AAAAAAAACCCAAAAAAAAGACAAAAA AAAAAAATAGAAAAAAAAGTAAAAAAA AAACTGAAAAAAAATTTAAAAAAAAT CTAGACCACACTTCTTACTGAGGTCCC	17
300PA sequência de uma cauda poli-A exemplificativa compreendendo 24 sequências de interrupção que separam 13 repetições de 12 adenossinas consecutivas	AAAAAAAAAATGGAAAAAAAACGGAAA AAAAAAAAGGTAAAAAAAATATAAAAAAA AAAAACATAAAAAAAAACGAAAAAAA CGTAAAAAAAACCTAAAAAAAATGTAAA AAAAAAAAGGGAAAAAAAACGCAAAAAAA AAAACACAAAAAAAATGCACAAAAAAA AATCGAAAAAAAATCTAAAAAAAAC GAAAAAAAACCCAAAAAAAAGACAA AAAAAAAATAGAAAAAAAAGTAAAAAA AAAAAACTGAAAAAAAATTTAAAAAAA AA	18

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	ACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCAGTGGTC AGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAAT CTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAG GATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAA TTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAG ATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCT GAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAA CATTGACAACGGAAGCATTCCCGCACCAGATC CACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACA ACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCA GAATCCGTACTACGTGGACCGCTGGCAAGA GGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAA GAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCG AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAG AGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAG AACCTGCCAACGAAAAGGTCTGCCGAAGCA CAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAG GAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGGAGAA CAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAA GACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGCAGCTGA AGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCG ACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGA TTCAACGCAAGCCTGGAACATACACGACCT GCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC ATCGTCCTGACACTGACACTGTTGAGACAG AGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACG CACACCTGTTGACGACAAGGTATGAAGCAG CTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAG ACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC CTGAAGAGCGACGGATTGCAAACAGAAAATT CATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTACGC GGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCC GGCAATCAAGAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAGGTCGACGA ACTGGTCAAGGTATGGGAAGACACAAGCCGG AAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC AGACAAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAA GGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACC CGGTCGAAAACACACAGCTGACGACAGAAAAG CTGTACCTGACTACCTGCAGAACGGAGAGA CATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACA GAUTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTC CCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGA CAACAAGGTCTGACAAGAAGCGACAAGAACAA	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	<p>GAGGAAAGAGCGACAACGTCCGAGCGAAGA AGTCGTCAAGAACGATGAAGAACTACTGGAGAC AGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGA AAGTTGACAAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCA TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATC ACAAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAG AATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGC TGATCAGAGAAAGTCAAGGTCATCACACTGAAG AGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTT CCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTA CCACCACGCACACGACGCATAACCTGAACGCAG TCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG AAGCTGGAAAGCGAATTCTGCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAA AGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCA AAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTC TTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACG GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGA AGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAG CATGCCGCAGGTCAACATCGTAAGAAGACAG AAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGCAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT CGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGT ACGGAGGATTGACAGCCCCGACAGTCGCATAC AGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGG AAAGAGCAAGAACGACTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGGAATACAATCATGGAAAGAAGCAGC TTCGAAAAGAACCCGATCGACTCCTGGAAAGC AAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAACGGACCTGA TCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGAA CTGGAAAACGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTCCTGTA CCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCGGAAGACAACCGAACAGAAGCAGCTGTT GTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAAT CATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGAGAGAG TCATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTC CTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCC GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC TGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCAGGCA GCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGA AAGAGATAACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGA CGCAACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGAC TGTACGAAACAAGAACGACCTGAGCCAGCTG GGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGA AGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAA GCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAG</p>	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	AAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTT CTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCT AAAAAAACATAAATTCTTTAATCATTTCGCCTCT TTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAAG AACCTCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAA	
mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A compreendendo SEQ ID NO: 3	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGT TCGTGTGTGTGCGTTGCAGGCCTTATTGGAT CCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGA CTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGC AGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCA AGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT GCTGTTGACAGCGGAGAACAGCAGAAGCAA CAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAACAGA ACAAGAAGAACAGAACAGAACATCTGCTACCTGCA GGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTG ACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAACG TTCCTGGTCGAAGAACAGAACAGCACGAAAG ACACCCGATCTCGGAAACATCGTCGACAGA TCGCATACCAACGAAAAGTACCCGACAATCTACC ACCTGAGAAAGAACGCTGGTCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACT GGCACACATGATCAAGTTGAGAGAACACTTCC TGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGC GACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCA GACATACAACCAGCTGTTGAAAGAAAACCGA TCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATC CTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAACAGACT GGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAA AGAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCGCA CTGAGCCTGGGACTGACACCGAACCTCAAGAG CAACTTCGACCTGGCAGAACAGCAGCAAAGCTGC AGCTGAGCAAGGACACATACCGACGACGACCTG GACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCGAGTA CGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGA GCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGA GTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAG CGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACACC ACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTC AGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAAT CTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGATACGCAG GATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAA TTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAG ATGGACGGAACAGAACAGACTGCTGGTCAAGCT GAACAGAGAACAGACTGCTGAGAACAGCAGAGAA CATTGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATC CACCTGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAG	25

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCCTGAAGGACA ACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCA GAATCCCGTACTACGTGGACCGCTGGCAAGA GGAAACAGCAGATTGCATGGATGACAAGAAA GAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCG AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAG AGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAG AACCTGCCAACGAAAAGGTCTGCCGAAGCA CAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAG GAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGGAGAA CAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAA GACAAACAGAAAGGTACAGTCAGCAGCTGA AGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCG ACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGA TTCAACGCAAGCCTGGAACATACCACGACCT GCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC ATCGTCTGACACTGACACTGTTGAAGACAG AGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACG CACACCTGTTCGACGACAAGGTATGAAGCAG CTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAG ACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC CTGAAGAGCGACGGATTGCAAACAGAAACTT CATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCA GGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCCAGCAATCAAGAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAGGTCGACGA ACTGGTCAGGTATGGGAAGACACAAGCCGG AAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC AGACAAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAA GGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACC CGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAG CTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAGAGA CATGTACGTGACCAGGAACGGACATCAACA GAUTGAGCGACTACGACGTGACCATCGTC CCGCAGAGCTTCTGAAAGGACGACAGCATCGA CAACAAGGTCTGACAAGAAGCGACAAGAAC GAGGAAAGAGCGACAACGTCCCAGCGAAGA AGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGAC AGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGA AAGTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCA TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATC ACAAAGCACGTGCGACAGATCCTGGACAGCAG AATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGC TGATCAGAGAAGTCAGGTCATCACACTGAAG	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	AGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTT CCAGTTCTACAAGGTCAAGAGAAATCAACAACTA CCACCACGCACACGACGCATAACCTGAACGCAG TCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG AAGCTGGAAAGCGAATTCTGCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAAGAAAGATGATCGCAA AGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCA AAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTC TTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACG GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAG AGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAG CATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAG AAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGCAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT CGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGT ACGGAGGATTCAAGCAGCCCGACAGTCGCATAC AGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGG AAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGC TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAGC AAAGGGATAACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGA TCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGAA CTGGAAAACCGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACACTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCACACTTCCTGTA CCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTT GTCGAACAGCACAAGCAACTACCTGGACGAAAT CATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGAGAG TCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTC CTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCC GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC TGTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCAGCA GCATTCAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGA AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTGG CGCAACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGAC TGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTG GGAGGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGA AGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAAA GCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAG AAAATGAAGATCAATAGCTATTCTCATCTTTTT CTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCCTGTCT AAAAAAACATAAATTCTTTAATCATTGCTCT TTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAAATGGAAAG AACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAGTGAACAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAA	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A compreendendo SEQ ID NO: 4	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTTGCTTGT TCGTGTGTGTGCGTTGCAGGCCTTATTGGAT CCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGA CTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGC AGTCATCACAGACGAATAACAAGGTCCCGAGCA AGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT GCTGTTCGACAGCGGAGAACAGCAGAAGCAA CAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATA ACAAGAAGAAAGAACAGAACATCTGCTACCTGCA GGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTTCG ACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGC TTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAG ACACCCGATCTCGGAAACATCGTCGACGAAG TCGCATACCAACGAAAAGTACCCGACAATCTACC ACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACT GGCACACATGATCAAGTTCAAGGAGACACTTCC TGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGC GACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCA GACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCGA TCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATC CTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACT GGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAA AGAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCGCA CTGAGCCTGGACTGACACCGAACCTCAAGAG CAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGC AGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTG GACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCGAGTA CGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGA GCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGA GTCAACACAGAAATACAAAGGCACCGCTGAG CGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACACC ACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACGGTC AGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAAT CTTCTTCGACCGAGAGCAAGAACGGATACGCA GATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAA TTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAG ATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCT GAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAA CATTGACAAACGGAAGCAGATCCCGCACCAGATC CACCTGGGAGAACTGCACGCAAATCCTGAGAAG ACAGGAAGACTTCTACCGTCTGAGGACA ACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCA GAATCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGA GGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAA GAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCG AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAG AGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAG AACCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCCGAAGCA	26

