



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

(21) BR 112020005287-6 A2



(22) Data do Depósito: 28/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 24/09/2020

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA EDIÇÃO DE GENE TTR E TRATAR AMILOIDOSE ATTR

(51) Int. Cl.: C12N 15/113; C12N 15/10; A61K 48/00; A61P 25/28.

(30) Prioridade Unionista: 15/05/2018 US 62/671,902; 29/09/2017 US 62/566,236.

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

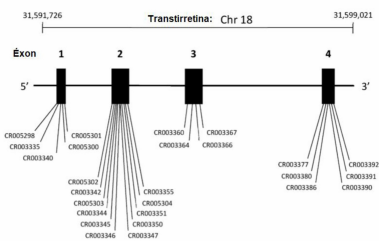
(72) Inventor(es): ARTI MAHENDRA PRAKASH KANJOLIA; SHOBU ODATE; JESSICA LYNN SEITZER; REYNALD MICHAEL LESCARBEAU; WALTER STRAPPS.

(86) Pedido PCT: PCT US2018053382 de 28/09/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/067872 de 04/04/2019

(85) Data da Fase Nacional: 17/03/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a composições e métodos para edição, por exemplo, introdução de quebras de fita dupla, dentro do gene TTR. São fornecidas composições e métodos para tratar sujeitos tendo amiloidose associada à transtirretina (ATTR).



**"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA EDIÇÃO DE GENE TTR E TRATAMENTO DE AMILOIDOSE ATTR".**

[0001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade do Pedido Provisório dos Estados Unidos 62/556.236, que foi depositado em 29 de setembro de 2017, e ao Pedido Provisório dos Estados Unidos 62/671.902, que foi depositado em 15 de maio de 2018 e que são incorporados por referência na sua totalidade.

[0002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequência, que foi submetida eletronicamente no formato ASCII e está incorporada por meio deste a título de referência em sua totalidade. A referida cópia ASCII, criada em 27 de setembro de 2018, é denominada 2018-09-27\_01155-0013-PCT\_ST25.txt e tem 417.471 bytes de tamanho.

[0003] A Transtirretina (TTR) é uma proteína produzida pelo gene *TTR* que normalmente funciona para transportar retinol e tiroxina por todo o corpo. A TTR é predominantemente sintetizada no fígado, com pequenas frações sendo produzidas no plexo coroide e na retina. A TTR normalmente circula como uma proteína tetramérica solúvel no sangue.

[0004] Variantes patogênicas da TTR, que podem prejudicar a estabilidade do tetrâmero, podem ser codificadas por alelos mutantes do gene *TTR*. A TTR mutante pode resultar em TTR dobrada incorretamente, o que pode gerar amiloides (isto é, agregados de proteína TTR dobrada incorretamente). Em alguns casos, variantes patogênicas da TTR podem levar à amiloidose ou doença resultante do acúmulo de amiloides. Por exemplo, monômeros de TTR dobrada incorretamente podem polimerizar em fibrilas amiloides nos tecidos, como nervos periféricos, coração e trato gastrointestinal. As placas amiloides também podem compreender TTR de tipo selvagem que se depositou em TTR dobrada incorretamente.

[0005] O dobramento incorreto e a deposição de TTR do tipo selvagem também foram observados em homens com 60 anos ou mais

e estão associados a problemas de ritmo cardíaco, insuficiência cardíaca e túnel carpal.

[0006] A amiloidose caracterizada pela deposição de TTR pode ser referida como "ATTR", "amiloidose relacionada à TTR", "amiloidose TTR" ou "amiloidose ATTR" ou "amiloidose ATTR", "amiloidose familiar ATTR" (quando associada a uma mutação genética em uma família), ou "ATTRwt" ou "ATTR do tipo selvagem" (quando surgir de dobramento incorreto e deposição de TTR do tipo selvagem).

[0007] A ATTR pode apresentar um amplo espectro de sintomas e pacientes com diferentes classes de ATTR podem ter características e prognósticos diferentes. Algumas classes de ATTR incluem polineuropatia amiloide familiar (FAP), cardiomiopatia amiloide familiar (FAC) e amiloidose TTR de tipo selvagem (amiloidose wt-TTR). A FAP geralmente se apresenta com neuropatia sensorial-motora., enquanto a FAC e a amiloidose wt-TTR geralmente se apresentam com insuficiência cardíaca congestiva. A FAP e a FAC estão geralmente associadas a uma mutação genética no gene *TTR*, e mais de 100 mutações diferentes no gene *TTR* foram associadas à ATTR. Em contraste, a amiloidose wt-TTR está associada ao envelhecimento e não a uma mutação genética em *TTR*. Estima-se que aproximadamente 50.000 pacientes em todo o mundo possam ser afetados pela FAP e FAC.

[0008] Enquanto mais de 100 mutações em *TTR* estão associadas à ATTR, certas mutações foram mais intimamente associadas à neuropatia e/ou cardiomiopatia. Por exemplo, mutações em T60 de TTR estão associadas a cardiomiopatia e neuropatia; mutações em V30 estão mais associadas à neuropatia; e mutações em V122 estão mais associadas à cardiomiopatia.

[0009] Uma variedade de abordagens de tratamento foi estudada para o tratamento de ATTR, mas não existem medicamentos aprovados

que parem a progressão da doença e melhorem a qualidade de vida. Embora o transplante de fígado tenha sido estudado para o tratamento de ATTR, seu uso está diminuindo, pois envolve risco significativo e a progressão da doença às vezes continua após o transplante. Os estabilizadores de moléculas pequenas, como diflunisal e tafamidis, parecem retardar a progressão de ATTR, mas esses agentes não interrompem a progressão da doença.

[0010] Atualmente, estão sendo investigadas abordagens usando knockdown de RNA interferente pequeno (siRNA), knockout antissentido ou um anticorpo monoclonal direcionado para fibrilas amiloides para destruição, mas enquanto os resultados da supressão de curto prazo da expressão de TTR mostram dados preliminares encorajadores, existe uma necessidade de tratamentos que pode produzir supressão duradoura de TTR.

[0011] Por conseguinte, são fornecidas as seguintes modalidades. Em algumas modalidades, a presente invenção fornece composições e métodos usando um RNA guia com um agente de ligação a DNA guiado por RNA, como o sistema CRISPR/Cas, para reduzir substancialmente ou eliminar a expressão do gene *TTR*, desse modo reduzindo ou eliminando substancialmente a produção de proteína TTR associada à ATTR. A redução ou eliminação substancial da produção de proteína TTR associada à ATTR através da alteração do gene *TTR* pode ser uma redução ou eliminação a longo prazo.

### **SUMÁRIO**

[0012] A Modalidade 1 é um método para induzir uma quebra de fita dupla (DSB) dentro do gene TTR, compreendendo distribuir uma composição a uma célula, em que a composição compreende

- a. um RNA guia compreendendo uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;
- b. um RNA guia compreendendo pelo menos 17, 18, 19 ou 20

nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou

c. um RNA guia compreendendo uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs : 5-82.

[0013] A Modalidade 2 é um método para modificar o gene TTR compreendendo distribuir uma composição a uma célula, em que a composição compreende (i) um agente de ligação a DNA guiado por RNA ou um ácido nucleico que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA e (ii) um RNA guia compreendendo:

a. uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;

b. pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou

c. uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs : 5-82,

[0014] A Modalidade 3 é um método para tratar a amiloidose associada a TTR (ATTR), compreendendo administrar uma composição a um sujeito em necessidade do mesmo, em que a composição compreende (i) um agente de ligação a DNA guiado por RNA ou um ácido nucleico que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA e (ii) um RNA guia compreendendo:

a. uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;

b. pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou

c. uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs : 5-82,

tratando assim ATTR.

[0015] A Modalidade 4 é um método para reduzir a concentração

sérica de TTR, compreendendo administrar uma composição a um sujeito em necessidade do mesmo, em que a composição compreende (i) um agente de ligação a DNA guiado por RNA ou um ácido nucleico que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA e (ii) um RNA guia compreendendo:

- a. uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;
- b. pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou
- c. uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs : 5-82,

reduzindo assim a concentração sérica de TTR.

[0016] A Modalidade 5 é um método para reduzir ou impedir o acúmulo de amiloides ou fibrilas amiloides compreendendo TTR em um sujeito, compreendendo administrar uma composição a um sujeito em necessidade do mesmo, em que a composição compreende (i) um agente de ligação a DNA guiado por RNA ou um ácido nucleico que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA e (ii) um RNA guia compreendendo:

- a. uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;
- b. pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou
- c. uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs : 5-82,

reduzindo assim a acumulação de amiloides ou fibrilas amiloides.

[0017] A Modalidade 6 é uma composição compreendendo um RNA guia compreendendo:

- a. uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;
- b. pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma

sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou

c. uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs : 5-82,

[0018] A Modalidade 7 é uma composição compreendendo vetor que codifica um RNA guia, em que o RNA guia compreende:

a. uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;

b. pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou

c. uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs : 5-82,

[0019] A Modalidade 8 é a composição da modalidade 6 ou 7 para uso na indução de uma quebra de fita dupla (DSB) dentro do gene TTR em uma célula ou sujeito.

[0020] A Modalidade 9 é a composição da modalidade 6 ou 7, para uso na modificação do gene TTR em uma célula ou sujeito.

[0021] A Modalidade 10 é a composição da modalidade 6 ou 7, para uso no tratamento de amiloidose associada a TTR (ATTR) em um sujeito.

[0022] A Modalidade 11 é a composição da modalidade 6 ou 7, para uso na redução da concentração sérica de TTR em um sujeito.

[0023] A Modalidade 12 é a composição da modalidade 6 ou 7, para uso na redução ou prevenção do acúmulo de amiloides ou fibrilas amiloides em um sujeito.

[0024] A Modalidade 13 é o método de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 8 a 12 a composição reduz os níveis séricos de TTR.

[0025] A Modalidade 14 é o método ou a composição para uso da modalidade 13, em que os níveis séricos de TTR são reduzidos em pelo

menos 50% em comparação com os níveis séricos de TTR antes da administração da composição.

[0026] A Modalidade 15 é o método ou a composição para uso da modalidade 13, em que os níveis séricos de TTR são reduzidos em 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-95%, 95-98%, 98- 99% ou 99-100% em comparação com os níveis séricos de TTR antes da administração da composição.

[0027] A Modalidade 16 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 15, em que a composição resulta na edição do gene TTR.

[0028] A Modalidade 17 é o método ou a composição para uso da modalidade 16, em que a edição é calculada como uma porcentagem da população que é editada (porcentagem de edição).

[0029] A Modalidade 18 é o método ou a composição para uso da modalidade 17, em que a porcentagem de edição está entre 30 e 99% da população.

[0030] A Modalidade 19 é o método ou a composição para uso da modalidade 17, em que a porcentagem de edição está entre 30 e 35%, 35 e 40%, 40 e 45%, 45 e 50%, 50 e 55%, 55 e 60%, 60 e 65%, 65 e 70%, 70 e 75%, 75 e 80%, 80 e 85%, 85 e 90%, 90 e 95% ou 95 e 99% da população.

[0031] A Modalidade 20 é o método de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 8 a 19, em que a composição reduz a deposição de amiloide em pelo menos um tecido.

[0032] A Modalidade 21 é o método ou a composição para uso da modalidade 20, em que pelo menos um tecido compreende um ou mais de estômago, cólon, nervo ciático ou gânglio da raiz dorsal.

[0033] A Modalidade 22 é o método ou a composição para uso da modalidade 20 ou 21, em que a deposição de amiloide é medida 8

semanas após a administração da composição.

[0034] A Modalidade 23 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 20 a 22, em que a deposição de amiloide é comparada a um controle negativo ou a um nível medido antes da administração da composição.

[0035] A Modalidade 24 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 20 a 23, em que a deposição de amiloide é medida em uma amostra de biópsia e/ou por imunocoloração.

[0036] A Modalidade 25 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 20 a 24, em que a deposição de amiloide é reduzida entre 30 e 35%, 35 e 40%, 40 e 45%, 45 e 50%, 50 e 55%, 55 e 60%, 60 e 65%, 65 e 70%, 70 e 75%, 75 e 80%, 80 e 85%, 85 e 90%, 90 e 95% ou 95 e 99% da deposição de amiloide vista de forma negativa ao controle.

[0037] A Modalidade 26 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 20 a 25, em que a deposição de amiloide é reduzida entre 30 e 35%, 35 e 40%, 40 e 45%, 45 e 50%, 50 e 55%, 55 e 60 %, 60 e 65%, 65 e 70%, 70 e 75%, 75 e 80%, 80 e 85%, 85 e 90%, 90 e 95% ou 95 e 99% da deposição de amiloide observada antes da administração da composição.

[0038] A Modalidade 27 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 26, em que a composição é administrada ou distribuída pelo menos duas vezes.

[0039] A Modalidade 28 é o método ou a composição para uso da modalidade 27, em que a composição é administrada ou distribuída pelo menos três vezes.

[0040] A Modalidade 29 é o método ou a composição para uso da modalidade 27, em que a composição é administrada ou distribuída pelo menos quatro vezes.

[0041] A Modalidade 30 é o método ou a composição para uso da

modalidade 27, em que a composição é administrada ou distribuída até cinco, seis, sete, oito, nove ou dez vezes.

[0042] A Modalidade 31 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 27 a 30, em que a administração ou a distribuição ocorre em um intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 dias.

[0043] A Modalidade 32 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 27 a 30, em que a administração ou a distribuição ocorre em um intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 semanas.

[0044] A Modalidade 33 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 27 a 30, em que a administração ou a distribuição ocorre em um intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 meses.

[0045] A Modalidade 34 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades anteriores, em que a sequência guia é selecionada de SEQ ID NOs: 5-82.

[0046] A Modalidade 35 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades anteriores, em que o RNA guia é pelo menos parcialmente complementar a uma sequência alvo presente no gene TTR humano.

[0047] A Modalidade 36 é o método ou a composição da modalidade 35, em que a sequência alvo está no éxon 1, 2, 3 ou 4 do gene TTR humano.

[0048] A Modalidade 37 é o método ou composição da modalidade 35, em que a sequência alvo está no éxon 1 do gene TTR humano.

[0049] A Modalidade 38 é o método ou a composição da modalidade 35, em que a sequência alvo está no éxon 2 do gene TTR humano.

[0050] A Modalidade 39 é o método ou composição da modalidade

35, em que a sequência alvo está no éxon 3 do gene TTR humano.