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	CAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAG GAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAA CAGAAGAAGGCAATCGTCACCTGCTGTTCAA GACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGCAGCTGA AGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCG ACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGA TTCAACGCAAGCCTGGAACATACCACGACCT GCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC ATCGTCCTGACACTGACACTGTTGAAGACAG AGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACG CACACCTGTTCGACGACAAGGTATGAAGCAG CTGAAGAGAAGAAGATAACACAGGATGGGAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAG ACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC CTGAAGAGCGACGGATTGCAAACAGAAACTT CATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAAG GGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCC GGCAATCAAGAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAGGTCGACGA ACTGGTCAAGGTATGGGAAGACACAAGCCGG AAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAATGAAGAGAAATCGAAGAAGGAATCAA GGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACC CGGTCGAAAACACACAGCTGCAAGAACGAAAAG CTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAAGAGA CATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACA GAUTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTC CCGCAGAGCTTCCCTGAAGGACGACAGCATCGA CAACAAGGTCTGACAAGAAGCGACAAGAAC GAGGAAAGAGCGACAACGTCCCAGCGAAGA AGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGAC AGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGA AAGTTGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAAGTGGACAAGGCAGGATTCA TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATC ACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAG AATGAACACAAAGTACGACGAAAAGCACAAGC TGATCAGAGAAGTCAAGGTATCACACTGAAG AGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTT CCAGTTCTACAAGGTCAAGAAAATCAACAACTA CCACCCACGACACGACGCATAACCTGAACCGCAG TCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG AAGCTGGAAAGCGAATTGCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAA AGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCA AAGTACTTCTTACAGCAACATCATGAACCTTC	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	TTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACG GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAGA AGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAG CATGCCGCAGGTCAACATCGTCAGAACAGACAG AAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGAACAGCGACAAGCTGAT ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT CGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGT ACGGAGGATTCAAGACAGCCCACAGTCGCATAC AGCGTCCTGGTCGTCGAAAGGTGAAAAGGG AAAGAGCAAGAACAGCTGAAGAGCGTCAGGAAC TGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAACAGCAGC TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGC AAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAACAGGACCTGA TCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGAA CTGGAAAACGGAAGAAAGAGAACATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAACGGAAACCGAACTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTA CCTGGCAAGCCACTACGAAAGCTGAAGGGAA GCCCGGAAGAACACGAACAGAACAGCAGCTGTT GTCGAACAGCACAAGCAACTACCTGGACGAAT CATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGAACAGAG TCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTC CTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGAACAGCC GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC TGTTCACACTGACAAACCTGGAGCACCGGCA GCATTCAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGA AAGAGATAACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGA CGCAACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGAC TGTACGAAACAAGAACATGACCTGAGCCAGCTG GGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGA AGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAA GCATCTCAGCCTACCATGAGAACATAAGAGAAC AAAATGAAGATCAATAGCTTATTCACTCTTTTT CTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCCTGTCT AAAAAACATAAATTCTTAAATCATTTCCTCT TTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAAG AACCAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAA AAAACAAAAAAA AAAATAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAA AAAA	
mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A compreendendo SEQ ID NO: 5	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGT TCGTGTGTGTGCGTGCAGGCCTTATTGGAT CCGCCACCATGGACAAGAACAGTCAGCATCGGA CTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGC AGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCA AGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAACAGCAGTCAGGAGACT GCTGTTGACAGCGGAGAACAGCAGAACAGCA CAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAACAGAAGATA	27

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	ACAAGAAGAAAGAACAGAACATGCTACCTGCA GGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTGCG ACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAACGC TTCCTGGTCGAAGAACAGACAAGCAGCACGAAAG ACACCCGATCTCGGAAACATCGTCGACGAAG TCGCATACCAACGAAAAGTACCCGACAATCTACC ACCTGAGAAAGAACAGCTGGTCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACT GGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCC TGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGC GACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCA GACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGA TCAACGCAAGCGGAGTCGACGCCAAAGGCAATC CTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAACAGACT GGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAA AGAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCGCA CTGAGCCTGGGACTGACACCGAACCTCAAGAG CAACTTCGACCTGGCAGAACGCAAAGCTGC AGCTGAGCAAGGACACATACCGACGACGACCTG GACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCGAGTA CGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGA GCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGA GTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAG CGCAAGCATGATCAAGAGATAACGACGAAACACC ACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTC AGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAAT CTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAG GATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAA TTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAG ATGGACGGAACAGAACAGAAACTGCTGGTCAAGCT GAACAGAGAACGACTGCTGAGAACAGCAGAGAA CATTGACAACGGAAGCATTCCGCACCAAGATC CACCTGGGAGAACTGCACGCCAACTCCTGAGAAG ACAGGAAGACTTCTACCGCTTCTGAAGGACA ACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCA GAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGA GGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAA GAGCGAAGAACAAATCACACCGTGGAACTTCG AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAG AGCTTCATCGAAAGAACGAAACTTCGACAAG AACCTGCCAACGAAAAGGTCTGCCGAAGCA CAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAC GAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAA CAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAA GACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGCAGCTGA AGGAAGACTACTTCAAGAACGATCGAATGCTTCG ACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGAACAGA TTCAACGCAAGCCTGGAACATACCAACGACCT GCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC ATCGTCCTGACACTGACACTGTTGAAAGACAG AGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACTG CACACCTGTTGACGACAAGGTCTGAAAGCAG CTGAAGAGAAGAAGATAACACAGGATGGGAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACCGAACATCAGAG ACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC CTGAAGAGCGACGGATTGCAAACAGAAACTT CATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTGAGC GGACAGGGAGACAGCCTGACGAACACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCCAGCAATCAAGAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAGGTCGACGA ACTGGTCAAGGTATGGGAAGACACAAGCCGG AAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAACAGGAATCAA GGAACTGGGAAGGCCAGATCCTGAAAGGAACACC CGGTCGAAAACACACAGCTGACGAAACGAAAAG CTGTACCTGTAACCTGCAGAACGGAGAGA CATGTACGTGACCAGGAACGGACATCAACA GAUTGAGCGACTACGACGTCGACCATCGTC CCGCAGAGCTTCTGAAAGGACGACAGCATCGA CAACAAAGGTCTGACAAGAACGACAAGAAC GAGGAAAGAGCGACAACGTCCCAGCGAAGA AGTCGTCAAGAAGATGAAGAACACTGGAGAC AGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGA AAGTTGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCA TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATC ACAAAGCACGTGACAGATCCTGGACAGCAG AATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGC TGATCAGAGAAGTCAAGGTATCACACTGAAG AGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTT CCAGTTCTACAAGGTAGAGAAATCAACAACTA CCACACGCACACGACGCATACTGAAACGCAG TCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAACAGTACCCG AAGCTGGAAAGCGAATTGCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTAGAAAGATGATCGCAA AGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCA AAAGTACTTCTTACAGCAACATCATGAACCTC TTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACG GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGACAAGGGA AGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAG CATGCCGCAGGTCAACATCGTAAGAACAG AAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGAACAGCAG ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGAT CGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGT ACGGAGGATTGACAGCCCACAGTCGCATAC	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	GGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCC TGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGC GACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCA GACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGA TCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATC CTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACT GGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAA AGAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCGCA CTGAGCCTGGACTGACACCGAACTTCAAGAG CAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGC AGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTG GACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTA CGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGA GCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGA GTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAG CGCAAGCATGATCAAGAGATAACGACGAACACC ACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTC AGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAAT CTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGATACGCAG GATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAA TTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAG ATGGACGGAACAGAACGAACTGCTGGTCAAGCT GAACAGAGAACGACTGCTGAGAAAGCAGAGAA CATTGACAAACGGAAGCATCCCACCGACATC CACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACA ACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCA GAATCCCCTGACTACGTCGGACCGCTGGCAAGA GGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAA GAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCG AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAG AGCTTCATCGAAAGAACGAAACTTCGACAAG AACCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCCGAAGCA CAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAG GAATGAGAACGCCGGCATTCTGAGCGGAGAA CAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAA GACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGCAGCTGA AGGAAGACTACTTCAAGAACGATCGAATGCTTCG ACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGA TTCAACGCAAGCCTGGAACATACCACGACCT GCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGG ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC ATCGTCTGACACTGACACTGTTGAGACAG AGAAATGATCGAAGAACGACTGAAGACATACG CACACCTGTCGACGACAAGGTCAAGCAG CTGAAGAGAACGAGATAACACAGGATGGGGAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAG ACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC CTGAAGAGCGACGGATTGCAAACAGAAACTT	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	CATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCA GGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCCAGCAATCAAGAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAGGTCTGACGA ACTGGTCAAGGTATGGAAAGACACAAGCCGG AAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC AGACAAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAA GGAACGGAAAGCCAGATCCTGAAGGAACACC CGGTCGAAACACACAGCTGCAGAACGAAAG CTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGA CATGTACGTCGACCAGGAACGGACATCAACA GAUTGAGCGACTACGACGTCGACCACTCGTC CCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGA CAACAAGGTCTGACAAGAAGCGACAAGAAC GAGGAAAGAGCGACAACGTCCGAGCGAAGA AGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGAC AGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGA AAGTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCA TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATC ACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAG AATGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAGC TGATCAGAGAAGTCAAGGTATCACACTGAAG AGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTT CCAGTTCTACAAGGTCAAGAGAAATCAACAACTA CCACCACGCACACGACGCATAACCTGAACGCAG TCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG AAGCTGGAAAGCGAATTCTGCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAA AGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCA AAGTACTTCTCTACAGCAACATCATGAACCTC TTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACG GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGA AGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAG CATGCCGCAGGTCAACATCGTCAGAACAGACAG AAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGAACAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT CGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGT ACGGAGGATTCAAGACAGCCGACAGTCGCATAC AGCGTCCTGGTCGCAAGGTCAAGAACAGG AAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGAAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGC TTCGAAAAGAACCCGATCGACTCCTGGAAAGC AAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAACAGGACCTGA TCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGAA CTGGAAAACCGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAACGGAAACGAACAG	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTA CCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCGGAAGACAACGAACAGAACAGCTGTT GTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAAT CATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGAGAG TCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTC CTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCC GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC TGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCA GCATTCAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGA AAGAGATAACAAAGCACAAAGGAAGTCCTGGA CGCAACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGAC TGTACGAAACAAGAACATCGACCTGAGCCAGCTG GGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCCGAAGAAGA AGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAAA GCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAG AAAATGAAGATCAATAGCTTATTCTATCTTTTT CTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCCTGTCT AAAAAAACATAAATTCTTAATCATTTCGCTCT TTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAAG AACCAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAATAAAA AAAAAAAAACAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAA CAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAACAAAAAA AAAAAATAAAAAAAAAAA	
mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A compreendendo SEQ ID NO: 11	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGT TCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTGGAT CCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGA CTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGC AGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCA AGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAACAGCAAGAACAGAC GCTGTTGACAGCGGAGAACAGCAGAACAGCA CAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAACAGATAC ACAAGAACAGAACAGAACATCTGCTACCTGCA GGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTG ACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAACG TTCCTGGTCGAAGAACAGAACAGCACGAAAG ACACCCGATCTCGGAAACATCGTCGACGAAG TCGCATACCAACGAAAGTACCCGACAATCTACC ACCTGAGAAAGAACAGCTGGTCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACT GGCACACATGATCAAGTTCAAGAGGACACTTCC TGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGC GACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCA GACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGA TCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATC CTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAACAGACT GGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAA AGAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCGCA CTGAGCCTGGACTGACACCGAACTTCAAGAG	29

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	CAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGC AGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTG GACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCGAGTA CGCAGACCTTCTCTGGCAGCAAAGAACCTGA GCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGA GTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAG CGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACC ACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACGGTC AGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAAT CTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGATACGCAG GATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAA TTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAG ATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCT GAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAA CATTGACAACGGAAGCATCCGCACCGAGATC CACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACA ACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCA GAATCCCCTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGA GGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAA GAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCG AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAG AGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAG AACCTGCCAACGAAAAGGTCTGCCGAAGCA CAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAG GAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGGAGAA CAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAA GACAAACAGAAAGGTACAGTCAGCAGCTGA AGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCG ACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGA TTCAACGCAAGCCTGGAACATACCAACGACCT GCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC ATCGTCCTGACACTGACACTGTTGAGACAG AGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACG CACACCTGTTCGACGACAAGGTATGAAGCAG CTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAG ACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC CTGAAGAGCGACGGATTGCAAACAGAAACTT CATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAAG GGACAGGGAGACAGCCTGCAACGACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCCCGGCAATCAAGAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTGTCGACGA ACTGGTCAAGGTATGGGAAGACACAAGCCGG AAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAACAGGAATCAA	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	GGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACC CGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAG CTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAAGAGA CATGTACGTGACCAGGAACCTGGACATCAACA GACTGAGCGACTACGACGTGACCACATCGTC CCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGA CAACAAAGGTCTGACAAGAACGACAAGAAC GAGGAAAGAGCGACAAACGTCCCAGCGAAGA AGTCGTCAAGAACGATGAAGAACTACTGGAGAC AGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGA AAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCA TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATC ACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAG AATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGC TGATCAGAGAACGTCAGGTCAAGGTGATCACACTGAAG AGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTT CCAGTTCTACAAGGTCAAGGAAATCAACAACTA CCACCACGCACACGACGCATAACCTGAACGCAG TCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAACGACTACCC AAGCTGGAAAGCGAATTGCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAA AGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCA AAGTACTTCTTACAGCAACATCATGAACTTC TTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAACG GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGG AGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAG CATGCCGCAGGTCAACATCGTCAGAACAGACAG AAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGAACAGCGACAAGCTGAT ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT CGCAAGAAAGAAGGACTGGACCCGAAGAAGT ACGGAGGATTGACAGCCCCGACAGTCGCATAC AGCGTCCTGGTCGCAAGGTCGAAAAGGG AAAGAGCAAGAACGTCAGAAAGGCTGCAAGGAAC TGCTGGAAATACAATCATGGAAAGAACGAGC TTCGAAAAGAACCGATCGACTTCCTGGAAAGC AAAGGGATAACAAGGAAGTCAAGAACGGACCTGA TCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGAA CTGGAAAACGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAACGGAAACGAAACTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCACACTTCCTGTA CCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCGGAAGACAACGAAACAGAACGAGCAGCTGTT GTCGAACAGCACAAGCAACTACCTGGACGAAAT CATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGAGAG TCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTC CTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGAGACAAGCC GATCAGAGAACAGGCAGAAACATCATCCACC TGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCAGGCA	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	GCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGA AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGA CGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGAC TGTACGAAACAAGAACATCGACCTGAGCCAGCTG GGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCCGAAGAAGA AGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAA GCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAG AAAATGAAGATCAATAGCTTATTCTATCTTTTT CTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCCTGTCT AAAAAAACATAAATTCTTAATCATTTCGCTCT TTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAAG AACCAAAAAAAATAAAAAAAATAAAAAAAACAAA AAAAAAAAAAAAAGAAAAAAATAAAAAAAACAA AAAAAAACAAAAAAATAAAAAAAAGAAAAAAAC AAAAAAATAAAAAAAA	
mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A compreendendo SEQ ID NO: 19	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTTGCTTGT TCGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTGGAT CCGCCACCATGGACAAGAACAGCGTCGGATGGGC CTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGC AGTCATCACAGACGAATAACAAGGTCCCGAGCA AGAAGTTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT GCTGTTGACAGCGGAGAACAGCAGAACAGCAA CAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAACAGATA ACAAGAACAGAACAGAACAGAACATGCTACCTGCA GGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTG ACGACAGCTTCCACAGACTGGAAGAACGC TTCCTGGTCGAAGAACAGAACAGAACAG ACACCCGATCTCGGAAACATCGTCGACGAAG TCGCATACCAACGAAAAGTACCCGACAATCTACC ACCTGAGAAAGAACGCTGGTCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACT GGCACACATGATCAAGTTCAAGGACACTTCC TGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGC GACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCA GACATACAACCAAGCTGTTGAAAGAAAACCGA TCAACGCAAGCGGAGTCGACGCCAAAGGCAATC CTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAACAGACT GGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAA AGAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCGCA CTGAGCCTGGACTGACACCGAACCTCAAGAG CAACTTCGACCTGGCAGAACAGCACGAAAGCTGC AGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTG GACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCGAGTA CGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGA GCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGA GTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAG CGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACC ACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACGGTC AGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAAT	30

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	<p>CTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAG GATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAA TTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAG ATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCT GAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAA CATTGACAAACGGAAGCATCCCGCACAGATC CACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACA ACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCA GAATCCCCTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGA GGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAA GAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCG AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAG AGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAG AACCTGCCAACGAAAAGGTCTGCCGAAGCA CAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAG GAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAA CAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAA GACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGCAGCTGA AGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCG ACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGA TTCAACGCAAGCCTGGAACATACCAACGACCT GCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC ATCGTCCTGACACTGACACTGTTGAAGACAG AGAAATGATCGAAGAAAAGACTGAAGACATACG CACACCTGTTCGACGACAAGGTATGAAGCAG CTGAAGAGAAGAAGATAACACAGGATGGGAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAG ACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC CTGAAGAGCGACGGATTGCAAACAGAAACTT CATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAACGGCACAGGTCAAC GGACAGGGAGACAGCCTGACGAACACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAGGTCTGACGA ACTGGTCAGGTATGGGAAGACACAAGCCGG AAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAA GGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACC CGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAG CTGTACCTGACTACCTGCAGAACGGAAAGAGA CATGTACGTCGACCAGGAACGGACATCAACA GACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTC CCGCAGAGCTTCTGAGGACGACAGCAGTC CAACAAAGGTCTGACAAGAAGCGACAAGAAC GAGGAAAGAGCGACAACGTCCCAGCGAAGA AGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGAC</p>	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	AGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGA AAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAAGTGGACAAGGCAGGATTCA TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATC ACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAG AATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGC TGATCAGAGAAGTCAAGGTATCACACTGAAG AGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTT CCAGTTCTACAAGGTACAGAGAAAATCAACA CCACCACGCACACGACGCATAACCTGAACGCAG TCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG AAGCTGGAAAGCGAATTCTGTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAA AGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCA AAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAAC TTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACG GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGG AGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAG CATGCCGCAGGTCAACATCGTAAGAAGACAG AAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCTGAT CGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGT ACGGAGGATTGACAGCCCACAGTCGCATAC AGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTGAAAGGG AAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGGAATACAATCATGGAAAGAAGCAGC TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAGC AAAGGGATAACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGA TCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGAA CTGGAAAACCGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAAC GCACTGCCGAGCAAGTACGTCACACTCCTGTA CCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTT GTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAAT CATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGAAGAGAG TCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTC CTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCC GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC TGTTCACACTGACAAACCTGGAGCACCAGCA GCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGA AAGAGATAACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGA CGCAACACTGATCCACCCAGAGCATCACAGGAC TGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTG GGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCAGAGAAGA AGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAA GCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAG AAAATGAAGATCAATAGCTTATTCTCTTTTT CTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCT	