[0051] A Modalidade 40 é o método ou composição da modalidade 35, em que a sequência alvo está no éxon 4 do gene TTR humano.

[0052] A Modalidade 41 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 1 a 40, em que a sequência guia é complementar a uma sequência alvo na fita positiva de TTR.

[0053] A Modalidade 42 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 1 a 40, em que a sequência guia é complementar a uma sequência alvo na fita negativa de TTR.

[0054] A Modalidade 43 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 1 a 40, em que a primeira sequência guia é complementar a uma primeira sequência alvo na fita positiva do gene TTR e em que a composição compreende ainda uma segunda sequência guia que é complementar a uma segunda sequência alvo na fita negativa do gene TTR.

[0055] A Modalidade 44 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades anteriores, em que o RNA guia compreende um crRNA que compreende a sequência guia e compreende ainda uma sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 126, em que os nucleotídeos da SEQ ID NO: 126 seguem a sequência guia na sua extremidade 3'.

[0056] A Modalidade 45 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades anteriores, em que o RNA guia é um guia duplo (dgRNA).

[0057] A Modalidade 46 é o método ou a composição da modalidade 45, em que o RNA guia duplo compreende um crRNA compreendendo uma sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 126, em que os nucleotídeos da SEQ ID NO: 126 seguem a sequência guia na sua extremidade 3' e um trRNA.

[0058] A Modalidade 47 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 1 a 43, em que o RNA guia é um guia único

(sgRNA).

[0059] A Modalidade 48 é o método ou composição da modalidade 47, em que o sgRNA compreende uma sequência guia que tem o padrão da SEQ ID NO: 3.

[0060] A Modalidade 49 é o método ou a composição da modalidade 47, em que o sgRNA compreende a sequência da SEQ ID NO: 3.

[0061] A Modalidade 50 é o método ou a composição da modalidade 48 ou 49, em que cada N na SEQ ID NO: 3 é qualquer nucleotídeo natural ou não natural, em que os N formam a sequência guia e a sequência guia direciona Cas9 ao gene TTR.

[0062] A Modalidade 51 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 47 a 50, em que o sgRNA compreende qualquer uma das sequências guia das SEQ ID NOs: 5-82 e os nucleotídeos da SEQ ID NO: 126.

[0063] A Modalidade 52 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 47 a 51, em que o sgRNA compreende uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID Nos: 87-124.

[0064] A Modalidade 53 é o método ou a composição da modalidade 47, em que o sgRNA compreende uma sequência selecionada de SEQ ID Nos: 87-124.

[0065] A Modalidade 54 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades anteriores, em que o RNA guia compreende pelo menos uma modificação.

[0066] A Modalidade 55 é o método ou a composição da modalidade 54, em que a pelo menos uma modificação inclui um nucleotídeo modificado em 2'-O-metil (2'-O-Me).

[0067] A Modalidade 56 é o método ou a composição da

modalidade 54 ou 55, em que a pelo menos uma modificação inclui uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos.

[0068] A Modalidade 57 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 54 a 56, em que a pelo menos uma modificação inclui um nucleotídeo modificado em 2'-fluoro (2'-F).

[0069] A Modalidade 58 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 54 a 57, em que a pelo menos uma modificação inclui uma modificação em um ou mais dos cinco primeiros nucleotídeos na extremidade 5'.

[0070] A Modalidade 59 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 54 a 58, em que a pelo menos uma modificação inclui uma modificação em um ou mais dos últimos cinco nucleotídeos na extremidade 3'.

[0071] A Modalidade 60 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 54 a 59, em que a pelo menos uma modificação inclui ligações PS entre os quatro primeiros nucleotídeos.

[0072] A Modalidade 61 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 54 a 60, em que a pelo menos uma modificação inclui ligações PS entre os últimos quatro nucleotídeos.

[0073] A Modalidade 62 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 54 a 61, em que a pelo menos uma modificação inclui nucleotídeos modificados em 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5'.

[0074] A Modalidade 63 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 54 a 62, em que a pelo menos uma modificação inclui nucleotídeos modificados em 2'-O-Me nos três últimos nucleotídeos na extremidade 3'.

[0075] A Modalidade 64 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 54 a 63, em que o RNA guia compreende os nucleotídeos modificados da SEQ ID NO: 3.

[0076] A Modalidade 65 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 1 a 64, em que a composição compreende ainda um excipiente farmacologicamente aceitável.

[0077] A Modalidade 66 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 1 a 65, em que o RNA guia está associado a uma nanopartícula lipídica (LNP).

[0078] A Modalidade 67 é o método ou composição da modalidade 66, em que o LNP compreende um lipídeo CCD.

[0079] A Modalidade 68 é o método ou a composição da modalidade 67, em que o lipídeo CCD é o lipídeo a ou o lipídeo B.

[0080] A Modalidade 69 é o método ou a composição da modalidade 66 a 68, em que o LNP compreende um lipídeo neutro.

[0081] A Modalidade 70 é o método ou composição da modalidade 69, em que o lipídeo neutro é DSPC

[0082] A Modalidade 71 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 66 a 70, em que o LNP compreende um lipídeo auxiliar.

[0083] A Modalidade 72 é o método ou a composição da modalidade 71, em que o lipídeo auxiliar é o colesterol.

[0084] A Modalidade 73 é o método ou composição de qualquer uma das modalidades 66 a 72, em que o LNP compreende um lipídeo furtivo.

[0085] A Modalidade 74 é o método ou composição da modalidade 73, em que o lipídeo furtivo é PEG2k-DMG.

[0086] A Modalidade 75 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades anteriores, em que a composição compreende ainda um agente de ligação a DNA guiado por RNA.

[0087] A Modalidade 76 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades anteriores, em que a composição compreende ainda um mRNA que codifica um agente de ligação a DNA guiado por

RNA.

[0088] A Modalidade 77 é o método ou a composição da modalidade 75 ou 76, em que o agente de ligação a DNA guiado por RNA é uma Cas clivase.

[0089] A Modalidade 78 é o método ou composição da modalidade 77, em que o agente de ligação ao DNA guiado por RNA é Cas9.

[0090] A Modalidade 79 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 75 a 78, em que o agente de ligação a DNA guiado por RNA é modificado.

[0091] A Modalidade 80 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 75 a 79, em que o agente de ligação a DNA guiado por RNA é uma nickase.

[0092] A Modalidade 81 é o método ou composição da modalidade 79 ou 80, em que o agente de ligação ao DNA guiado por RNA modificado compreende um sinal de localização nuclear (NLS).

[0093] A Modalidade 82 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 75 a 81, em que o agente de ligação a DNA guiado por RNA é um Cas de um sistema CRISPR/Cas Tipo II.

[0094] A Modalidade 83 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades anteriores, em que a composição é uma formulação farmacêutica e compreende ainda um transportador farmacêuticamente aceitável.

[0095] A Modalidade 84 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 83, em que a composição reduz ou previne amiloides ou fibrilas amiloides compreendendo TTR.

[0096] A Modalidade 85 é o método ou a composição para uso da modalidade 84, em que os amiloides ou fibrilas amiloides estão nos nervos, coração ou via gastrointestinal.

[0097] A Modalidade 86 é o método ou a composição para uso de qualquer uma modalidades 1 a 5 ou 8 a 83, em que a união de

extremidade não homóloga (NHEJ) leva a uma mutação durante o reparo de um DSB no gene TTR.

[0098] A Modalidade 87 é o método ou a composição para uso da modalidade 86, em que a NHEJ leva a uma exclusão ou inserção de um nucleotídeo(s) durante o reparo de um DSB no gene TTR.

[0099] A Modalidade 88 é o método ou a composição para uso da modalidade 87, em que a exclusão ou inserção de um nucleotídeo(s) induz uma mudança de quadro ou mutação sem sentido no gene TTR.

[00100] A Modalidade 89 é o método ou a composição para uso da modalidade 87, em que uma mudança de quadro ou mutação sem sentido é induzida no gene TTR de pelo menos 50% das células hepáticas.

[00101] A Modalidade 90 é o método ou a composição para uso da modalidade 89, em que uma mudança de quadro ou mutação sem sentido é induzida no gene TTR de 50%-60%, 60%-70%, 70% ou 80%, 80%-90%, 90-95%, 95%-99% ou 99%-100% das células do fígado.

[00102] A Modalidade 91 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 87 a 90, em que uma exclusão ou inserção de um nucleotídeo(s) ocorre no gene TTR pelo menos 50 vezes ou mais do que em sítios fora do alvo.

[00103] A Modalidade 92 é o método ou a composição para uso da modalidade 91, em que a exclusão ou inserção de um nucleotídeo ocorre no gene TTR de 50 a 150 vezes, 150 a 500 vezes, 500 a 1500 vezes, 1500 a 5000 vezes, 5000 a 15000 vezes, 15000 a 30000 vezes ou 30000 a 60000 vezes mais do que em sítios fora do alvo.

[00104] A Modalidade 93 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 87 a 92, em que a exclusão ou inserção de um nucleotídeo ocorre em menor ou igual a 3, 2, 1 ou 0 sítio(s) fora do alvo em hepatócitos primários humanos, opcionalmente em que o(s) sítio(s) fora do alvo(s) não ocorre(m) em uma região de codificação de

proteínas no genoma dos hepatócitos primários humanos.

[00105] A Modalidade 94 é o método ou a composição para uso da modalidade 93, em que a exclusão ou inserção de um nucleotídeo(s) ocorre em vários sítios fora do alvo nos hepatócitos primários humanos que é menor que o número de sítios fora do alvo nos quais uma exclusão ou a inserção de um nucleotídeo(s) ocorre em células superexpressoras de Cas9, opcionalmente em que o(s) sítio(s) alvo(s) não ocorre(m) em uma região de codificação de proteínas no genoma dos hepatócitos primários humanos.

[00106] A Modalidade 95 é o método ou a composição para uso da modalidade 94, em que as células superexpressoras de Cas9 são células HEK293 que expressam estavelmente Cas9.

[00107] A Modalidade 96 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 93 a 95, em que o número de sítios fora do alvo nos hepatócitos primários humanos é determinado pela análise do DNA genômico de hepatócitos primários humanos transfectados in vitro com mRNA de Cas9 e o RNA guia, opcionalmente em que o(s) sítio(s) alvo(s) não ocorre(m) em uma região de codificação de proteínas no genoma dos hepatócitos primários humanos.

[00108] A Modalidade 97 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 93 a 95, em que o número de sítios fora do alvo nos hepatócitos primários humanos é determinado por um ensaio de inserção de oligonucleotídeo que compreende a análise de DNA genômico de hepatócitos primários humanos transfectados in vitro com mRNA de Cas9, RNA guia, e um oligonucleotídeo doador, opcionalmente em que o(s) sítio(s) alvo(s) não ocorre(m) em uma região de codificação de proteínas no genoma dos hepatócitos primários humanos.

[00109] A Modalidade 98 é o método ou a composição de qualquer uma das modalidades 1-43 ou 47-97, em que a sequência do RNA guia

é:

- a) SEQ ID NO: 92 ou 104;
- b) SEQ ID NO: 87, 89, 96 ou 113;
- c) SEQ ID NO: 100, 102, 106, 111 ou 112; ou
- d) SEQ ID NO: 88, 90, 91, 93, 94, 95, 97, 101, 103, 108 ou 109,

opcionalmente, em que o RNA guia não produz indels em sítios fora do alvo que ocorrem em uma região de codificação de proteínas no genoma de hepatócitos primários humanos.

[00110] A Modalidade 99 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 98, em que a administração da composição reduz os níveis de TTR no sujeito.

[00111] A Modalidade 100 é o método ou a composição para uso da modalidade 99, em que os níveis de TTR são reduzidos em pelo menos 50%.

[00112] A Modalidade 101 é o método ou a composição para uso da modalidade 100, em que os níveis de TTR são reduzidos em 50%-60%, 60%-70%, 70% ou 80%, 80%-90%, 90-95%, 95%- 99% ou 99%-100%.

[00113] A Modalidade 102 é o método ou a composição para uso da modalidade 100 ou 101, em que os níveis de TTR são medidos no soro, plasma, sangue, fluido espinhal cerebral ou escarro.

[00114] A Modalidade 103 é o método ou a composição para uso da modalidade 100 ou 101, em que os níveis de TTR são medidos no fígado, plexo coroide e/ou retina.

[00115] A Modalidade 104 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 99 a 103, em que os níveis de TTR são medidos por meio de ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA).

[00116] A Modalidade 105 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 104, em que o sujeito tem

ATTR.

[00117] A Modalidade 106 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 105, em que o sujeito é humano.

[00118] A Modalidade 107 é o método ou composição para uso da modalidade 105 ou 106, em que o sujeito tem ATTRwt.

[00119] A Modalidade 108 é o método ou composição para uso da modalidade 105 ou 106, em que o sujeito tem ATTR hereditária.

[00120] A Modalidade 109 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5, 8 a 106 ou 108, em que o sujeito tem uma histórico familiar de ATTR.

[00121] A Modalidade 110 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5, 8 a 106 ou 108 a 109, em que o sujeito tem polineuropatia amiloide familiar.

[00122] A Modalidade 111 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 110, em que o sujeito tem apenas ou predominantemente sintomas nervosos de ATTR.

[00123] A Modalidade 112 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 110, em que o sujeito tem cardiomiopatia amiloide familiar.

[00124] A Modalidade 113 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5, 8 a 109 ou 112, em que o sujeito tem apenas ou predominantemente sintomas cardíacos de ATTR.

[00125] A Modalidade 114 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 113, em que o sujeito expressa TTR com uma mutação V30.

[00126] A Modalidade 115 é o método ou a composição para uso da modalidade 114, em que a mutação V30 é V30A, V30G, V30L ou V30M.

[00127] A Modalidade 116 é o método ou a composição para uso da modalidade 1 a 5 ou 8 a 113, em que o sujeito expressa TTR com uma

mutação T60.

[00128] A Modalidade 117 é o método ou a composição para uso da modalidade 116, em que a mutação T60 é T60A.

[00129] A Modalidade 118 é o método ou a composição para uso da modalidade 1 a 5 ou 8 a 113, em que o sujeito expressa TTR com uma mutação V122.

[00130] A Modalidade 119 é o método ou a composição para uso da modalidade 188, em que a mutação V122 é V122A, V122I ou V122(-).

[00131] A Modalidade 120 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 119, em que o sujeito expressa TTR de tipo selvagem.

[00132] A Modalidade 121 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5, 8 a 107 ou 120, em que o sujeito não expressa TTR com uma mutação V30, T60 ou V122.

[00133] A Modalidade 122 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5, 8 a 107 ou 120 a 121, em que o sujeito não expressa TTR com uma mutação patológica.

[00134] A Modalidade 123 é o método ou a composição para uso da modalidade 121, em que o sujeito é homocigoto para TTR do tipo selvagem.

[00135] A Modalidade 124 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 123, em que após a administração o sujeito apresenta uma melhora, estabilização ou lentidão da alteração nos sintomas da neuropatia sensorial-motora..

[00136] A Modalidade 125 é o método ou a composição para uso da modalidade 124, em que a melhora, estabilização ou lentidão da mudança na neuropatia sensorial é medida usando eletromiograma, testes de condução nervosa ou resultados relatados pelo paciente.

[00137] A Modalidade 126 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 125, em que o sujeito tem

uma melhora, estabilização ou lentidão da mudança nos sintomas de insuficiência cardíaca congestiva.

[00138] A Modalidade 127 é o método ou a composição para uso da modalidade 126, em que a melhora, estabilização ou lentidão da mudança na insuficiência cardíaca congestiva é medida usando testes de biomarcadores cardíacos, testes de função pulmonar, radiografias de tórax ou eletrocardiografia.

[00139] A Modalidade 128 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 127, em que a composição ou formulação farmacêutica é administrada via um vetor viral.

[00140] A Modalidade 129 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 127, em que a composição ou formulação farmacêutica é administrada via nanopartículas lipídicas.

[00141] A Modalidade 130 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 5 ou 8 a 129, em que o sujeito é testado para mutações específicas no gene TTR antes de administrar a composição ou formulação.

[00142] A Modalidade 131 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 5.

[00143] A Modalidade 132 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 6.

[00144] A Modalidade 133 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 7.

[00145] A Modalidade 134 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 8.

[00146] A Modalidade 135 é o método ou a composição para uso de

qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 9.

[00147] A Modalidade 136 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 10.

[00148] A Modalidade 137 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 11.

[00149] A Modalidade 138 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 12.

[00150] A Modalidade 139 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 13.

[00151] A Modalidade 140 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 14.

[00152] A Modalidade 141 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 15.

[00153] A Modalidade 142 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 16.

[00154] A Modalidade 143 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 17.

[00155] A Modalidade 144 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 18.

[00156] A Modalidade 145 é o método ou a composição para uso de

qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 19.

[00157] A Modalidade 146 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 20.

[00158] A Modalidade 147 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 21.

[00159] A Modalidade 148 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 22.

[00160] A Modalidade 149 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 23.

[00161] A Modalidade 150 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 24.

[00162] A Modalidade 151 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 25.

[00163] A Modalidade 152 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 26.

[00164] A Modalidade 153 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 27.

[00165] A Modalidade 154 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 28.

[00166] A Modalidade 155 é o método ou a composição para uso de

qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 29.

[00167] A Modalidade 156 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 30.

[00168] A Modalidade 157 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 31.

[00169] A Modalidade 158 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 32.

[00170] A Modalidade 159 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 33.

[00171] A Modalidade 160 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 34.

[00172] A Modalidade 161 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 35.

[00173] A Modalidade 162 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 36.

[00174] A Modalidade 163 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 37.

[00175] A Modalidade 164 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 38.

[00176] A Modalidade 165 é o método ou a composição para uso de

qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 39.

[00177] A Modalidade 166 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 40.

[00178] A Modalidade 167 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 41.

[00179] A Modalidade 168 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 42.

[00180] A Modalidade 169 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 43.

[00181] A Modalidade 170 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 44.

[00182] A Modalidade 171 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 45.

[00183] A Modalidade 172 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 46.

[00184] A Modalidade 173 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 47.

[00185] A Modalidade 174 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 48.

[00186] A Modalidade 175 é o método ou a composição para uso de

qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 49.

[00187] A Modalidade 176 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 50.

[00188] A Modalidade 177 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 51.

[00189] A Modalidade 178 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 52.

[00190] A Modalidade 179 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 53.

[00191] A Modalidade 180 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 54.

[00192] A Modalidade 181 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 55.

[00193] A Modalidade 182 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 56.

[00194] A Modalidade 183 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 57.

[00195] A Modalidade 184 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 58.

[00196] A Modalidade 185 é o método ou a composição para uso de

qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 59.

[00197] A Modalidade 186 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 60.

[00198] A Modalidade 187 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 61.

[00199] A Modalidade 188 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 62.

[00200] A Modalidade 189 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 63.

[00201] A Modalidade 190 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 64.

[00202] A Modalidade 191 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 65.

[00203] A Modalidade 192 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 66.

[00204] A Modalidade 193 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 67.

[00205] A Modalidade 194 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 68.

[00206] A Modalidade 195 é o método ou a composição para uso de

qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 69.

[00207] A Modalidade 196 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 70.

[00208] A Modalidade 197 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 71.

[00209] A Modalidade 198 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 72.

[00210] A Modalidade 199 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 73.

[00211] A Modalidade 200 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 74.

[00212] A Modalidade 201 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 75.

[00213] A Modalidade 202 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 76.

[00214] A Modalidade 203 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 77.

[00215] A Modalidade 204 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 78.

[00216] A Modalidade 205 é o método ou a composição para uso de

qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 79.

[00217] A Modalidade 206 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 80.

[00218] A Modalidade 207 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 81.

[00219] A Modalidade 208 é o método ou a composição para uso de qualquer uma das modalidades 1 a 130, em que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 82.

[00220] A Modalidade 209 é um uso de uma composição ou formulação de qualquer uma das modalidades 6 a 208 para preparar um medicamento para tratamento de um sujeito humano que tem ATTR.

[00221] Também divulgada é a utilização de uma composição ou formulação de qualquer uma das modalidades anteriores para a preparação de um medicamento para o tratamento de um sujeito humano com ATTR. Também são divulgadas quaisquer das composições ou formulações anteriores para uso no tratamento de ATTR ou para modificação (por exemplo, formação de um indel ou formação de uma mutação de quadro ou mutação sem sentido) de um gene *TTR*.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[00222] A FIG. 1 mostra um esquema do cromossomo 18 com as regiões do gene *TTR* que são direcionadas pelas sequências guia fornecidas na Tabela 1.

[00223] A FIG. 2 mostra a análise fora do alvo nas células HEK293\_Cas9 de certos RNAs de guia duplo direcionados à *TTR*. O sítio no alvo é designado por um quadrado preenchido para cada RNA guia duplo testado, enquanto os círculos fechados representam um

potencial sítio fora do alvo.

[00224] A FIG. 3 mostra a análise fora do alvo nas células HEK\_Cas9 de certos RNAs guia único direcionados à TTR. O sítio no alvo é designado por um quadrado preenchido para cada RNA guia duplo testado, enquanto os círculos abertos representam um potencial sítio fora do alvo.

[00225] A FIG. 4 mostra curvas de resposta à dose de sgRNAs específicos de TTR humana formulados por nanopartículas lipídicas em hepatócitos primários humanos.

[00226] A FIG. 5 mostra curvas de resposta à dose de sgRNAs específicos de TTR humana formulados por nanopartículas lipídicas em hepatócitos primários cyno.

[00227] A FIG. 6 mostra curvas de resposta à dose de sgRNAs específicos de TTR cyno formulados por nanopartículas lipídicas em hepatócitos primários cyno.

[00228] A FIG. 7 mostra a porcentagem de edição (% de edição) de TTR e redução da TTR segregada após a administração do guia nas sequências de células HUH7 fornecidas no eixo x. Os valores são normalizados para a quantidade de proteína alfa-1-antitripsina (AAT).

[00229] A FIG. 8 mostra a análise de western blot da TTR intracelular após a administração de guias direcionados (listados na Tabela 1) em células HUH7.

[00230] A FIG. 9 mostra a porcentagem de edição hepática de TTR observada após a administração de formulações de LNP a camundongos com TTR humanizada (G481-G499) ou murina (G282). Nota: os três primeiros 0 em cada ID do guia são omitidos na figura, por exemplo, "G481" é "G000481" nas Tabelas 2 e 3.

[00231] As FIGS. 10A-B mostram os níveis séricos de TTR observados após os regimes de dosagem indicados no eixo horizontal como µg/ml (FIG. 10A) ou porcentagem de controle de TSS (FIG. 10B).

MPK = mg/kg por toda parte.

[00232] As FIGS. 11A-B mostram níveis séricos de TTR observados após os esquemas de dosagem indicados no eixo horizontal para dosagens de 1 mg/kg (FIG. 11A) ou 0,5 mg/kg (FIG. 11B). Os dados para uma dose única de 2 mg/kg estão incluídos na coluna da direita em ambos os painéis.

[00233] As FIGS. 12A-B mostram a porcentagem de edição do fígado observada após os regimes de dosagem indicados no eixo horizontal para dosagens de 1 mg/kg (FIG. 12A) ou 0,5 mg/kg (FIG. 12B). A FIG. 12C mostra a porcentagem de edição hepática observada após uma dose única de 0,5, 1 ou 2 mg/kg.

[00234] A FIG. 13 mostra a porcentagem de edição do fígado observada após a administração de formulações de LNP a camundongos humanizados em relação ao gene TTR. Nota: os três primeiros 0 em cada ID do guia são omitidos na figura, por exemplo, "G481" é "G000481" nas Tabelas 2 e 3.

[00235] As FIGS. 14A-B mostram que existe correlação entre a edição do fígado (FIG. 14A) e os níveis séricos de TTR humana (FIG. 14B) após a administração de formulações de LNP a camundongos humanizados em relação ao gene TTR. Nota: os três primeiros 0 em cada ID do guia são omitidos na figura, por exemplo, "G481" é "G000481" nas Tabelas 2 e 3.

[00236] As FIGS. 15A-B mostram que há uma resposta à dose em relação à porcentagem de edição (FIG. 15A) e níveis séricos de TTR (FIG. 15B) em camundongos do tipo selvagem após a administração de formulações de LNP compreendendo o guia G502, que é homólogo cruzado entre camundongo e cyno.

[00237] A FIG. 16 mostra curvas de resposta à dose de sgRNAs específicos de TTR humana formulados por nanopartículas lipídicas em hepatócitos primários cyno.

[00238] A FIG. 17 mostra curvas de resposta à dose de sgRNAs específicos de TTR cyno formulados por nanopartículas lipídicas em hepatócitos primários humanos.

[00239] A FIG. 18 mostra curvas de resposta à dose de sgRNAs específicos de TTR cyno formulados por nanopartículas lipídicas em hepatócitos primários cyno.

[00240] As FIGS. 19A-D mostra TTR no soro (% TSS; FIG. 19A e 19C) e resultados de edição após dosagem de formulações de LNP nas razões e quantidades indicadas (FIGs. 19B e 19D).

[00241] A FIG. 20 mostra a análise fora do alvo de certos RNAs de guia único em hepatócitos primários humanos (PHH) direcionado à TTR. No gráfico, os quadrados preenchidos representam a identificação do sítio de corte no alvo, enquanto os círculos abertos representam a identificação de possíveis sítios fora do alvo.

[00242] As FIGS. 21A-B mostram a porcentagem de edição no alvo (ONT, FIG. 21A) e em dois sítios fora do alvo (OT2 e OT4) em hepatócitos primários humanos após administração da nanopartícula lipídica formulada G000480. A FIG. 21B é uma versão redimensionada dos dados de OT2, OT4 e controle negativo (Neg Cont) na FIG. 21A.

[00243] As FIGS. 22A-B mostram a porcentagem de edição no alvo (ONT, FIG. 22A) e em um sítio fora do alvo (OT4) em hepatócitos primários humanos após a administração de nanopartículas lipídicas formuladas G000486. A FIG. 22B é uma versão redimensionada dos dados de OT4 e controle negativo (Neg Cont) na FIG. 22A.

[00244] As FIGS. 23A-B mostram a porcentagem de edição (FIG. 23A) e o número de eventos de inserção e exclusão no local TTR (FIG. 23B). A FIG. 23A mostra a porcentagem de edição no locus TTR nos grupos de controle e tratamento (dosados com sgRNA específico para TTR formulada por nanopartículas lipídicas). A FIG. 23B mostra o número de eventos de inserção e exclusão no local TTR quando a

edição foi observada no grupo de tratamento da FIG. 23A.

[00245] As FIGS. 24A-B mostram níveis de TTR no soro circulante (FIG. 24A) e líquido cefalorraquidiano (CSF) (FIG. 24B), respectivamente, em  $\mu\text{g/mL}$  para controle e tratamento (dosado com sgRNA específico para TTR formulada por nanopartículas lipídicas). O tratamento resultou em nocaute > 99% dos níveis de TTR no soro.

[00246] As FIGS. 25A-D mostram imagens de imuno-histoquímica com coloração para TTR no estômago (FIG. 25A), cólon (FIG. 25B), nervo ciático (FIG. 25C) e gânglio da raiz dorsal (DRG) (FIG. 25D) de camundongos de controle e tratamento (dosados com sgRNA específico para TTR formulada por nanopartículas lipídicas). À direita, os gráficos de barras mostram redução na coloração de TTR 8 semanas após o tratamento nos camundongos tratados, conforme medido pela porcentagem de área ocupada para cada tipo de tecido.

[00247] As FIGS. 26A-C mostram edição de TTR no fígado (FIG. 26A) e resultados de TTR no soro (em  $\mu\text{g/mL}$  (FIG. 26B) e como porcentagem de controle tratado com TSS (FIG. 26C)), respectivamente, de camundongos TTR humanizados dosados com formulações LNP em uma variedade de doses com os guias G000480, G000488, G000489 e G000502 e contendo mRNA de Cas9 (SEQ ID NO: 1) na razão de 1:1 em peso para o guia.

[00248] As FIGS. 27A-C mostram edição de TTR no fígado (FIG. 27A) e resultados de TTR no soro (em  $\mu\text{g/mL}$  (FIG. 27B) e como porcentagem de controle tratado com TSS (FIG. 27C)), respectivamente, de camundongos TTR humanizados dosados com formulações LNP em uma variedade de doses com os guias G000481, G000482, G000486 e G000499 e contendo mRNA de Cas9 (SEQ ID NO: 1) na razão de 1:1 em peso para o guia.