Descrição	Seq ID No.	Sequência
		AAAAAAACATAAATTCTTAATCATTTCGCCTCT TTTCTCTGTGCTTCATAATAAAAATGGAAAG AACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A compreendendo SEQ ID NO: 2	31	TCCCCGAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGT TCGTGTGTGTCGTTGCAGGCCATTTCGGAT CCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGA CTGGACATCGAACAAACAGCGTCGGATGGC AGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCAGCA AGAAGTCAAGGTCTGGAAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT GCTGTTCGACAGCGGAGAACAGCAGAACAGCAA CAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAACAGA ACAAGAACAGAACAGAACATCTGCTACCTGCA GGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTG ACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAAGAACG TTCCTGGTCGAAGAACAGCAAGAACAGCAAAG ACACCCGATCTCGAACATCGTCGACGAAG TCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACC ACCTGAGAACAGACTGGTCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACT GGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCC TGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGC GACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCA GACATACAACCAAGCTGTTGAAGAAAACCGA TCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATC CTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAACAGCT GGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAA AGAAGAACGGACTGTTCGAACCTGATCGCA CTGAGCCTGGACTGACACCGAACTTCAAGAG CAACTTCGACCTGGCAGAACAGCAGAAAGCTGC AGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTG GACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCGAGTA CGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGA GCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGA GTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAG CGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACC ACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTC AGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAAT CTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGATACGCAG GATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAA TTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAG ATGGACGGAACAGAACAGAACACTGCTGGTCAAGCT GAACAGAGAACAGACCTGCTGAGAACAGCAGAGAA CATTGACAAACGGAAGCATCCCGCACAGATC CACCTGGGAGAACACTGACGCAATCCTGAGAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACA ACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCA GAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGA

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	GGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAA GAGCGAAGAACAAATCACACCGTGGAACTTCG AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAG AGCTTCATCGAAAGAACATGACAAACTTCGACAAG AACCTGCCAACGAAAAGGTCTGCCGAAGCA CAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAG GAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGGAGAA CAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAA GACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGCAGCTGA AGGAAGACTACTTCAAGAACATCGAATGCTTCG ACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGA TTCAACGCAAGCCTGGAACATACCACGACCT GCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC ATCGTCCTGACACTGACACTGTTGAAGACAG AGAAATGATCGAAGAAAAGACTGAAGACATACG CACACCTGTTCGACGACAAGGTCAAGCAG CTGAAGAGAAGAAGATAACACAGGATGGGAAG ACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACCGGAATCAGAG ACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC CTGAAGAGCGACGGATTGCAAACAGAAACTT CATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAACGGCACAGGTCA GGACAGGGAGACAGCCTGACGAACACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCCAGCAATCAAGAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAGGTCGACGA ACTGGTCAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGG AAAACATCGTCATGAAATGGCAAGAGAAAACC AGACAACACAGAAGGGACAGAACAGCAGA GAAAGAATGAAGAGAACATCGAACAGAACAG GGAACACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACC CGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAG CTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAAGAGA CATGTACGTCGACCAGGAACGGACATCAACA GAUTGAGCGACTACGACGTCGACCATCGTC CCGCAGAGCTTCTGACAGGACAGCAGCATCGA CAACAAGGTCTGACAAGAACGACAAGAAC GAGGAAAGAGCGACAACGTCCCAGCGAAGA AGTCGTCAAGAACATGAAGAACACTGGAGAG AGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGA AAGTTGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGGATTCA TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATC ACAAAGCACGTCGACAGATCCTGGACAGCAG AATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGC TGATCAGAGAACATGCAAGGTCAAGGTCATCAC AGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTT CCAGTTCTACAAGGTCAAGAACATCAACAACTA CCACCACGCACACGACGCATAACCTGAACGCAG	

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
	TCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG AAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAA AGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCA AAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTC TTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGA AATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACG GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGG AGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAG CATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAG AAGTCCAGACAGGAGGGATTCAAGAAGGAAAGC ATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT CGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGT ACGGAGGATTGACAGCCGACAGTCGCATAC AGCGTCCTGGTCGTGCAAAGGTGAAAAGGG AAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAC TGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGC TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAGC AAAGGGATAACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGA TCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGAA CTGGAAAACGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAG CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACGT GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTA CCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTT GTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAAT CATCGAACAGATCAGCGAATTCAAGAGAG TCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTC CTGAGCGCATACAACAAAGCACAGAGACAAGCC GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC TGTTCACACTGACAAACCTGGAGCACCAGCA GCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGA AAGAGATAACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGA CGCAACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGAC TGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTG GGAGGAGACGGAGGGAGGAAGCCCGAAGAAGA AGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAAAAA GCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAG AAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTTTTT CTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCCTGTCT AAAAAAACATAAATTCTTAAATCATTTCGCTCT TTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAAATGGAAAG AACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAACAAAAA AAAAAAACAAAAA	

[00118] A ligação ou ligação fosforotioato (PS) refere-se a uma ligação em que um enxofre é substituído por um oxigênio fosfato não

formador de ponte em uma ligação de fosfodiéster, por exemplo, nas ligações entre bases de nucleotídeos. Quando fosforotioatos são utilizados para gerar oligonucleotídeos, os oligonucleotídeos modificados também podem ser referidos como S-oligos.

[00119] Um "*" pode ser usado para representar uma modificação do PS. Neste pedido, os termos A*, C*, U* ou G* podem ser usados para denotar um nucleotídeo que está ligado ao próximo (por exemplo, 3') nucleotídeo com uma ligação PS.

[00120] Neste pedido, os termos "mA*", "mC*", "mU*" ou "mG*" podem ser usados para indicar um nucleotídeo que foi substituído por 2'-O-Me e que está ligado ao próximo nucleotídeo (por exemplo, 3') com uma ligação PS.

EXEMPLOS

[00121] Os exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar certas modalidades divulgadas e não devem ser interpretados como limitando o escopo desta descrição de forma alguma.

Exemplo 1 - Projeto e estabilidade de plasmídeos estáveis para codificação de poli-A

[00122] As caudas poli-A foram projetadas que compreendiam nucleotídeos não adeninas. A estabilidade dos plasmídeos codificando essas caudas poli-A com nucleotídeos de adenina consecutivos e nucleotídeos de não adenina (por exemplo, sequências de interrupção) foram comparadas às caudas poli-A compostas exclusivamente por nucleotídeos de adenina.

[00123] A questão da perda do número de adenosinas em uma cauda de mRNA de poli-A consistindo apenas em adenosinas é destacada na Tabela 2. Uma sequência contendo uma cauda poli-A de 96 adenosinas foi inserida em um plasmídeo pUC57 (Genscript) e transformada em *E. coli*. As células foram plaqueadas em placas LB-Amp e incubadas durante a noite a 30°C ou 37°C. Oito colônias foram

colhidas e inoculadas em placas de 96 poços com meio LB-Amp e cultivadas durante a noite a 30°C ou 37°C (Dia 1). Amostras das culturas do dia 1 foram adicionadas a meio LB-Amp fresco e cultivadas por mais dois dias a 30°C ou 37°C (Dia 2). O DNA foi purificado a partir das culturas dos Dias 1 e 2 e sequenciado para determinar o comprimento da cauda poli-A nos plasmídeos. Resultados exemplificativos são mostrados na Tabela 2 abaixo e na Figura 1.