[00249] As FIGS. 28A-C mostram edição de TTR no fígado (FIG. 28A) e resultados de TTR no soro (em  $\mu\text{g/mL}$  (FIG. 28B) e como

porcentagem de controle tratado com TSS (FIG. 28C)), respectivamente, de camundongos TTR humanizados dosados com formulações LNP em uma variedade de doses com os guias G000480, G000481, G000486, G000499 e G000502 e contendo mRNA de Cas9 (SEQ ID NO: 1) na razão de 1:2 em peso para o guia.

[00250] A FIG. 29 mostra a expressão relativa de mRNA de TTR em hepatócitos primários humanos (PHH) após tratamento com LNPs compreendendo mRNA de Cas9 e um gRNA como indicado, em comparação com controles negativos (não tratados).

[00251] A FIG. 30 mostra a expressão relativa de mRNA de TTR em hepatócitos primários humanos (PHH) após tratamento com LNPs compreendendo mRNA de Cas9 e um gRNA como indicado, em comparação com controles negativos (não tratados).

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

[00252] Será feita agora referência com detalhes de certas modalidades da invenção, cujos exemplos são ilustrados nos desenhos que acompanham. Enquanto a invenção será descrita em conjunto com as modalidades ilustradas, será entendido que não se destina a limitar a invenção às modalidades. Pelo contrário, a invenção destina-se a abranger todas as alternativas, modificações e equivalentes, que podem ser incluídas dentro da invenção como definido pelas reivindicações anexas.

[00253] Antes de descrever os presentes ensinamentos em detalhes, deve-se entender que a divulgação não se limita a composições específicas ou etapas do processo, pois podem variar. Deve-se notar que, tal como é usado aqui neste relatório descritivo, as formas singulares "um", "uma" e "o", "a" incluem referências plurais a menos que o contexto dite claramente o contrário. Assim, por exemplo, a referência a "um conjugado" inclui uma pluralidade de conjugados e a referência a "uma célula" inclui uma pluralidade de células e

semelhantes.

[00254] Os intervalos numéricos são inclusivos dos números que definem a faixa. Os valores medidos e mensuráveis são entendidos como aproximados, levando em consideração dígitos significativos e o erro associado à medição. Além disso, o uso de "compreende", "compreendem", "compreendendo", "contém", "contêm", "contendo", "inclui", "incluem" e "incluindo" não se destina a ser limitativo. Deve ser entendido que a descrição geral anterior e a descrição detalhada são exemplificativas e explicativas apenas e não são restritivas dos ensinamentos.

[00255] A menos que especificamente indicado no relatório descritivo acima, modalidades no relatório descritivo que recitam "compreendendo" vários componentes também são contempladas como "consistindo em" ou "consistindo essencialmente em" os componentes recitados; modalidades no relatório descritivo que recitam "consistindo em" vários componentes também são contempladas como "compreendendo" ou "consistindo essencialmente em" os componentes recitados; e modalidades no relatório descritivo que recitam "consistindo essencialmente em" vários componentes também são contempladas como "consistindo em" ou "compreendendo" os componentes recitados (essa intercambiabilidade não se aplica ao uso desses termos nas reivindicações). O termo "ou" é usado em um sentido inclusivo, ou seja, equivalente a "e/ou", a menos que o contexto indique claramente o contrário.

[00256] Os títulos de seção aqui utilizados são apenas para fins organizacionais e não devem ser interpretados como limitando a matéria desejada de qualquer forma. No caso de qualquer material incorporado por referência contradizer qualquer termo definido neste relatório descritivo ou qualquer outro conteúdo expresso deste relatório descritivo, este relatório descritivo controla. Embora os presentes

ensinamentos sejam descritos em conjunto com várias modalidades, não se pretende que os presentes ensinamentos sejam limitados a tais modalidades. Pelo contrário, os presentes ensinamentos abrangem várias alternativas, modificações e equivalentes, como será apreciado pelos versados na técnica.

## **I. Definições**

[00257] Salvo indicação em contrário, os seguintes termos e frases como aqui utilizado, destinam-se a ter os seguintes significados:

[00258] "Polinucleotídeo" e "ácido nucleico" são usados aqui para se referir a um composto multimérico compreendendo nucleosídeos ou análogos de nucleosídeos que possuem bases heterocíclicas nitrogenadas ou análogos de bases ligados entre si ao longo de uma espinha dorsal, incluindo RNA convencional, DNA, RNA-DNA misto e polímeros que são análogos dos mesmos. Uma "espinha dorsal" de ácido nucleico pode ser constituída por uma variedade de ligações, incluindo uma ou mais ligações de açúcar-fosfodiéster, ligações peptídeo-ácido nucleico ("ácidos nucleicos peptídicos" ou PNA; PCT WO 95/32305), ligações fosforotioato, ligações metilfosfonato ou combinações das mesmas. As frações de açúcar de um ácido nucleico podem ser ribose, desoxirribose ou compostos semelhantes com substituições, por exemplo, substituições 2' metoxi ou 2' haleto. As bases nitrogenadas podem ser bases convencionais (A, G, C, T, U), análogos dos mesmos (por exemplo, uridinas modificadas, como 5-metoxiuridina, pseudouridina ou N1-metilpseudouridina, ou outras); inosina; derivados de purinas ou pirimidinas (por exemplo, N<sup>4</sup>-metil desoxiganosina, deaza ou aza-purinas, deaza ou aza-pirimidinas, bases de pirimidina com grupos substituintes na posição 5 ou 6 (por exemplo, 5-metilcitosina), bases de purinas com uma substituinte nas posições 2, 6 ou 8, 2-amino-6-metilaminopurina, O<sup>6</sup>-metilguanina, 4-tio-pirimidinas, 4-amino-pirimidinas, 4-dimetil-hidrazina-pirimidinas e O<sup>4</sup>-alquil-

pirimidinas; Patente US 5.378.825 e PCT WO 93/13121). Para discussão geral, ver *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams *et al.*, ed., 11<sup>th</sup> ed., 1992). Os ácidos nucleicos podem incluir um ou mais resíduos "abásicos", onde a espinha dorsal não inclui base nitrogenada para a(s) posição(ões) do polímero (Patente US 5.585.481). Um ácido nucleico pode compreender apenas açúcares, bases e ligações de RNA ou DNA convencionais, ou pode incluir componentes e substituições convencionais (por exemplo, bases convencionais com ligações 2' metoxi ou polímeros contendo ambas as bases convencionais e um ou mais análogos de bases). O ácido nucleico inclui "ácido nucleico bloqueado" (LNA), um análogo contendo um ou mais monômeros de nucleotídeo LNA com uma unidade de furanose bicíclica bloqueada em um RNA que imita a conformação do açúcar, o que aumenta a afinidade da hibridação em relação a sequências complementares de RNA e DNA (Vester e Wengel, 2004 *Biochemistry* 43(42):13233-41). O RNA e o DNA têm diferentes frações de açúcar e podem diferir pela presença de uracil ou análogos no RNA e timina ou análogos no DNA.

[00259] "RNA guia", "gRNA" e "guia" são usados aqui de forma intercambiável para se referir a um crRNA (também conhecido como RNA CRISPR) ou à combinação de um crRNA e um trRNA (também conhecido como tracrRNA). O crRNA e o trRNA podem ser associados como uma única molécula de RNA (RNA guia único, sgRNA) ou em duas moléculas de RNA separadas (RNA guia duplo, dgRNA). "RNA guia" ou "gRNA" refere-se a cada tipo. O trRNA pode ser uma sequência de ocorrência natural ou uma sequência de trRNA com modificações ou variações em comparação com as sequências de ocorrência natural.

[00260] Como utilizado neste documento, uma "sequência guia" refere-se a uma sequência dentro de um RNA guia que é complementar a uma sequência alvo e funciona para direcionar um RNA guia para uma sequência alvo para ligação ou modificação (por exemplo, clivagem) por

um agente de ligação de DNA guiado por RNA. Uma "sequência guia" também pode ser referida como "sequência alvo" ou "sequência espaçadora". Uma sequência guia pode ter 20 pares de bases de comprimento, por exemplo, no caso de *Streptococcus pyogenes* (por exemplo, Spy Cas9) e homólogos/ortólogos de Cas9 relacionados. Sequências mais curtas ou mais longas também podem ser usadas como guias, por exemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 ou 25 nucleotídeos de comprimento. Por exemplo, em algumas modalidades, a sequência guia compreende pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82. Em algumas modalidades, a sequência alvo está em um gene ou em um cromossomo, por exemplo, e é complementar à sequência guia. Em algumas modalidades, o grau de complementaridade ou identidade entre uma sequência guia e sua sequência alvo correspondente pode ser de cerca de 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%. Por exemplo, em algumas modalidades, a sequência guia compreende uma sequência com cerca de 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade para pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82. Em algumas modalidades, a sequência guia e a região alvo podem ser 100% complementares ou idênticas. Em outras modalidades, a sequência guia e a região alvo podem conter pelo menos uma incompatibilidade. Por exemplo, a sequência guia e a sequência alvo podem conter 1, 2, 3 ou 4 incompatibilidades, em que o comprimento total da sequência alvo é pelo menos 17, 18, 19, 20 ou mais pares de bases. Em algumas modalidades, a sequência guia e a região alvo podem conter 1-4 incompatibilidades, onde a sequência guia compreende pelo menos 17, 18, 19, 20 ou mais nucleotídeos. Em algumas modalidades, a sequência guia e a região alvo podem conter 1, 2, 3 ou 4 incompatibilidades, onde a sequência guia compreende 20

nucleotídeos.

[00261] As sequências alvo das proteínas Cas incluem as cadeias positivas e negativas do DNA genômico (isto é, a sequência fornecida e o complemento inverso da sequência), pois um substrato de ácido nucleico para uma proteína Cas é um ácido nucleico de fita dupla. Por conseguinte, quando se diz que uma sequência guia é “complementar a uma sequência alvo”, deve ser entendido que a sequência guia pode direcionar um RNA guia para se ligar ao complemento reverso de uma sequência alvo. Assim, em algumas modalidades, onde a sequência guia liga o complemento reverso de uma sequência alvo, a sequência guia é idêntica a certos nucleotídeos da sequência alvo (por exemplo, a sequência alvo que não inclui o PAM), exceto a substituição de U por T na sequência guia.

[00262] Como utilizado neste documento, um "agente de ligação a DNA guiado por RNA" significa um polipeptídeo ou complexo de polipeptídeos com atividade de ligação a RNA e DNA, ou uma subunidade de ligação a DNA desse complexo, em que a atividade de ligação a DNA é específica da sequência e depende da sequência do RNA. Agentes de ligação a DNA guiados por RNA exemplificativos incluem Cas cleavases/nickases e formas inativadas dos mesmos ("agentes de ligação ao DNA de dCas"). "Nuclease de Cas", também chamada de "proteína Cas", como aqui utilizada, abrange agentes de ligação ao DNA de Cas clivases, Cas nickases, e dCas DNA. Os agentes de ligação ao DNA de Cas cleavases/nickases incluem um complexo Csm ou Cmr de um sistema CRISPR tipo III, a subunidade Cas10, Csm1 ou Cmr2, um complexo em cascata de um sistema CRISPR tipo I, a subunidade Cas3 do mesmo e as Cas nucleases Classe 2. Como utilizado neste documento, uma "Cas nuclease Classe 2" é um polipeptídeo de cadeia única com atividade de ligação ao DNA guiada por RNA, como uma Cas9 nuclease ou uma Cpf1 nuclease. As Cas

nucleases Classe 2 incluem Cas clivases Classe 2 e Cas nickases Classe 2 (por exemplo, variantes H840A, D10A ou N863A), que possuem ainda clivases de DNA guiadas por RNA ou atividade de nickase e agentes de ligação do dCl da Classe 2, nas quais a atividade de clivase/nickase é inativada. As Cas nucleases Classe 2 incluem, por exemplo, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (por exemplo, variantes N497A, R661A, Q695A, Q926A), HypaCas9 (por exemplo, variantes N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9 1.0) (por exemplo, variantes K810A, K1003A, R1060A) e eSPCas9 (1.1) (por exemplo, variantes K848A, K1003A, R1060A) e modificações das mesmas. A proteína Cpf1, Zetsche *et al.*, *Cell*, 163:1-13 (2015), é homóloga a Cas9 e contém um domínio de nuclease semelhante a RuvC. As sequências Cpf1 de Zetsche são incorporadas por referência na sua totalidade. *Ver, por exemplo*, Zetsche, Tabelas S1 e S3. "Cas9" inclui Spy Cas9, as variantes de Cas9 listadas aqui e equivalentes dos mesmos. *Ver, por exemplo*, Makarova *et al.*, *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov *et al.*, *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015).

[00263] "Uridina modificada" é usado aqui para se referir a um nucleosídeo diferente da timidina com os mesmos aceitadores de ligação de hidrogênio que a uridina e uma ou mais diferenças estruturais da uridina. Em algumas modalidades, uma uridina modificada é uma uridina substituída, isto é, uma uridina na qual um ou mais substituintes não prótons (por exemplo, alcoxi, como metoxi) tomam o lugar de um próton. Em algumas modalidades, uma uridina modificada é pseudouridina. Em algumas modalidades, uma uridina modificada é uma pseudouridina substituída, ou seja, uma pseudouridina na qual um ou mais substituintes não prótons (por exemplo, alquil, como metil) tomam o lugar de um próton. Em algumas modalidades, uma uridina modificada é uma uridina substituída, pseudouridina ou uma pseudouridina substituída.

[00264] "Posição da uridina", conforme utilizado neste documento, refere-se a uma posição em um polinucleotídeo ocupado por uma uridina ou uma uridina modificada. Assim, por exemplo, um polinucleotídeo no qual "100% das posições de uridina são uridinas modificadas" contém uma uridina modificada em todas as posições que seriam uridinas em um RNA convencional (onde todas as bases são padrão A, U, C ou G bases) da mesma sequência. A menos que indicado de outra forma, um U em uma sequência polinucleotídica de uma tabela de sequências ou listagem de sequências, ou que acompanha, esta divulgação pode ser uma uridina ou uma uridina modificada.

[00265] Como utilizado neste documento, uma primeira sequência é considerada "compreendendo uma sequência com pelo menos X% de identidade para" uma segunda sequência se um alinhamento da primeira sequência com a segunda sequência mostrar que X% ou mais das posições da segunda sequência em sua totalidade é correspondida pela primeira sequência. Por exemplo, a sequência AAGA compreende uma sequência com 100% de identidade com a sequência AAG porque um alinhamento daria 100% de identidade, pois existem correspondências para todas as três posições da segunda sequência. As diferenças entre RNA e DNA (geralmente a troca de uridina por timidina ou vice-versa) e a presença de análogos de nucleosídeos, como uridinas modificadas, não contribuem para diferenças de identidade ou complementaridade entre polinucleotídeos, desde que os nucleotídeos relevantes (como timidina, uridina ou uridina modificada) tenham o mesmo complemento (por exemplo, adenosina para toda timidina, uridina ou uridina modificada; outro exemplo é a citosina e a 5-metilcitosina, ambas com guanósina ou guanósina modificada como complemento). Assim, por exemplo, a sequência 5'-AXG em que X é qualquer uridina modificada, como pseudouridina, N1-metil

pseudouridina ou 5-metoxiuridina, é considerada 100% idêntica à AUG, pois ambas são perfeitamente complementares à mesma sequência (5'-CAU). Exemplos de algoritmos de alinhamento são os algoritmos Smith-Waterman e Needleman-Wunsch, que são bem conhecidos na técnica. Um versado na técnica entenderá qual escolha de algoritmo e configurações de parâmetro é apropriada para um determinado par de sequências a serem alinhadas; para sequências de comprimento e identidade geralmente semelhantes e esperadas > 50% para aminoácidos ou > 75% para nucleotídeos, o algoritmo Needleman-Wunsch com configurações padrão da interface do algoritmo Needleman-Wunsch fornecida pelo EBI no [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) servidor web é geralmente apropriado.

[00266] "mRNA" é usado aqui para se referir a um polinucleotídeo que não é DNA e compreende um quadro de leitura aberto que pode ser traduzido em um polipeptídeo (isto é, pode servir como um substrato para tradução por um ribossomo e tRNAs amino-acilados). O mRNA pode compreender uma espinha dorsal de fosfato-açúcar incluindo resíduos de ribose ou análogos dos mesmos, por exemplo, resíduos de 2'-metoxi-ribose. Em algumas modalidades, os açúcares de uma espinha dorsal de mRNA fosfato-açúcar consistem essencialmente em resíduos de ribose, resíduos de 2'-metoxi-ribose ou uma combinação dos mesmos. Em geral, os mRNAs não contêm uma quantidade substancial de resíduos de timidina (por exemplo, 0 resíduos ou menos que 30, 20, 10, 5, 4, 3 ou 2 resíduos de timidina; ou menos que 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% ou 0,1% de timidina). Um mRNA pode conter uridinas modificadas em algumas ou todas as suas posições de uridina.

[00267] Como utilizado neste documento, o "teor mínimo de uridina" de um determinado quadro de leitura aberto (ORF) é o teor de uridina de um ORF que (a) usa um códon mínimo de uridina em todas as

posições e (b) codifica a mesma sequência de aminoácidos que o ORF fornecido. O(s) códon(s) mínimo(s) de uridina para um dado aminoácido é o(s) códon(s) com menos uridinas (geralmente 0 ou 1, exceto um códon para fenilalanina, onde o códon mínimo de uridina possui 2 uridinas). Os resíduos de uridina modificados são considerados equivalentes às uridinas com o objetivo de avaliar o teor mínimo de uridina.

[00268] Como utilizado neste documento, o "teor mínimo de dinucleotídeo de uridina" de um determinado quadro de leitura aberto (ORF) é o menor teor possível de dinucleotídeo de uridina (UU) de um ORF que (a) usa um códon mínimo de uridina (como discutido acima) em todas as posições e (b) codifica a mesma sequência de aminoácidos que o ORF fornecido. O teor de dinucleotídeo de uridina (UU) pode ser expresso em termos absolutos como a enumeração de dinucleotídeos de UU em um ORF ou em uma base de taxa como a porcentagem de posições ocupadas pelas uridinas de dinucleotídeos de uridina (por exemplo, AUUAU teria um teor de dinucleotídeo de uridina de 40% porque 2 de 5 posições são ocupadas pelas uridinas de um dinucleotídeo de uridina). Os resíduos de uridina modificados são considerados equivalentes às uridinas com o objetivo de avaliar o teor mínimo de dinucleotídeo de uridina.

[00269] Como utilizado neste documento, "TTR" refere-se à transtirretina, que é o produto do gene de um gene *TTR*.

[00270] Como utilizado neste documento, "amiloide" refere-se a agregados anormais de proteínas ou peptídeos que são normalmente solúveis. Os amiloides são insolúveis e podem criar depósitos proteicos em órgãos e tecidos. Proteínas ou peptídeos em amiloides podem ser dobrados incorretamente em uma forma que permita que muitas cópias da proteína se juntem para formar fibrilas. Embora algumas formas de amiloide possam ter funções normais no corpo humano, "amiloides",

conforme utilizado neste documento, refere-se a agregados anormais ou patológicos de proteína. Os amiloides podem compreender uma única proteína ou peptídeo, como TTR, ou podem compreender múltiplas proteínas ou peptídeos, como TTR e proteínas adicionais.

[00271] Como utilizado neste documento, "fibrilas amiloides" refere-se a fibras insolúveis de amiloide que são resistentes à degradação. As fibrilas amiloides podem produzir sintomas com base na proteína ou peptídeo específico e no tipo de tecido e célula em que foram agregados.

[00272] Como utilizado neste documento, "amiloidose" refere-se a uma doença caracterizada por sintomas causados pela deposição de fibrilas amiloides ou amiloides. A amiloidose pode afetar vários órgãos, incluindo coração, rim, fígado, baço, sistema nervoso e aparelho digestivo.

[00273] Conforme utilizado neste documento, "ATTR", "amiloidose relacionada à TTR", "amiloidose TTR", "amiloidose ATTR" ou "amiloidose associada à TTR" refere-se à amiloidose associada à deposição de TTR.

[00274] Conforme utilizado neste documento, "cardiomiopatia amiloide familiar" ou "FAC" refere-se a uma amiloidose transtiretina hereditária (ATTR) caracterizada principalmente por cardiomiopatia restritiva. Insuficiência cardíaca congestiva é comum na FAC. A idade média de início é de aproximadamente 60 a 70 anos, com uma expectativa de vida estimada de 4-5 anos após o diagnóstico.

[00275] Conforme utilizado neste documento, "polineuropatia amiloide familiar" ou "FAP" refere-se a uma amiloidose transtiretina hereditária (ATTR) caracterizada principalmente por neuropatia sensorial-motora.. A neuropatia autonômica é comum na FAP. Embora a neuropatia seja uma característica principal, os sintomas de FAP também podem incluir caquexia, insuficiência renal e doença cardíaca.

A idade média de início da FAP é de aproximadamente 30 a 50 anos, com expectativa de vida estimada de 5 a 15 anos após o diagnóstico.

[00276] Conforme utilizado neste documento, "ATTR do tipo selvagem" e "ATTRwt" se referem à ATTR não associada a uma mutação patológica de TTR, como T60A, V30M, V30A, V30G, V30L, V122I, V122A ou V122(-). A ATTRwt também foi referida como amiloidose sistêmica senil. O início geralmente ocorre em homens com 60 anos ou mais, com os sintomas mais comuns sendo insuficiência cardíaca congestiva e ritmo cardíaco anormal, como fibrilação atrial. Os sintomas adicionais incluem consequências do mau funcionamento do coração, como falta de ar, fadiga, tontura, inchaço (especialmente nas pernas), náusea, angina, sono interrompido e perda de peso. Uma história de síndrome do túnel carpal indica aumento do risco de ATTRwt e, em alguns casos, pode ser indicativa de doença em estágio inicial. A ATTRwt geralmente leva à diminuição da função cardíaca ao longo do tempo, mas pode ter um prognóstico melhor que a ATTR hereditária, porque os depósitos de TTR do tipo selvagem se acumulam mais lentamente. Os tratamentos existentes são semelhantes a outras formas de ATTR (exceto o transplante de fígado) e geralmente são direcionados para apoiar ou melhorar a função cardíaca, variando de diuréticos e ingestão limitada de líquidos e sal a anticoagulantes e, em casos graves, transplantes de coração. No entanto, como FAC, a ATTRwt pode resultar em morte por insuficiência cardíaca, às vezes dentro de 3-5 anos após o diagnóstico.

[00277] As sequências guia úteis nas composições e métodos de RNA guia aqui descritos são mostradas na Tabela 1 e em todo o pedido.

[00278] Conforme utilizado neste documento, "ATTR hereditária" refere-se à ATTR que está associada a uma mutação na sequência do gene *TTR*. As mutações conhecidas no gene *TTR* associado à ATTR incluem aquelas que resultam em TTR com substituições de T60A,

V30M, V30A, V30G, V30L, V122I, V122A ou V122(-).

[00279] Conforme utilizado neste documento, "indels" refere-se a mutações de inserção/deleção que consistem em vários nucleotídeos que são inseridos ou excluídos no sítio de quebras de fita dupla (DSBs) em um ácido nucleico alvo.

[00280] Conforme utilizado neste documento, "knockdown" refere-se a uma diminuição na expressão de um produto genético específico (por exemplo, proteína, mRNA ou ambos). O knockdown de uma proteína pode ser medido detectando a proteína secretada pelo tecido ou pela população de células (por exemplo, no soro ou no meio celular) ou detectando a quantidade celular total da proteína de uma população de tecidos ou células de interesse. Os métodos para medir o knockdown do mRNA são conhecidos e incluem o sequenciamento do mRNA isolado de uma população de tecidos ou células de interesse. Em algumas modalidades, "knockdown" pode se referir a alguma perda de expressão de um produto genético específico, por exemplo, uma diminuição na quantidade de mRNA transcrito ou uma diminuição na quantidade de proteína expressa ou secretada por uma população de células (incluindo populações *in vivo* como as encontradas nos tecidos).

[00281] Conforme utilizado neste documento, "knockout" refere-se a uma perda de expressão de uma proteína específica em uma célula. O knockout pode ser medido detectando a quantidade de secreção de proteína de um tecido ou população de células (por exemplo, no soro ou no meio celular) ou detectando a quantidade celular total de uma proteína de um tecido ou de uma população de células. Em algumas modalidades, os métodos da divulgação "knockout" TTR em uma ou mais células (por exemplo, em uma população de células incluindo populações *in vivo*, como as encontradas nos tecidos). Em algumas modalidades, um knockout não é a formação da proteína TTR mutante, por exemplo, criada por indels, mas a perda completa de expressão da

proteína TTR em uma célula.

[00282] Conforme utilizado neste documento, "TTR mutante" refere-se a um produto genético de *TTR* (isto é, a proteína TTR) com uma alteração na sequência de aminoácidos de TTR em comparação com a sequência de aminoácidos de tipo selvagem de TTR. A sequência TTR de tipo selvagem humana está disponível em NCBI Gene ID: 7276; Conjunto: Conjunto: ENSG00000118271. As formas mutantes de TTR associadas à ATTR, por exemplo, em humanos, incluem T60A, V30M, V30A, V30G, V30L, V122I, V122A ou V122(-).

[00283] Conforme utilizado neste documento, "*TTR* mutante" ou "alelo *TTR* mutante" refere-se a uma sequência *TTR* com uma alteração na sequência nucleotídica de *TTR* em comparação com a sequência de tipo selvagem (NCBI Gene ID: 7276; Conjunto: ENSG00000118271).

[00284] Conforme utilizado neste documento, "ribonucleoproteína" (RNP) ou "complexo RNP" refere-se a um RNA guia junto com um agente de ligação a DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease, por exemplo, um agente de ligação a Cas cleavase, Cas nickase ou dCas (por exemplo, Cas9). Em algumas modalidades, o RNA guia guia o agente de ligação ao DNA guiado por RNA, como Cas9, a uma sequência alvo, e o RNA guia hibrida com e o agente se liga à sequência alvo; nos casos em que o agente é uma clivase ou uma nickase, a ligação pode ser seguida por clivagem ou corte.

[00285] Conforme utilizado neste documento, uma "sequência alvo" refere-se a uma sequência de ácido nucleico em um gene alvo que possui complementaridade com a sequência guia do gRNA. A interação da sequência alvo e a sequência guia direciona um agente de ligação ao DNA guiado por RNA para se ligar e potencialmente cortar ou clivar (dependendo da atividade do agente), dentro da sequência alvo.

[00286] Conforme utilizado neste documento, "tratamento" refere-se a qualquer administração ou aplicação de um terapêutico para doença

ou distúrbio em um sujeito e inclui inibir a doença, interromper seu desenvolvimento, aliviar um ou mais sintomas da doença, curar a doença ou impedir a recorrência de um ou mais sintomas da doença. Por exemplo, o tratamento de ATTR pode compreender aliviar os sintomas de ATTR.

[00287] "Uridina modificada" é usado aqui para se referir a um nucleosídeo diferente da timidina com os mesmos aceitadores de ligação de hidrogênio que a uridina e uma ou mais diferenças estruturais da uridina. Em algumas modalidades, uma uridina modificada é uma uridina substituída, isto é, uma uridina na qual um ou mais substituintes não prótons (por exemplo, alcoxi, como metoxi) tomam o lugar de um próton. Em algumas modalidades, uma uridina modificada é pseudouridina. Em algumas modalidades, uma uridina modificada é uma pseudouridina substituída, ou seja, uma pseudouridina na qual um ou mais substituintes não prótons (por exemplo, alquil, como metil) tomam o lugar de um próton, por exemplo, N1-metil pseudouridina. Em algumas modalidades, uma uridina modificada é uma uridina substituída, pseudouridina ou uma pseudouridina substituída.