Tabela 2: Comprimento de poli-A após o crescimento do plasmídeo em E. Coli

37°C			30°C	
Tamanho inicial da colônia	Dia 1 comprimento poli-A	Dia 2 comprimento poli-A	Tamanho inicial da colônia	Dia 1 comprimento poli-A
Sm	95	18	Reg	80
Reg	95	68	Sm	95
Reg	95	94	Reg	39
Sm	95	N/A	Reg	48
Reg	96	N/A	Sm	95
Sm	36-95 mix	18	Sm	95
Sm	62	61	Reg	47
Reg	69	68	Sm	95

[00124] Para um número de colônias, cada ciclo de crescimento foi associado a uma diminuição no número de adeninas na cauda poli-A, com apenas uma colônia mantendo mais de 90 adeninas através de dois ciclos de replicação. Além disso, o tamanho das colônias bacterianas se correlacionou com a perda de comprimento da cauda poli-A do plasmídeo (ou seja, colônias maiores corresponderam à perda de comprimento de poli-A), sugerindo que sequências codificando caudas poli-A mais longas podem inibir o crescimento bacteriano durante a produção de plasmídeo. O DNA purificado a partir de colônias

de *E. coli* representa uma população de DNAs de *E. coli* individual contendo DNA de plasmídeo. Assim, os valores fornecidos na Tabela 2 (e valores semelhantes descritos aqui) representam o comprimento médio de poli-A da população. Além disso, durante a PCR e o sequenciamento de repetições longas, como a poli-A, a polimerase pode deslizar, resultando na aparência de que a sequência é um pouco mais curta que a sequência real. Assim, para resultados mostrando 95 adenosinas, não é certo se o plasmídeo perdeu uma adenosina ou se é um artefato de PCR. No entanto, a perda significativa não é um artefato do deslize da polimerase durante a amplificação e sequenciamento de PCR.

[00125] Em uma experiência separada, *E. coli* foi transformada com um plasmídeo pUC57 contendo uma cauda poli-A de SEQ ID NO: 1 e plaqueada em placas LB-Amp. Oito clones foram cultivados através de dois ciclos de crescimento e testados quanto à manutenção da sequência codificando a cauda poli-A. Dados representativos sobre um clone são mostrados na Figura 2, onde não foi observada alteração no tamanho da cauda com a cauda poli-A da SEQ ID NO: 1 ao longo de 2 ciclos de crescimento de um plasmídeo que o codifica. Miniprep 1 refere-se ao primeiro ciclo de crescimento, enquanto Miniprep 2 refere-se à segunda rodada de crescimento. Os minipreps foram realizados usando um kit Invitrogen Purelink Quick Plasmid Miniprep.

[00126] Um plasmídeo codificando uma cauda poli-A com um padrão adicional de não adenosina (SEQ ID NO: 3) foi testado quanto à sua capacidade de suportar a replicação em *E. coli*. Uma sequência contendo uma cauda poli-A da SEQ ID NO: 3 foi inserida em um plasmídeo pUC19 (Genscript) e transformada em *E. coli*. As células foram plaqueadas em placas LB-Kan e incubadas durante a noite a 30°C ou 37°C. Oito colônias foram colhidas e inoculadas em placas de 96 poços com meio LB-Kan e cultivadas durante a noite a 30°C ou 37°C

(Dia 1). Amostras das culturas do dia 1 foram adicionadas a meio LB-Kan fresco e cultivadas por mais dois dias a 30°C ou 37°C (Dia 2). O DNA foi purificado a partir das culturas dos Dias 1 e 2 e sequenciado para determinar o comprimento da cauda poli-A nos plasmídeos. Das oito culturas do Dia 1 sequenciadas, seis mantiveram trechos de 25, 24, 24 e 24 adenosinas e das doze culturas do Dia 2 sequenciadas, nove mantiveram trechos de 25, 24, 24 e 24 adenosinas, demonstrando uma melhora da retenção de poli-A em comparação com sequências apenas de adenosina.

[00127] Estes dados indicam que os DNAs codificando caudas poli-A compreendendo nucleotídeos não adeninas têm estabilidade melhorada ao longo de vários ciclos de crescimento e purificação de plasmídeo em comparação com os DNAs codificando caudas poli-A contendo apenas adenosinas.

Exemplo 2 - Atividade de construtos com caudas poli-A compreendendo nucleotídeos não adeninas

[00128] Foram realizadas experiências para determinar se havia uma diferença na eficácia do mRNA com caudas poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina (sequências de interrupção) versus aquelas com caudas poli-A contendo apenas adenosinas. Um sistema modelo foi usado onde o mRNA codificando a proteína Cas9 foi transfetado por eletroporação em células HEK-293 com um plasmídeo repórter codificando a fosfatase alcalina embrionária secretada (SEAP), bem como um RNA guia direcionado a SEAP. A expressão bem-sucedida da proteína Cas9 a partir do mRNA resulta na clivagem da sequência alvo SEAP, levando a uma mudança de cor que reflete a produção diminuída de SEAP. Os reagentes repórter SEAP HEK-Blue foram obtidos da Invivogen. Uma sequência contendo um promotor T7 e codificando um mRNA de Cas9 com cauda poli-A somente de adenosina (projetada para ter 100 nucleotídeos de adenosina, mas

mostrada como tendo 97 nucleotídeos de adenosina por sequenciamento) (SEQ ID NO: 6) ou uma sequência contendo um promotor T7 e codificando um mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A de SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 7) foram clonados no plasmídeo pUC57 (Genscript). O mRNA foi produzido por transcrição in vitro a partir dos plasmídeos linearizados codificando cada mRNA.

[00129] A Figura 3 mostra a titulação do mRNA de Cas9 com poli-A apenas de adenosina ou poli-A de SEQ ID NO: 1 no ensaio de células HEK-Blue em concentrações de 0,005-50nM, e 1 μ M de RNA guia único direcionado a SEAP (SEQ ID NO : 8)

[00130] Os resultados do HEK-Blue mostram que o efeito do mRNA com a cauda poli-A foi semelhante na curva dose-resposta. Concentrações mais altas de mRNA levaram a uma diminuição na expressão do gene repórter de SEAP, como evidenciado pela mudança de cor para rosa, pois a cor azul da linha de base indica a expressão de SEAP. Assim, a cauda poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina não alterou a eficácia da expressão e função de um construto Cas9 em comparação com uma cauda poli-A contendo apenas adenosinas.

[00131] A eficácia da edição conferida pela expressão de um mRNA de Cas 9 da SEQ ID NO: 6 também foi comparada ao mRNA de Cas9 de SEQ ID NO: 7 (isto é, cauda poli-A somente de adenosina em comparação com a cauda poli-A de SEQ ID NO: 1) Para estas experiências, as células HEK-Blue foram transfetadas com sgRNA (SEQ ID NO: 8) e os dois mRNAs diferentes por eletroporação.

[00132] A Figura 4 mostra a porcentagem de inibição de SEAP para ambos os construtos após 24 horas de incubação. O EC₅₀ para edição de SEAP para mRNA com uma cauda poli-A contendo apenas adenosina e uma cauda poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina foram semelhantes em 0,050 e 0,054, respectivamente.

[00133] A Figura 5 mostra a porcentagem de inibição de SEAP para

ambos os construtos após uma incubação de 48 horas. O EC₅₀ para edição de SEAP para mRNA com uma cauda poli-A contendo apenas adenosina e uma cauda poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina foram semelhantes em 0,086 e 0,082, respectivamente.

[00134] A expressão e atividade do mRNA também foram confirmadas *in vivo*. Os mRNAs de Cas9 de SEQ ID NO: 6 (mRNA de HiCas9) e SEQ ID NO: 7 (mRNA de PolyA interrompido) foram formulados com RNA de guia único de SEQ ID NO: 9 (direcionado ao gene TTR de camundongo) na razão de 1:1 em nanopartículas lipídicas (LNPs) e administradas a camundongos fêmeas CD-1 ($n = 5$) por dosagem intravenosa a 1 ou 0,5 mg/kg de RNA total. O sangue foi coletado dos animais 7 dias após a dose e os níveis séricos de proteína TTR foram medidos por ELISA. Em resumo, os níveis séricos totais de TTR foram determinados usando um Kit ELISA de Pré-albumina de Camundongo (Transtiretina) (Aviva Systems Biology, Cat. OKIA00111). Os reagentes e padrões do kit foram preparados de acordo com o protocolo do fabricante. A placa foi lida em um leitor de placas SpectraMax M5 a uma absorbância de 450 nm. Os níveis séricos de TTR foram calculados pelo software SoftMax Pro ver. 6.4.2, utilizando uma curva logística de quatro parâmetros, se ajusta à curva padrão. Os valores finais do soro foram ajustados para a diluição do ensaio.

[00135] A Figura 6 mostra níveis comparáveis de knockdown sérico de TTR (representativo da edição percentual do gene TTR) para ambos os construtos de poli-A 7 dias após a dose. Os resultados de knockdown de TTR sérico foram confirmados pelo sequenciamento do locus de TTR no fígado dos camundongos colhidos aos 7 dias. Os camundongos que receberam o mRNA de poli-A somente para adenosina apresentaram 61,74% e 69,84% de edição em 0,5 e 1 mg/kg de RNA total, respectivamente, enquanto os camundongos que receberam o mRNA de poli-A contendo nucleotídeos não adenosina apresentaram 63,14%

e 70,82% de edição em 0,5 e 1 mg/kg de RNA total.

[00136] Portanto, a expressão de um mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina produziu eficácia de edição semelhante em comparação com um mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A contendo apenas adenosinas.