[00288] Como utilizado neste documento, uma primeira sequência é considerada "compreendendo uma sequência com pelo menos X% de identidade para" uma segunda sequência se um alinhamento da primeira sequência com a segunda sequência mostrar que X% ou mais das posições da segunda sequência em sua totalidade é correspondida pela primeira sequência. Por exemplo, a sequência AAGA compreende uma sequência com 100% de identidade com a sequência AAG porque um alinhamento daria 100% de identidade, pois existem correspondências para todas as três posições da segunda sequência. As diferenças entre RNA e DNA (geralmente a troca de uridina por timidina ou vice-versa) e a presença de análogos de nucleosídeos, como uridinas modificadas, não contribuem para diferenças de

identidade ou complementaridade entre polinucleotídeos, desde que os nucleotídeos relevantes (como timidina, uridina ou uridina modificada) tenham o mesmo complemento (por exemplo, adenosina para toda timidina, uridina ou uridina modificada; outro exemplo é a citosina e a 5-metilcitosina, ambas com guanosina como complemento). Assim, por exemplo, a sequência 5'-AXG em que X é qualquer uridina modificada, como pseudouridina, N1-metil pseudouridina ou 5-metoxiuridina, é considerada 100% idêntica à AUG, pois ambas são perfeitamente complementares à mesma sequência (5'-CAU). Exemplos de algoritmos de alinhamento são os algoritmos Smith-Waterman e Needleman-Wunsch, que são bem conhecidos na técnica. Um versado na técnica entenderá qual escolha de algoritmo e configurações de parâmetro é apropriada para um determinado par de sequências a serem alinhadas; para sequências de comprimento e identidade geralmente semelhantes e esperadas > 50% para aminoácidos ou > 75% para nucleotídeos, o algoritmo Needleman-Wunsch com configurações padrão da interface do algoritmo Needleman-Wunsch fornecida pelo EBI no [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) servidor web é geralmente apropriado.

[00289] O termo "cerca de" ou "aproximadamente" significa um erro aceitável para um determinado valor conforme determinado por aquele versado na técnica, que depende em parte de como o valor é medido ou determinado.

## **II. Composições**

### **A. Composições compreendendo RNA guia (gRNAs)**

[00290] São fornecidas aqui composições úteis para editar o gene *TTR*, por exemplo, usando um RNA guia com um agente de ligação a DNA guiado por RNA (por exemplo, um sistema CRISPR/Cas). As composições podem ser administradas a indivíduos com sequências de genes *TTR* do tipo selvagem ou não selvagem, como, por exemplo, sujeitos com *ATTR*, que podem ser *ATTR* em peso ou uma forma

hereditária ou familiar de ATTR. As sequências guia direcionadas ao gene *TTR* são mostradas na Tabela 1 nas SEQ ID Nos: 5-82.

**Tabela 1: Sequências guia direcionadas à TTR, nomenclatura, coordenadas cromossômicas e sequência.**

SEQ ID No.	ID Guia	Descrição	Espécie	Localização cromossômica	Sequências Guia *
5	CR003335	TTR (Éxon 1)	Humana	chr18:3159191-7-31591937	CUGCUCUCCUCUGCCUUGC
6	CR003336	TTR (Éxon 1)	Humana	chr18:3159192-2-31591942	CCUCCUCUGCCUUGCUGGAC
7	CR003337	TTR (Éxon 1)	Humana	chr18:3159192-5-31591945	CCAGUCCAGCAAGGCAGAGG
8	CR003338	TTR (Éxon 1)	Humana	chr18:3159192-8-31591948	AUACCAGUCCAGCAAGGCAG
9	CR003339	TTR (Éxon 1)	Humana	chr18:3159193-4-31591954	ACACAAAUACCAGUCCAGCA
10	CR003340	TTR (Éxon 1)	Humana	chr18:3159193-7-31591957	UGGACUGGUUUUGUGUCUG
11	CR003341	TTR (Éxon 1)	Humana	chr18:3159194-1-31591961	CUGGUUUUGUGUCUGAGGC
12	CR003342	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159288-0-31592900	CUUCUCUACACCCAGGGCAC
13	CR003343	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159290-2-31592922	CAGAGGACACUUGGAUUCAC
14	CR003344	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159291-1-31592931	UUUGACCAUCAGAGGACACU
15	CR003345	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159291-9-31592939	UCUAGAACUUUGACCAUCAG
16	CR003346	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159292-8-31592948	AAAGUUCUAGAUGCUGUCG
17	CR003347	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159294-8-31592968	CAUUGAUGGCAGGACUGCCU
18	CR003348	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159294-8-31592968	AGGCAGUCCUGCCAUCAAUG
19	CR003349	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159295-8-31592978	UGCACGGCCACAUUGAUGGC
20	CR003350	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159296-2-31592982	CACAUGCACGGCCACAUUGA
21	CR003351	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159297-4-31592994	AGCCUUUCUGAACACAUGCA
22	CR003352	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159298-6-31593006	GAAAGGCUGCUGAUGACACC

23	CR003353	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159298 7-31593007	AAAGGCUGCUGAUGACAC CU
24	CR003354	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159300 3-31593023	ACCUGGGAGCCAUUUGC CUC
25	CR003355	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159300 7-31593027	CCCAGAGGCAAUUGGCUC CC
26	CR003356	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159301 5-31593035	GCAACUUACCCAGAGGCA AA
27	CR003357	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159302 2-31593042	UUCUUUGGCAACUUACCC AG
28	CR003358	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159512 7-31595147	AUGCAGCUCUCCAGACUC AC
29	CR003359	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159512 6-31595146	AGUGAGUCUGGAGAGCU GCA
30	CR003360	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159512 7-31595147	GUGAGUCUGGAGAGCUG CAU
31	CR003361	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159514 0-31595160	GCUGCAUGGGCUCACAAC UG
32	CR003362	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159514 3-31595163	GCAUGGGCUCACAACUGA GG
33	CR003363	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159515 6-31595176	ACUGAGGAGGAAUUUGUA GA
34	CR003364	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159515 7-31595177	CUGAGGAGGAAUUUGUA GAA
35	CR003365	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159517 0-31595190	UGUAGAAGGGAUUACAA AG
36	CR003366	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159519 3-31595213	AAAUAGACACCAAUUCUU AC
37	CR003367	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159519 7-31595217	AGACACCAAUUCUACUG GA
38	CR003368	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159520 5-31595225	AAGUGCCUUCAGUAAGA UU
39	CR003369	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159523 5-31595255	CUCUGCAUGCUCUUGGAA UG
40	CR003370	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159523 6-31595256	CCUCUGCAUGCUCUUGGA AU
41	CR003371	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159523 7-31595257	ACCUCUGCAUGCUCUUGG AA
42	CR003372	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159524 2-31595262	UACUCACCUCUGCAUGCU CA
43	CR003373	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159857 0-31598590	GUAUUCACAGCCAACGAC UC
44	CR003374	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159858 3-31598603	GCGGCGGGGGCCGGAGU CGU
45	CR003375	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159859 2-31598612	AAUGGUGUAGCGGCGGG GGC

46	CR003376	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159859 6-31598616	CGGCAAUGGUGUAGCGG CGG
47	CR003377	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159859 7-31598617	GCGGCAAUGGUGUAGCG GCG
48	CR003378	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159859 8-31598618	GGCGGCAAUGGUGUAGC GGC
49	CR003379	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159859 9-31598619	GGGCGGCAAUGGUGUAG CGG
50	CR003380	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159860 2-31598622	GCAGGGCGGCAAUGGUG UAG
51	CR003381	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159861 0-31598630	GGGGCUCAGCAGGGCGG CAA
52	CR003382	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159861 6-31598636	GGAGUAGGGGCUCAGCA GGG
53	CR003383	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159861 9-31598639	AUAGGAGUAGGGGCUCA GCA
54	CR003384	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159862 0-31598640	AAUAGGAGUAGGGGCUCA GC
55	CR003385	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159862 6-31598646	CCCUACUCCUUAUCCAC CA
56	CR003386	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159862 9-31598649	CCGUGGUGGAAUAGGAG UAG
57	CR003387	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159863 0-31598650	GCCGUGGUGGAAUAGGA GUA
58	CR003388	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159863 7-31598657	GACGACAGCCGUGGUGG AAU
59	CR003389	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159864 3-31598663	AUUGGUGACGACAGCCG UGG
60	CR003390	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159864 6-31598666	GGGAUUGGUGACGACAG CCG
61	CR003391	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159864 7-31598667	GGCUGUCGUCACCAAUCC CA
62	CR003392	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159866 1-31598681	AGUCCCUCAUUCUUGG GAU
63	CR005298	TTR (Éxon 1)	Humana	chr18:3159188 3-31591903	UCCACUCAUUCUUGGCAG GA
64	CR005299	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159863 1-31598651	AGCCGUGGUGGAAUAGG AGU
65	CR005300	TTR (Éxon 1)	Humana	chr18:3159196 7-31591987	UCACAGAAACACUCACCG UA
66	CR005301	TTR (Éxon 1)	Humana	chr18:3159196 8-31591988	GUCACAGAAACACUCACC GU
67	CR005302	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159287 4-31592894	ACGUGUCUUCUCUACACC CA
68	CR005303	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159290 3-31592923	UGAAUCCAAGUGUCCUCU GA

69	CR005304	TTR (Éxon 2)	Humana	chr18:3159296 9-31592989	GGCCGUGCAUGUGUUCA GAA
70	CR005305	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159511 4-31595134	UAUAGGAAAACCAGUGAG UC
71	CR005306	TTR (Éxon 3)	Humana	chr18:3159520 4-31595224	AAAUCUUACUGGAAGGCA CU
72	CR005307	TTR (Éxon 4)	Humana	chr18:3159854 8-31598568	UGUCUGUCUUCUCUCAUA GG
73	CR000689	TTR	Cyno	chr18:5068153 3-50681553	ACACAAAUACCAGUCCAG CG
74	CR005364	TTR	Cyno	chr18:5068048 1-50680501	AAAGGCUGCUGAUGAGAC CU
75	CR005365	TTR	Cyno	chr18:5068052 0-50680540	CAUUGACAGCAGGACUGC CU
76	CR005366	TTR	Cyno	chr18:5068153 9-50681559	AUACCAGUCCAGCGAGGC AG
77	CR005367	TTR	Cyno	chr18:5068154 2-50681562	CCAGUCCAGCGAGGCAGA GG
78	CR005368	TTR	Cyno	chr18:5068154 5-50681565	CCUCCUCUGCCUCGCUG GAC
79	CR005369	TTR	Cyno	chr18:5068054 0-50680560	AAAGUUCUAGAUGCCGUC CG
80	CR005370	TTR	Cyno	chr18:5068059 4-50680614	ACUUGUCUUCUCUAUACC CA
81	CR005371	TTR	Cyno	chr18:5067821 6-50678236	AAGUGACUCCAGUAAGA UU
82	CR005372	TTR	Cyno	chr18:5068048 2-50680502	AAAAGGCUGCUGAUGAGA CC

[00291] Cada uma das sequências guia acima pode ainda compreender nucleotídeos adicionais para formar um crRNA, por exemplo, com a seguinte sequência nucleotídica exemplificativa após a sequência guia na extremidade 3': GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 126). No caso de um sgRNA, as Sequências Guia acima podem ainda compreender nucleotídeos adicionais para formar um sgRNA, por exemplo, com a seguinte sequência de nucleotídeos exemplificativa após a extremidade 3' da Sequência Guia: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 125) na orientação 5' a 3'.

[00292] Em algumas modalidades, o sgRNA é modificado. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende o padrão de modificação

mostrado abaixo na SEQ ID NO: 3, em que N é qualquer nucleotídeo natural ou não natural e em que a totalidade dos N's compreende uma sequência guia como descrito aqui e o sgRNA modificado compreende a seguinte sequência:  
 mN\*mN\*mN\*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAm  
 GmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA  
 mAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA  
 mGmUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU (SEQ ID NO: 3), onde "N"  
 pode ser qualquer nucleotídeo natural ou não natural. Por exemplo, aqui  
 incluída está a SEQ ID NO: 3, onde os Ns são substituídos por qualquer  
 uma das sequências guia aqui divulgadas. As modificações  
 permanecem como mostradas na SEQ ID NO: 3, apesar da substituição  
 de N's pelos nucleotídeos de um guia. Ou seja, embora os nucleotídeos  
 do guia substituam os "Ns", os três primeiros nucleotídeos são 2'OMe  
 modificados e existem ligações fosforotioato entre o primeiro e o  
 segundo nucleotídeos, o segundo e o terceiro nucleotídeos e o terceiro  
 e o quarto nucleotídeos.

[00293] Em algumas modalidades, qualquer uma das sequências citadas na Tabela 2 é abrangida.

**Tabela 2: Sequências de sgRNA direcionadas à TTR**

SEQ ID No.	ID Guia	Alvo e Descrição	Espécie	Sequência
87	G000480	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACAC CUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
88	G000481	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mU*mC*mU*AGAACUUUGACCAUC AGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU

89	G000482	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mU*mG*mU*AGAAGGGAUUAUACAA AGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
90	G000483	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mU*mC*mC*ACUCAUUCUUGGCAG GAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
91	G000484	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mA*mG*mA*CACCAAUCUACUG GAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
92	G000485	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mC*mC*mU*CCUCUGCCUUGCUGG ACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
93	G000486	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mA*mC*mA*CAAUACCAGUCCAG CAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
94	G000487	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mU*mU*mC*UUUGGCAACUACCC AGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
95	G000488	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCUGUC CGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
96	G000489	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mU*mU*mU*GACCAUCAGAGGACA CUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU

97	G000490	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mA*mA*mA*UAGACACCAAUCUUA CGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUUAAAUA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
98	G000491	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mA*mU*mA*CCAGUCCAGCAAGGC AGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
99	G000492	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mC*mU*mU*CUCUACACCCAGGGC ACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
100	G000493	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mA*mA*mG*UGCCUCCAGUAAGA UUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
101	G000494	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mG*mU*mG*AGUCUGGAGAGCUGC AUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
102	G000495	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mC*mA*mG*AGGACACUUGGAUUC ACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
103	G000496	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mG*mG*mC*CGUGCAUGUGUUCAG AAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
104	G000497	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mC*mU*mG*CUCCUCCUCUGCCUU GCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU

105	G000498	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mA*mG*mU*GAGUCUGGAGAGCUG CAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
106	G000499	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mU*mG*mA*AUCCAAGUGUCCUCU GAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
107	G000500	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mC*mC*mA*GUCCAGCAAGGCAGA GGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
108	G000501	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mU*mC*mA*CAGAAACACUCACCG UAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
109	G000567	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mG*mA*mA*AGGCUGCUGAUGACA CCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
110	G000568	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mG*mG*mC*UGUCGUCACCAAUCC CAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
111	G000570	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mC*mA*mU*UGAUGGCAGGACUGC CUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
112	G000571	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mG*mU*mC*ACAGAAACACUCACC GUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU

113	G000572	Sequência modificada de sgRNA de TTR	Humana	mC*mC*mC*CUACUCCUAUUCAC CAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
114	G000502	Sequência modificada de sgRNA específica para TTR Cyno	Cyno	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAG CGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
115	G000503	Sequência modificada de sgRNA específica para TTR Cyno	Cyno	mA*mA*mA*AGGCUGCUGAUGAGA CCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
116	G000504	Sequência modificada de sgRNA específica para TTR Cyno	Cyno	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGAGAC CUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
117	G000505	Sequência modificada de sgRNA específica para TTR Cyno	Cyno	mC*mA*mU*UGACAGCAGGACUGC CUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
118	G000506	Sequência modificada de sgRNA específica para TTR Cyno	Cyno	mA*mU*mA*CCAGUCCAGCGAGGC AGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
119	G000507	Sequência modificada de sgRNA específica para TTR Cyno	Cyno	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAGA GGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
120	G000508	Sequência modificada de sgRNA específica para TTR Cyno	Cyno	mC*mC*mU*CCUCUGCCUCGCGUGG ACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU

121	G000509	Sequência modificada de sgRNA específica para TTR Cyno	Cyno	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGUC CGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
122	G000510	Sequência modificada de sgRNA específica para TTR Cyno	Cyno	mA*mC*mU*UGUCUUCUCUAUACC CAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
123	G000511	Sequência modificada de sgRNA específica para TTR Cyno	Cyno	mA*mA*mG*UGACUCCAGUAAGA UUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
124	G000282	TTR	Camun- dongo	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAG CAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU

\* = PS ligação; 'm' = nucleotídeo 2'-O-Me

[00294] Um mapeamento de alinhamento dos IDs Guia com os IDs de sgRNA correspondentes, bem como homologia com o genoma do cyno e os IDs guia correspondentes a cyno são fornecidos na Tabela 3.

**Tabela 3: Mapeamento de ID de sequência guia direcionada à TTR e Homologia Cyno**

Descrição	ID Guia duplo humano	ID Guia único humano	Incompatibilidade de números com o genoma Cyno	ID de dgRNA correspondente a cyno	ID de sgRNA correspondente a cyno
TTR	CR003335	G000497	1		
TTR	CR003336	G000485	1	CR005368	G000508
TTR	CR003337	G000500	1	CR005367	G000507
TTR	CR003338	G000491	1	CR005366	G000506
TTR	CR003339	G000486	1	CR000689	G000502
TTR	CR003340		0		

TTR	CR003341		0		
TTR	CR003342	G000492	sem PAM em cyno		
TTR	CR003343	G000495	sem PAM em cyno		
TTR	CR003344	G000489	0		
TTR	CR003345	G000481	0		
TTR	CR003346	G000488	1	CR005369	G000509
TTR	CR003347	G000570	2	CR005365	G000505
TTR	CR003348		2		
TTR	CR003349		>3		
TTR	CR003350		sem PAM em cyno		
TTR	CR003351		sem PAM em cyno		
TTR	CR003352	G000567	2	CR005372	G000503
TTR	CR003353	G000480	1	CR005364	G000504
TTR	CR003354		1		
TTR	CR003355		1		
TTR	CR003356		3		
TTR	CR003357	G000487	>3		
TTR	CR003358		0		
TTR	CR003359	G000498	0		
TTR	CR003360	G000494	0		
TTR	CR003361		0		
TTR	CR003362		0		
TTR	CR003363		0		
TTR	CR003364		0		
TTR	CR003365	G000482	0		
TTR	CR003366	G000490	0		
TTR	CR003367	G000484	sem PAM em cyno		
TTR	CR003368	G000493	1	CR005371	G000511
TTR	CR003369		0		
TTR	CR003370		0		
TTR	CR003371		0		
TTR	CR003372		0		
TTR	CR003373		1		
TTR	CR003374		2		
TTR	CR003375		2		
TTR	CR003376		2		

TTR	CR003377		2		
TTR	CR003378		2		
TTR	CR003379		2		
TTR	CR003380		1		
TTR	CR003381		1		
TTR	CR003382		0		
TTR	CR003383		0		
TTR	CR003384		0		
TTR	CR003385	G000572	0		
TTR	CR003386		0		
TTR	CR003387		0		
TTR	CR003388		0		
TTR	CR003389	G000569	0		
TTR	CR003390		0		
TTR	CR003391	G000568	0		
TTR	CR003392		0		
TTR	CR005298	G000483	1		
TTR	CR005299		0		
TTR	CR005300	G000501	sem PAM em cyno		
TTR	CR005301	G000571	0		
TTR	CR005302		2	CR005370	G000510
TTR	CR005303	G000499	0		
TTR	CR005304	G000496	>3		
TTR	CR005305		0		
TTR	CR005306		1		
TTR	CR005307		0		

[00295] Em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo um ou mais RNA guia (gRNA) compreendendo sequências guia que direcionam um agente de ligação a DNA guiado por RNA, que pode ser uma nuclease (por exemplo, uma nuclease Cas como Cas9), para uma sequência de DNA alvo em *TTR*. O gRNA pode compreender um crRNA compreendendo uma sequência guia mostrada na Tabela 1. O gRNA pode compreender um crRNA compreendendo 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência guia mostrada na Tabela 1. Em algumas modalidades, o

gRNA compreende um crRNA compreendendo uma sequência com cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência guia mostrada na Tabela 1. Em algumas modalidades, o gRNA compreende um crRNA compreendendo uma sequência com cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade para uma sequência guia mostrada na Tabela 1. O gRNA pode ainda compreender um trRNA. Em cada composição e modalidade de método aqui descrita, o crRNA e o trRNA podem estar associados como um único RNA (sgRNA) ou podem estar em RNAs separados (dgRNA). No contexto de sgRNAs, os componentes crRNA e trRNA podem ser ligados covalentemente, por exemplo, através de uma ligação fosfodiéster ou outra ligação covalente.

[00296] Em cada uma das modalidades de composição, uso e método aqui descritas, o RNA guia pode compreender duas moléculas de RNA como um "RNA guia duplo" ou "dgRNA". O dgRNA compreende uma primeira molécula de RNA compreendendo um crRNA compreendendo, por exemplo, uma sequência guia mostrada na Tabela 1, e uma segunda molécula de RNA compreendendo um trRNA. A primeira e a segunda moléculas de RNA podem não estar ligadas covalentemente, mas podem formar um duplex de RNA por meio do emparelhamento de bases entre porções do crRNA e do trRNA.

[00297] Em cada uma das modalidades de composição, uso e método aqui descritas, o RNA guia pode compreender uma única molécula de RNA como um "RNA guia único" ou "sgRNA". O sgRNA pode compreender um crRNA (ou uma porção do mesmo) compreendendo uma sequência guia mostrada na Tabela 1 covalentemente ligada a um trRNA. O gRNA pode compreender 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência guia mostrada na

Tabela 1. Em algumas modalidades, o crRNA e o trRNA são ligados covalentemente por meio de um ligante. Em algumas modalidades, o sgRNA forma uma estrutura de haste-alça através do emparelhamento de base entre porções do crRNA e do trRNA. Em algumas modalidades, o crRNA e o trRNA são ligados covalentemente por meio de uma ou mais ligações que não são uma ligação fosfodiéster.

[00298] Em algumas modalidades, o trRNA pode compreender toda ou uma porção de uma sequência de trRNA derivada de um sistema CRISPR/Cas de ocorrência natural. Em algumas modalidades, o trRNA compreende um trRNA do tipo selvagem truncado ou modificado. O comprimento do trRNA depende do sistema CRISPR/Cas usado. Em algumas modalidades, o trRNA compreende ou consiste em 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ou mais de 100 nucleotídeos. Em algumas modalidades, o trRNA pode compreender certas estruturas secundárias, como, por exemplo, uma ou mais estruturas em gancho de cabelo ou em haste ou em uma ou mais estruturas de abaulamento.

[00299] Em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo um ou mais RNAs guia compreendendo uma sequência guia de qualquer uma das SEQ ID NOs: 5-82.

[00300] Em um aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo um gRNA que compreende uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90 % idêntica a qualquer um dos ácidos nucleicos das SEQ ID NOs: 5-82.

[00301] Em outras modalidades, a composição compreende pelo menos um, por exemplo, pelo menos dois gRNAs compreendendo sequências guia selecionadas de qualquer duas ou mais das sequências guia das SEQ ID NOs: 5-82. Em algumas modalidades, a composição compreende pelo menos dois gRNAs, cada um compreendendo uma sequência guia de pelo menos 99%, 98%, 97%,

96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a qualquer um dos ácidos nucleicos das SEQ ID NOs: 5-82.

[00302] Em algumas modalidades, o gRNA é um sgRNA compreendendo qualquer uma das sequências mostradas na Tabela 2 (SEQ ID Nos. 87-124). Em algumas modalidades, o gRNA é um sgRNA compreendendo qualquer uma das sequências mostradas na Tabela 2 (SEQ ID Nos. 87-124, mas sem as modificações mostradas (isto é, SEQ ID Nos. 87-124 não modificadas)). Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma sequência que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a qualquer um dos ácidos nucleicos das SEQ ID Nos. 87-124. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende uma sequência que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a qualquer um dos ácidos nucleicos das SEQ ID Nos. 87-124, mas sem as modificações mostradas (isto é, SEQ ID Nos. 87-124 não modificadas). Em algumas modalidades, o sgRNA compreende qualquer uma das sequências guia mostradas na Tabela 1 no lugar das sequências guia mostradas nas sequências sgRNA da Tabela 2 nas SEQ ID Nos: 87-124, com ou sem as modificações.

[00303] As composições de RNA guia da presente invenção são projetadas para reconhecer (por exemplo, hibridizar com) uma sequência alvo no gene *TTR*. Por exemplo, a sequência alvo de *TTR* pode ser reconhecida e clivada por uma Cas clivase fornecida compreendendo um RNA guia. Em algumas modalidades, um agente de ligação a DNA guiado por RNA, como uma Cas cleavase, pode ser direcionado por um RNA guia para uma sequência alvo do gene *TTR*, em que a sequência guia do RNA guia hibrida com a sequência alvo e o agente de ligação ao DNA guiado por RNA, como uma Cas clivase, cliva a sequência alvo.

[00304] Em algumas modalidades, a seleção de um ou mais RNAs

guia é determinada com base nas sequências alvo dentro do gene *TTR*. [00305] Sem estar vinculado a nenhuma teoria em particular, mutações (por exemplo, mutações de deslocamento de quadro resultantes de indels que ocorrem como resultado de um DSB mediado por nuclease) em certas regiões do gene podem ser menos toleráveis do que mutações em outras regiões do gene, portanto, a localização de um DSB é um fator importante na quantidade ou tipo de knockdown de proteína que pode resultar. Em algumas modalidades, um gRNA complementar ou com complementaridade com uma sequência alvo dentro de *TTR* é usado para direcionar o agente de ligação ao DNA guiado por RNA para um local específico no gene *TTR*. Em algumas modalidades, os gRNAs são projetados para ter sequências guia que são complementares ou têm complementaridade para sequências alvo no éxon 1, éxon 2, éxon 3 ou éxon 4 de *TTR*.

[00306] Em algumas modalidades, a sequência guia é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência alvo presente no gene *TTR* humano. Em algumas modalidades, a sequência alvo pode ser complementar à sequência guia do RNA guia. Em algumas modalidades, o grau de complementaridade ou identidade entre uma sequência guia de um RNA guia e sua sequência alvo correspondente pode ser de pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%. Em algumas modalidades, a sequência alvo e a sequência guia do gRNA podem ser 100% complementares ou idênticas. Em outras modalidades, a sequência alvo e a sequência guia do gRNA podem conter pelo menos uma incompatibilidade. Por exemplo, a sequência alvo e a sequência guia do gRNA podem conter 1, 2, 3 ou 4 incompatibilidades, em que o comprimento total da sequência guia é 20. Em algumas modalidades, a sequência alvo e a sequência guia do gRNA podem conter 1-4 incompatibilidades, onde a sequência guia é de 20 nucleotídeos.

[00307] Em algumas modalidades, uma composição ou formulação aqui divulgada compreende um mRNA compreendendo um quadro de leitura aberto (ORF) que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease, como aqui descrito. Em algumas modalidades, um mRNA compreendendo um ORF que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease, é fornecido, usado ou administrado.

[00308] Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA é uma Cas nuclease Classe 2. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA possui atividade de clivase, que também pode ser referida como atividade de endonuclease de fita dupla. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende uma Cas nuclease, como uma Cas nuclease Classe 2 (que pode ser, por exemplo, uma Cas nuclease do Tipo II, V ou VI). As Cas nucleases Classe 2 incluem, por exemplo, proteínas Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 e C2c3 e modificações das mesmas. Exemplos de nucleases Cas9 incluem aquelas dos sistemas CRISPR do tipo II de *S. pyogenes*, *S. aureus* e outros procariontes (ver, por exemplo, a lista no próximo parágrafo) e versões modificadas (por exemplo, engenheiradas ou mutantes). Ver, por exemplo, US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1. Outros exemplos de Cas nucleases incluem um complexo Csm ou Cmr de um sistema CRISPR do tipo III ou a subunidade Cas10, Csm1 ou Cmr2 do mesmo; e um complexo Cascade de um sistema CRISPR do tipo I ou a sua subunidade Cas3 do mesmo. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ser de um sistema Tipo IIA, Tipo IIB ou Tipo IIC. Para discussão de vários sistemas CRISPR e Cas nucleases, ver, por exemplo, Makarova *et al.*, NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova *et al.*, NAT. REV. MICROBIOL, 13: 722-36 (2015); Shmakov *et al.*, MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015).

[00309] As espécies exemplificativas não limitativas das quais a Cas nuclease pode ser derivada incluem *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus gasseri*, *Francisella novicida*, *Wolinella succinogenes*, *Sutterella wadsworthensis*, *Gammaproteobacterium*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Fibrobacter succinogene*, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Treponema denticola*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas sp.*, *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus sp.*, *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor becscii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finegoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter sp.*, *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc sp.*, *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira sp.*, *Lyngbya sp.*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria sp.*, *Petrotoga mobilis*, *Thermosipho africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, *Acidaminococcus sp.*, *Lachnospiraceae bacterium ND2006*, e *Acaryochloris marina*.