Exemplo 3 - Atividade de construtos com caudas poli-A compreendendo sequências de interrupção adicionais

[00137] Foram realizadas experiências para determinar a eficácia do mRNA com caudas poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina versus aquelas com caudas poli-A contendo apenas nucleotídeos de adenosina como no Exemplo 2. Sequências contendo um promotor T7 e codificando um mRNA de Cas9 com uma cauda poli-A interrompida compreendendo SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 10 ou SEQ A ID NO: 11 foi feita por amplificação por PCR usando iniciadores para incorporar as sequências poli-A. O mRNA foi produzido por transcrição in vitro desses produtos de PCR. O mRNA para SEQ ID NO: 18 foi produzido por transcrição in vitro a partir de um plasmídeo linearizado codificando o mRNA.

[00138] A Figura 7 mostra a titulação de mRNA de Cas9 com poli-A [100PA] ou apenas com adenosina da SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO: 11 no ensaio de células HEK-Blue em concentrações de 0,02-6nM, e 1µM de RNA único direcionado a SEAP (SEQ ID NO: 8). Especificamente, a Figura 7 mostra a porcentagem de inibição de SEAP para os construtos após uma incubação de 48 horas, e os valores de EC50 são fornecidos na Tabela 3 abaixo. Todas os construtos estão ativos.

Tabela 3: Valores de EC50 para inibição de SEAP

PolíA	Construto de mRNA de Cas9	EC50	Erro Padrão
98 adenosinas consecutivas	Liv (Cas9 N1Me empobrecido em U pseudo U)	0,0627	0,0118

PoliA	Construto de mRNA de Cas9	EC50	Erro Padrão
97 adenosinas consecutivas	100 PA	0,0956	0,0041
SEQ ID NO: 4	16 PA	0,0692	0,0087
SEQ ID NO: 5	16 PA longo	0,0705	2,223
SEQ ID NO: 3	25 PA	0,0500	0,0213
SEQ ID NO: 2	30 PA	0,0591	0,0086
SEQ ID NO: 10	12 PA	0,0549	0,0296
SEQ ID NO: 11	8 PA	0,04233	0,0295

Exemplo 4 - Clonagem de PoliA longa com sequências de interrupção

[00139] Uma cauda polyA de 300 nucleotídeos de comprimento, SEQ ID NO: 18 [300pa], foi projetada compreendendo doze sequências de interrupção da Tabela 4 (abaixo) e 13 repetições de 12 adenosinas consecutivas. As sequências de ancoragem de SEQ ID NOT: 18 foram projetadas para minimizar a hibridação e o auto-recozimento entre as sequências de interrupção de trinucleotídeos dentro da cauda poli-A de ~ 300 nt. A Tabela 4 abaixo fornece sequências de interrupção que minimizam o recozimento entre as sequências de interrupção e incluem as âncoras usadas nesta experiência.

[00140] Para clonar a SEQ ID NO: 18, cada uma das sequências PolyA-1 (SEQ ID NO: 12), PolyA-2 (SEQ ID NO: 13), PolyA-3 (SEQ ID NO: 14) e PolyA-4 (SEQ ID NO: 15) são criadas no mini-vetor pUC57 (Genscript). O plasmídeo pA1-2 é criado amplificando a SEQ ID NO: 12 com os iniciadores Bcl11a, digerindo o produto de PCR com as enzimas de restrição Xhol e AcII e ligando o fragmento de restrição ao plasmídeo

pA2 compreendendo SEQ ID NO: 13 digerido com Xhol e BstBI. O plasmídeo pA3-4 é criado da mesma maneira amplificando a SEQ ID NO: 14 e ligando-o aos mesmos sítios de restrição no plasmídeo pA4. O plasmídeo pA1-4 (compreendendo SEQ ID NO: 18) é montado amplificando a sequência SEQ ID NO: 17 de pA3-4, digerindo o fragmento de PCR com as enzimas de restrição BbsI e XbaI e clonando o fragmento de restrição no polyA 1-2 (SEQ ID NO: 16), digerido com as enzimas de restrição BbsI e XbaI. Os insertos em pA1-2 e pA3-4 são avaliadas por sequenciamento Sanger de ambas as direções usando [iniciador direto pUC-M seq2 e iniciador reverso pUC-M seq] como iniciadores (SEQ ID Nos: 20 e 21).

[00141] A sequência polyA SEQ ID NO: 18 (300PA) é excisada digerindo pA1-4 com Xhol e XbaI para clonagem nos mesmos sítios em um vetor de codificação de proteínas. Todas as etapas são realizadas em condições padrão.

Tabela 4:

CGG CGT CGC

CTG CTT CTC

CAG CAT CAC

CCC CCG CCT

GGG GGT GGC

GCG GCT GCC

GAG GAT GAC

GTG GTT GTC

TGG TGT TGC

TTG TTT TTC

TAG TAT TAC

TCG TTC TCC

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido desoxirribonucleico (DNA), caracterizado pelo fato de que compreende nucleotídeos codificando uma cauda poliadenilada (poli-A) localizada 3' para nucleotídeos codificando uma proteína de interesse, em que a cauda poli-A compreende uma primeira sequência de homopolímero de pelo menos 8 nucleotídeos de adenina (A) consecutivos e uma sequência de interrupção compreendendo um ou mais nucleotídeos não adenina (A).

2. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende ainda uma segunda sequência de homopolímero de pelo menos nucleotídeos de adenina (A) consecutivos.

3. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende três ou mais sequências de homopolímeros de pelo menos 8 nucleotídeos de adenina (A) consecutivos.

4. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a primeira e/ou a sequência de homopolímero subsequente compreende pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35 ou 40 nucleotídeos de adenina consecutivos.

5. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os um ou mais nucleotídeos de não adenina impedem a perda de um ou mais nucleotídeos de adenina durante a replicação de Ácido desoxirribonucleico (DNA), em comparação com a perda que ocorre em um Ácido desoxirribonucleico (DNA) compreendendo uma cauda 3' de um mesmo comprimento ou similar que contém apenas nucleotídeos de adenina.

6. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os um ou mais

nucleotídeos de não adenina são posicionados para interromper os nucleotídeos de adenina consecutivos, de modo que uma proteína de ligação de poli(A) possa ligar a um trecho de nucleotídeos de adenina consecutivos.

7. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende pelo menos 50 nucleotídeos de adenina no total.

8. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende 40-1000, 40-900, 40-800, 40-700, 40-600, 40-500, 40-400, 40-300, 40-200 ou 40-100 nucleotídeos de adenina no total.

9. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende 95 a 100 nucleotídeos de adenina no total.

10. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende ou contém 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 ou 97 nucleotídeos de adenina no total.

11. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende ou contém 96 ou 97 nucleotídeos de adenina no total.

12. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as uma ou mais sequências de interrupção compreendem ou contêm um nucleotídeo de não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos de não adenina.

13. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as uma ou mais sequências de interrupção compreendem ou contêm um nucleotídeo de não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos que inclui

dois ou mais nucleotídeos de não adenina.

14. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que o(s) nucleotídeo(s) não adenina está(ão) localizado(s) após pelo menos 8, 9, 10, 11 ou 12 nucleotídeos de adenina consecutivos.

15. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os um ou mais nucleotídeos de não adenina estão localizados após pelo menos 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

16. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os um ou mais nucleotídeos de não adenina estão localizados após pelo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

17. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que a sequência de interrupção é uma sequência de interrupção de trinucleotídeo, dinucleotídeo ou mononucleotídeo.

18. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo de não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos de não adenina a cada 8 a 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

19. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo de não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos de não adenina a cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46,

47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

20. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende ou contém 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos de não adenina consecutivos a cada 8-50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

21. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende ou contém 1, 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos de não adenina consecutivos a cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 nucleotídeos de adenina consecutivos.

22. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende ou contém mais de um nucleotídeo de não adenina ou mais de um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos de não adenina.

23. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que os mais de um nucleotídeos de não adenina ou mais de um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos de não adenina são espaçados irregularmente dentro da cauda poli-A.

24. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo de não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos de não adenina consecutivos a cada 12 nucleotídeos de adenina consecutivos.

25. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que a cauda

poli-A compreende ou contém um nucleotídeo de não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos de não adenina consecutivos a cada 16 nucleotídeos de adenina consecutivos.

26. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo de não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos de não adenina consecutivos a cada 25 nucleotídeos de adenina consecutivos.

27. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo de não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos de não adenina consecutivos a cada 30 nucleotídeos de adenina consecutivos.

28. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo de não adenina ou 2, 3, 4 ou 5 nucleotídeos de não adenina consecutivos a cada 39 nucleotídeos de adenina consecutivos.

29. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que o nucleotídeo de não adenina é guanina, citosina ou timina.

30. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o nucleotídeo de não adenina é um nucleotídeo de guanina.

31. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o nucleotídeo de não adenina é um nucleotídeo de citosina.

32. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o nucleotídeo de não adenina é um nucleotídeo de timina.

33. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que compreende mais de um nucleotídeo de não adenina selecionado de:

- a. nucleotídeos de guanina e timina;
- b. nucleotídeos de guanina e citosina;
- c. nucleotídeos de timina e citosina; ou
- d. nucleotídeos de guanina, timina e citosina.

34. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que o nucleotídeo de não adenina consiste em um nucleotídeo de não adenina selecionado de guanina, citosina e timina.

35. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que os nucleotídeos de não adenina compreendem dois nucleotídeos de não adenina selecionados de um ou mais de guanina, citosina e timina.

36. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que os nucleotídeos de não adenina compreendem três nucleotídeos de não adenina selecionados de um ou mais de guanina, citosina e timina.

37. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que os nucleotídeos de adenina são monofosfato de adenosina.

38. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que a proteína é uma proteína terapêutica.

39. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a proteína é uma citocina ou quimiocina.

40. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a proteína é um fator

de crescimento.

41. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a proteína é Cas9 ou Cas9 modificada.

42. Ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), caracterizado pelo fato de que é codificado pelo DNA como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores.

43. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com qualquer reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que o DNA está dentro de um vetor.

44. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o vetor está dentro de uma célula hospedeira.

45. Ácido desoxirribonucleico (DNA), de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que os um ou mais nucleotídeos de não adenina previnem a perda de nucleotídeos codificando a cauda poli-A dentro do vetor durante crescimento da célula hospedeira, em comparação com a perda que ocorre em um DNA compreendendo nucleotídeos codificando uma cauda poli-A de um mesmo comprimento ou semelhante que contém apenas nucleotídeos de adenina.

46. Método para produzir mRNA do vetor de DNA, como definido na reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que compreende:

- a. linearizar o vetor a jusante da cauda poli-A;
- b. desnaturar o vetor linearizado; e
- c. contatar o DNA desnaturado com uma RNA polimerase na presença de nucleotídeos de guanina, citosina, uracila e adenina.

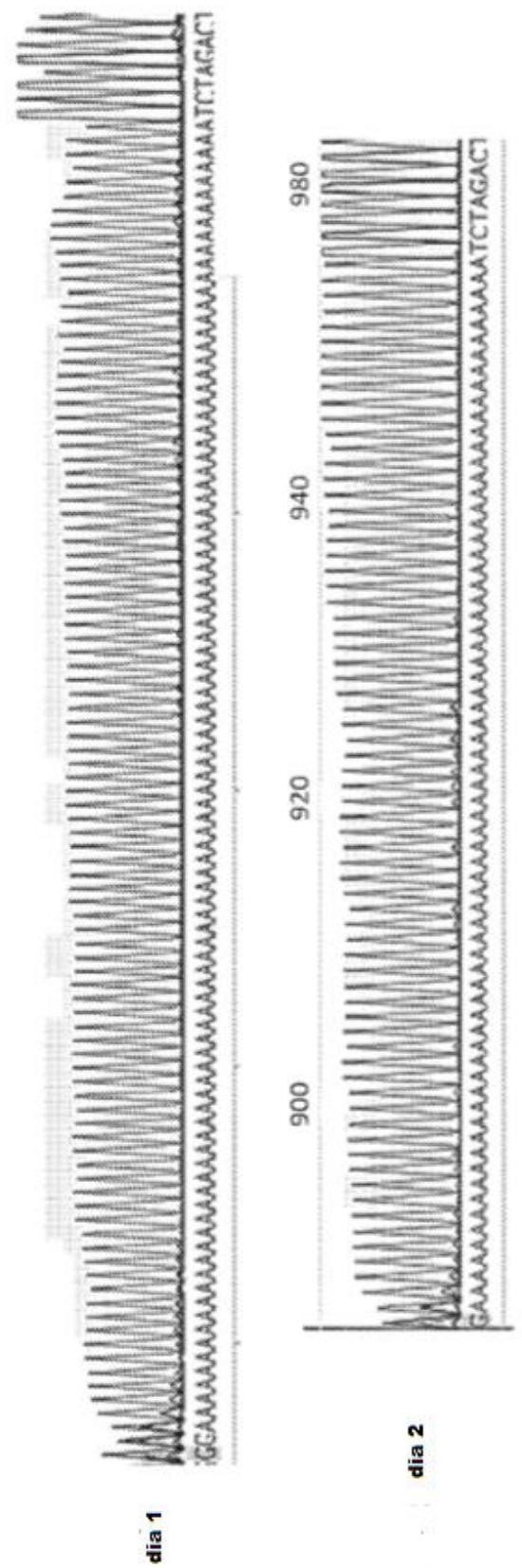


Fig. 1

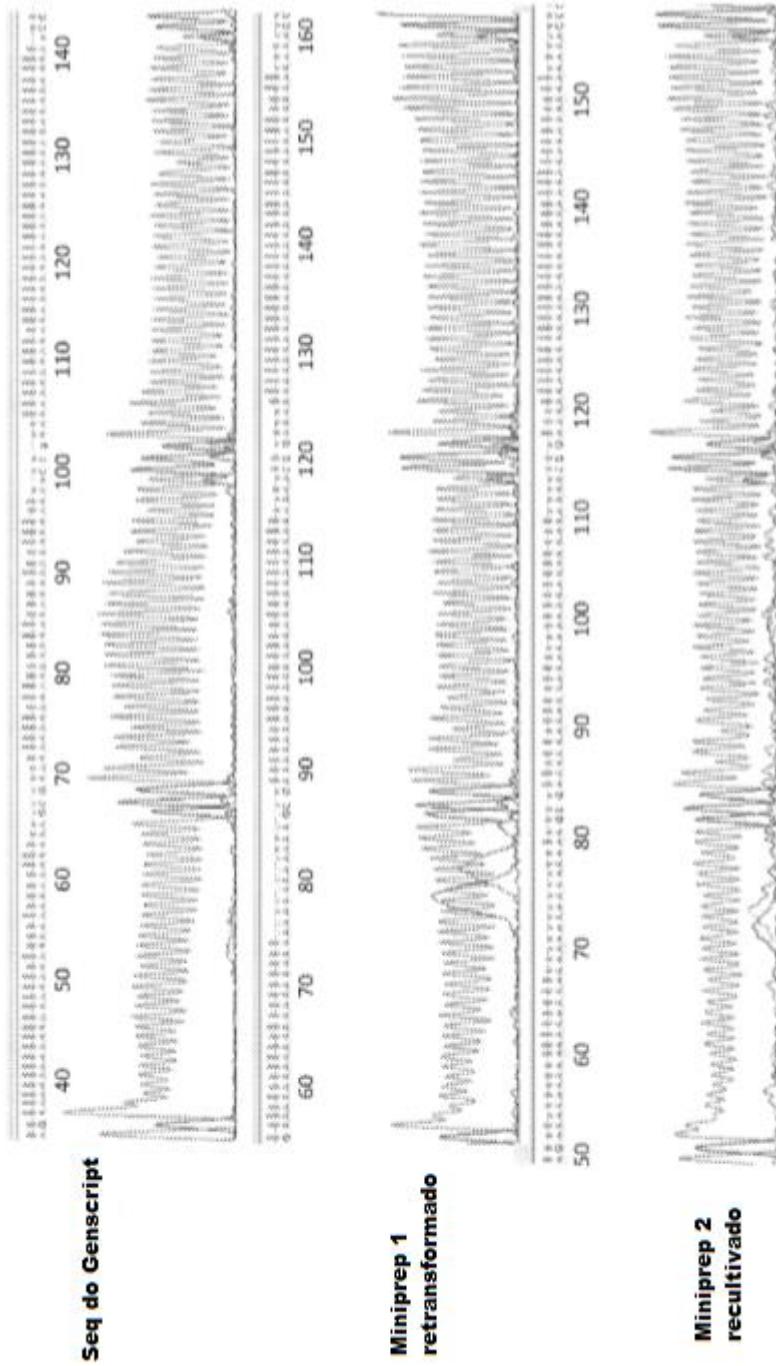


Fig. 2

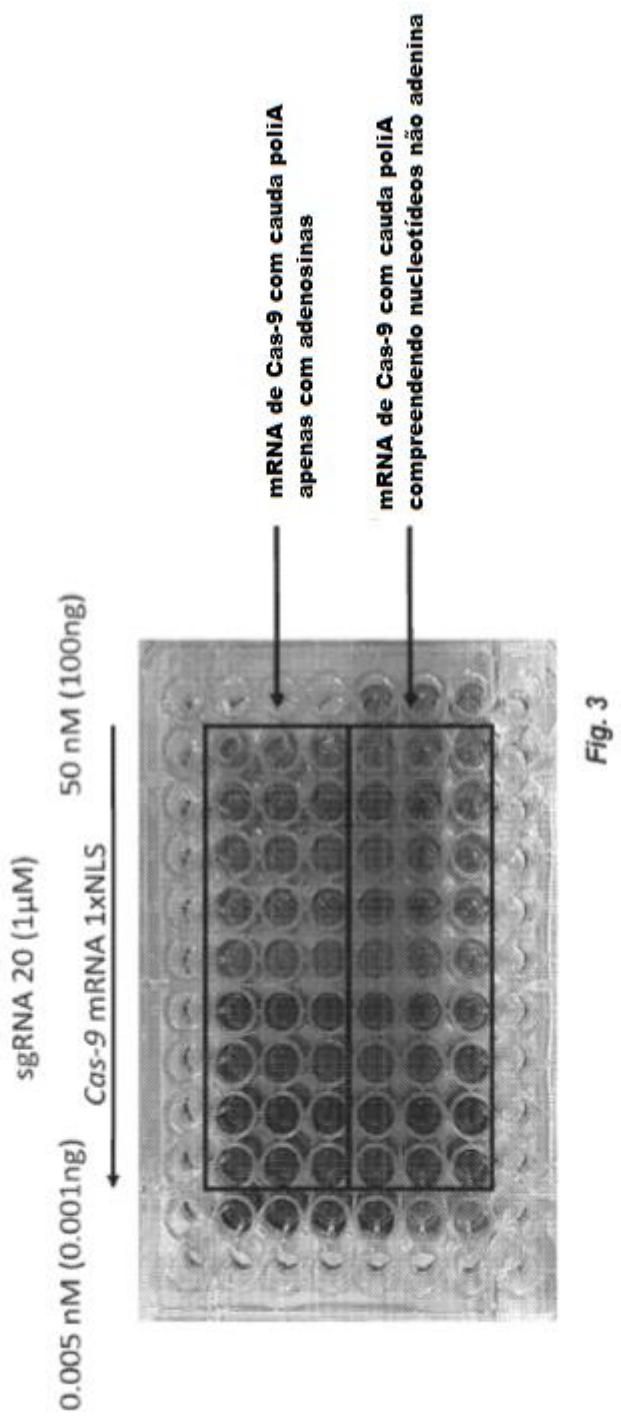


Fig. 3

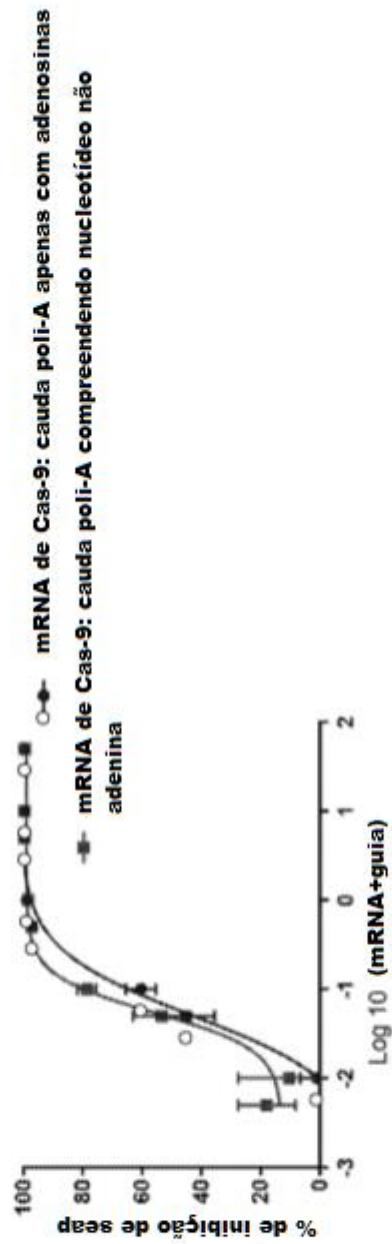


Fig. 4

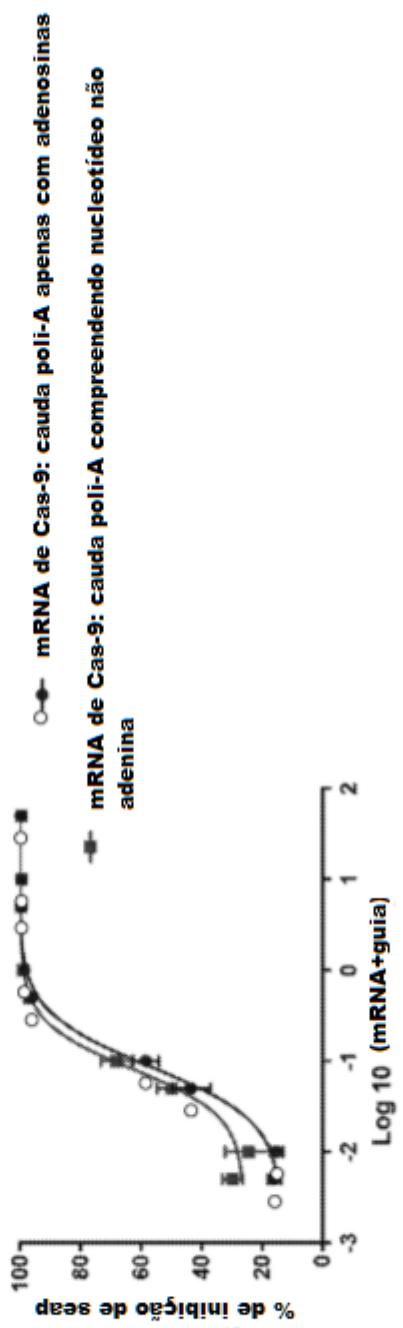


Fig. 5

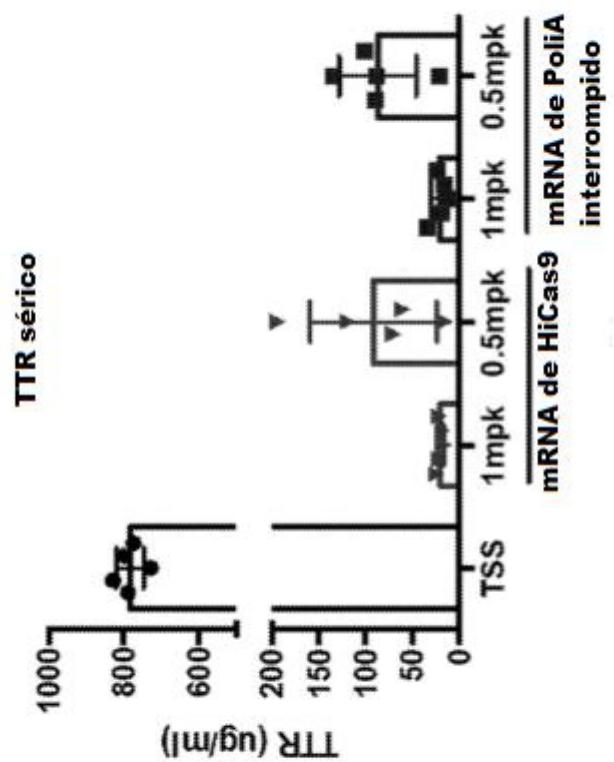


Fig. 6

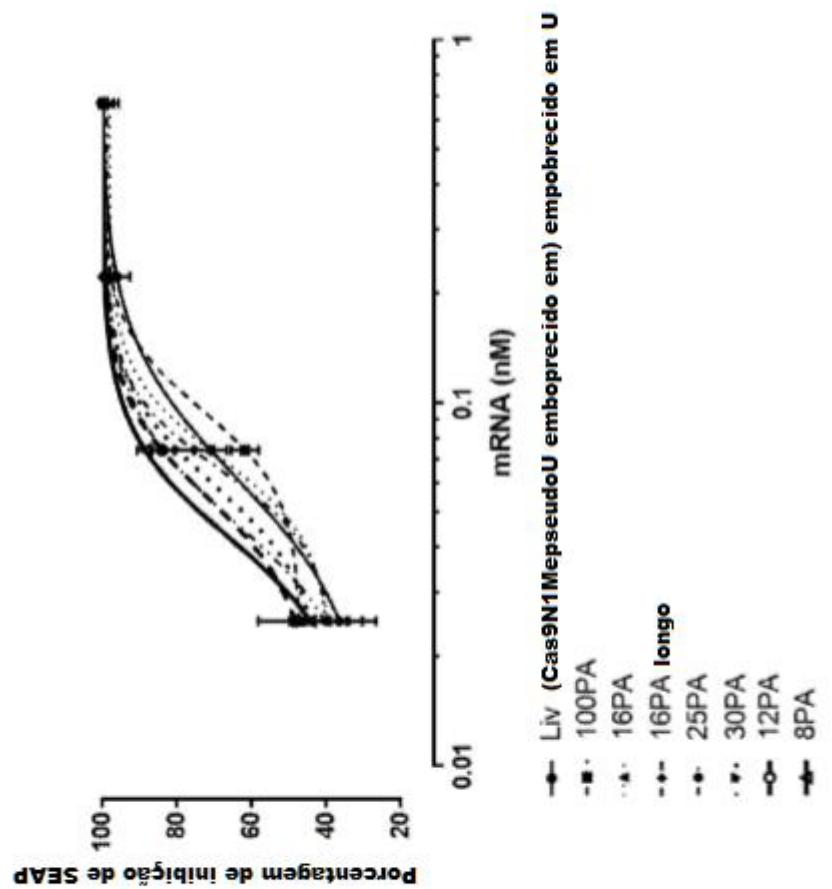


Fig. 7

RESUMO

"ÁCIDOS NUCLEICOS ESTABILIZADOS CODIFICANDO ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAGEIRO (mRNA)".

Esta divulgação refere-se ao campo de caudas poliadeniladas (poli-A). Em algumas modalidades, um DNA codifica uma cauda poli-A localizada 3' para nucleotídeos codificando uma proteína de interesse, em que a cauda poli-A compreende um ou mais nucleotídeos de não adenina.

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 EMENDAS - 04-2020 -
- Data de Geração do Código: 08/04/2020
- Hora de Geração do Código: 14:34:11
- Código de Controle:
 - Campo 1: 8C054A1D86571097
 - Campo 2: 6BB9EEA62668B362