[00310] Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cas9 nuclease de *Streptococcus pyogenes*. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cas9 nuclease de *Streptococcus thermophilus*. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cas9 nuclease de *Neisseria meningitidis*. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cas9 nuclease de *Staphylococcus aureus*. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cpf1 nuclease de *Francisella novicida*. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cpf1 nuclease de *Acidaminococcus* sp. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cpf1 nuclease de *Lachnospiraceae* bacterium ND2006. Em outras modalidades, a Cas nuclease é a Cpf1 nuclease de *Francisella tularensis*, *Lachnospiraceae* bacterium, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, ou *Porphyromonas macacae*. Em certas modalidades, a Cas nuclease é uma Cpf1 nuclease de um *Acidaminococcus* ou *Lachnospiraceae*.

[00311] Cas9 do tipo selvagem possui dois domínios de nuclease: RuvC e HNH. O domínio RuvC cliva a fita de DNA não alvo, e o domínio HNH cliva a fita alvo de DNA. Em algumas modalidades, a Cas9 nuclease compreende mais de um domínio RuvC e/ou mais de um domínio HNH. Em algumas modalidades, a nuclease Cas9 é uma Cas9 do tipo selvagem. Em algumas modalidades, a Cas9 é capaz de induzir uma quebra de fita dupla no DNA alvo. Em certas modalidades, a Cas nuclease pode clivar dsDNA, pode clivar uma fita de dsDNA ou pode não ter atividade de clivase ou nickase de DNA. Uma sequência de aminoácidos Cas9 exemplificativa é fornecida como SEQ ID NO: 203. Uma sequência ORF de mRNA de Cas9 exemplificativa, que inclui códons de início e parada, é fornecida como SEQ ID NO: 204. Uma sequência de codificação de mRNA de Cas9 exemplificativa, adequada

para inclusão em uma proteína de fusão, é fornecida como SEQ ID NO: 210.

[00312] Em algumas modalidades, são utilizadas Cas nucleases quiméricas, em que 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 Cas nuclease pode ser uma nuclease modificada.

[00313] Em outras modalidades, a Cas nuclease pode ser de um sistema CRISPR/Cas de Tipo I. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ser um componente do complexo Cascade de um sistema CRISPR/Cas Tipo I. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ser uma proteína Cas3. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ser de um sistema CRISPR/Cas de Tipo III. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ter uma atividade de clivagem de RNA.

[00314] Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA possui atividade de nickase de fita única, isto é, pode cortar uma fita de DNA para produzir uma quebra de fita única, também conhecida como "corte". Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende uma Cas nickase. Uma nickase é uma enzima que cria um corte no dsDNA, isto é, corta uma fita, mas não a outra da dupla hélice do DNA. Em algumas modalidades, uma Cas nickase é uma versão de uma Cas nuclease (por exemplo, uma Cas nuclease discutida acima) na qual um sítio ativo endonucleolítico é inativado, por exemplo, por uma ou mais alterações (por exemplo, mutações pontuais) em um domínio catalítico. Ver, por exemplo, Patente US 8.889.356 para discussão de Cas nickases e alterações exemplificativas no domínio catalítico. Em algumas modalidades, uma Cas nickase como uma Cas9 nickase tem um domínio RuvC ou HNH

inativado. Uma sequência de aminoácidos Cas9 nickase exemplificativa é fornecida como SEQ ID NO: 206. Uma sequência ORF de mRNA de Cas9 nickase exemplificativa, que inclui códons de início e parada, é fornecida como SEQ ID NO: 207. Uma sequência de codificação de mRNA de Cas9 nickase exemplificativa, adequada para inclusão em uma proteína de fusão, é fornecida como SEQ ID NO: 211.

[00315] Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA é modificado para conter apenas um domínio de nuclease funcional. Por exemplo, a proteína do agente pode ser modificada de modo que um dos domínios da nuclease seja mutado ou completamente ou parcialmente excluído para reduzir sua atividade de clivagem de ácido nucleico. Em algumas modalidades, uma nickase é usada tendo um domínio RuvC com atividade reduzida. Em algumas modalidades, uma nickase é usada tendo um domínio RuvC inativo. Em algumas modalidades, uma nickase é usada tendo um domínio HNH com atividade reduzida. Em algumas modalidades, uma nickase é usada tendo um domínio HNH inativo.

[00316] Em algumas modalidades, um aminoácido conservado dentro de um domínio de nuclease da proteína Cas é substituído para reduzir ou alterar a atividade da nuclease. Em algumas modalidades, uma Cas nuclease pode compreender uma substituição de aminoácidos no domínio da RuvC nuclease ou semelhante a RuvC. Substituições de aminoácidos exemplificativas no domínio da RuvC nuclease ou semelhante a RuvC incluem D10A (com base na proteína Cas9 de *S. pyogenes*). *Ver, por exemplo, Zetsche et al. (2015) Cell Oct 22:163(3): 759-771.* Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode compreender uma substituição de aminoácidos no domínio da HNH nuclease ou semelhante a HNH. Substituições de aminoácidos exemplificativos no domínio da HNH nuclease ou semelhante a HNH incluem E762A, H840A, N863A, H983A e D986A (com base na proteína Cas9 de *S.*

*pyogenes*). Ver, por exemplo, Zetsche et al. (2015). Outras substituições de aminoácidos exemplificativas incluem D917A, E1006A e D1255A (com base na sequência de *Francisella novicida* U112 Cpf1 (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1\_FRATN)).

[00317] Em algumas modalidades, um mRNA que codifica uma nickase é fornecido em combinação com um par de RNAs guia que são complementares às fitas de sentido e antissentido da sequência alvo, respectivamente. Nesta modalidade, os RNAs guia direcionam a nickase para uma sequência alvo e introduzem um DSB gerando um nick em fitas opostas da sequência alvo (isto é, duplo corte). Em algumas modalidades, o uso de duplo corte pode melhorar a especificidade e reduzir os efeitos fora do alvo. Em algumas modalidades, uma nickase é usada junto com dois RNAs guia separados, direcionando fitas opostas de DNA, para produzir um corte duplo no DNA alvo. Em algumas modalidades, uma nickase é usada junto com dois RNAs guia separados que são selecionados para estarem próximos para produzir um corte duplo no DNA alvo.

[00318] Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA carece de atividade de clivase e nickase. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende um polipeptídeo de ligação ao DNA de dCas. Um polipeptídeo dCas possui atividade de ligação ao DNA, enquanto essencialmente carece de atividade catalítica (clivase/nickase). Em algumas modalidades, o polipeptídeo dCas é um polipeptídeo dCas9. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA sem atividade de clivase e nickase ou o polipeptídeo de ligação a dCas é uma versão de uma nuclease Cas (por exemplo, uma nuclease Cas discutida acima) na qual seus sítios ativos endonucleolíticos são inativados, por exemplo, por uma ou mais alterações (por exemplo, mutações pontuais) em seus domínios catalíticos. Ver, por exemplo, US 2014/0186958 A1; US

2015/0166980 A1. Uma sequência de aminoácidos dCas9 exemplificativa é fornecida como SEQ ID NO: 208. Uma sequência ORF de mRNA de dCas9 exemplificativa, que inclui códons de início e parada, é fornecida como SEQ ID NO: 209. Uma sequência de codificação de mRNA de dCas9 exemplificativa, adequada para inclusão em uma proteína de fusão, é fornecida como SEQ ID NO: 212.

[00319] Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende um ou mais domínios funcionais heterólogos (por exemplo, é ou compreende um polipeptídeo de fusão).

[00320] Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode facilitar o transporte do agente de ligação ao DNA guiado por RNA para o núcleo de uma célula. Por exemplo, o domínio funcional heterólogo pode ser um sinal de localização nuclear (NLS). Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com 1-10 NLS(s). Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com 1-5 NLS(s). Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com um NLS. Quando um NLS é usado, o NLS pode ser ligado no N-terminal ou no C-terminal da sequência do agente de ligação ao DNA guiada por RNA. Também pode ser inserido na sequência do agente de ligação ao DNA guiado por RNA. Em outras modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com mais de um NLS. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com 2, 3, 4 ou 5 NLSs. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com dois NLSs. Em certas circunstâncias, os dois NLSs podem ser os mesmos (*por exemplo*, dois SV40 NLSs) ou diferentes. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA é fundido a duas sequências SV40 NLS ligadas no terminal carboxi. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA

guiado por RNA pode ser fundido com dois NLSs, um ligado no N-terminal e um no C-terminal. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com 3 NLSs. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com nenhum NLS. Em algumas modalidades, o NLS pode ser uma sequência monopartida, como, *por exemplo*, o SV40 NLS, PKKKRKV (SEQ ID NO: 274) ou PKKKRRV (SEQ ID NO: 275). Em algumas modalidades, o NLS pode ser uma sequência bipartida, como o NLS da nucleoplasmina, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 276). Numa modalidade específica, um único PKKKRKV (SEQ ID NO: 274) NLS pode ser ligado no C-terminal do agente de ligação ao DNA guiado por RNA. Um ou mais ligantes são opcionalmente incluídos no sítio de fusão.

[00321] Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode ser capaz de modificar a meia-vida intracelular do agente de ligação ao DNA guiado por RNA. Em algumas modalidades, a meia-vida do agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser aumentada. Em algumas modalidades, a meia-vida do agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser reduzida. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode ser capaz de aumentar a estabilidade do agente de ligação ao DNA guiado por RNA. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode ser capaz de reduzir a estabilidade do agente de ligação ao DNA guiado por RNA. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode atuar como um peptídeo sinal para degradação de proteínas. Em algumas modalidades, a degradação de proteínas pode ser mediada por enzimas proteolíticas, como, *por exemplo*, proteassomas, proteases lisossômicas ou proteases de calpaína. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode compreender uma sequência PEST. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA

pode ser modificado pela adição de ubiquitina ou uma cadeia de polubiquitina. Em algumas modalidades, a ubiquitina pode ser uma proteína do tipo ubiquitina (UBL). Exemplos não limitativos de proteínas do tipo ubiquitina incluem modificador pequeno do tipo ubiquitina (SUMO), proteína reativa cruzada da ubiquitina (UCRP, também conhecida como gene 15 estimulado por interferon-15 (ISG15)), modificador-1 relacionado à ubiquitina (URM1), proteína-8 desregulada no desenvolvimento expressa em células precursoras dos neurônios (NEDD8, também chamada Rub1 em *S. cerevisiae*), associada ao antígeno leucocitário humano F (FAT10), autofagia-8 (ATG8) e -12 (ATG12), proteína semelhante a Fau ubiquitina (FUB1), UBL ancorado na membrana (MUB), modificador de dobra de ubiquitina-1 (UFM1) e proteína-5 semelhante à ubiquitina (UBL5).

[00322] Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode ser um domínio marcador. Exemplos não limitativos de domínios marcadores incluem proteínas fluorescentes, marcadores de purificação, marcadores de epítomos e sequências de genes repórteres. Em algumas modalidades, o domínio marcador pode ser uma proteína fluorescente. Exemplos não limitativos de proteínas fluorescentes adequadas incluem proteínas fluorescentes verdes (*por exemplo*, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Esmeralda, Verde Azami, Verde Azami Monomérico, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), proteínas fluorescentes amarelas (*por exemplo*, YFP, EYFP, Citrina, Vênus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), proteínas fluorescentes azuis (*por exemplo*, EBFP, EBFP2, Azurita, mKalamal, GFPuv, Safira, Safira-T), proteínas fluorescentes cianas (*por exemplo*, ECFP, cerúleo, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), proteínas fluorescentes vermelhas (*por exemplo*, mKate, mKate2, mPlum, monômero DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-monômero, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eRedberry2, mStrawberry, Jred) e proteínas fluorescentes

laranjas (mOrange, mKO, Kusabira-Orange, Komabira-Monomérica-Orange, mTangerina, tdTomato) ou qualquer outra proteína fluorescente adequada. Em outras modalidades, o domínio marcador pode ser uma etiqueta de purificação e/ou uma etiqueta de epítopo. Etiquetas exemplificativas não limitativas incluem glutathione-S-transferase (GST), proteína de ligação à quitina (CBP), proteína de ligação à maltose (MBP), tioredoxina (TRX), poli (NANP), etiqueta de purificação por afinidade em tandem (TAP), myc, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 8xHis, proteína transportadora de biotina carboxil (BCCP), poli-His e calmodulina. Genes repórter exemplificativos não limitativos incluem glutathione-S-transferase (GST), peroxidase de rábano silvestre (HRP), cloranfenicol acetiltransferase (CAT), beta-galactosidase, beta-glucuronidase, luciferase ou proteínas fluorescentes.

[00323] Em modalidades adicionais, o domínio funcional heterólogo pode direcionar o agente de ligação ao DNA guiado por RNA para uma organela, tipo de célula, tecido ou órgão específico. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode direcionar o agente de ligação ao DNA guiado por RNA para mitocôndrias.

[00324] Em outras modalidades, o domínio funcional heterólogo pode ser um domínio efetor. Quando o agente de ligação ao DNA guiado por RNA é direcionado para sua sequência alvo, por exemplo, quando uma Cas nuclease é direcionada para uma sequência alvo por um gRNA, o domínio efetor pode modificar ou afetar a sequência alvo. Em algumas modalidades, o domínio efetor pode ser escolhido a partir de um domínio de ligação de ácido nucleico, um domínio nuclease (por exemplo, um domínio nuclease não Cas), um domínio de modificação epigenética, um domínio de ativação transcricional ou um domínio repressor transcricional. Em algumas modalidades, o domínio funcional

heterólogo é uma nuclease, como uma nuclease FokI. Ver, por exemplo, Patente US 9.023.649. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo é um ativador ou repressor da transcrição. Ver, por exemplo, Qi *et al.*, "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression," *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera *et al.*, "RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors," *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali *et al.*, "CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering," *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert *et al.*, "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes," *Cell* 154:442-51 (2013). Como tal, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA torna-se essencialmente um fator de transcrição que pode ser direcionado para ligar uma sequência alvo desejada usando um RNA guia.

#### **B. gRNAs e mRNAs modificados**

[00325] Em algumas modalidades, o gRNA é quimicamente modificado. Um gRNA que compreende um ou mais nucleosídeos ou nucleotídeos modificados é chamado de gRNA "modificado" ou gRNA "quimicamente modificado" para descrever a presença de um ou mais componentes ou configurações de ocorrência natural e não natural que são usados em vez de ou em além dos resíduos canônicos A, G, C e U. Em algumas modalidades, um gRNA modificado é sintetizado com um nucleosídeo ou nucleotídeo não canônico, é aqui chamado de "modificado". Os nucleosídeos e nucleotídeos modificados podem incluir um ou mais de: (i) alteração, por exemplo, substituição, de um ou de ambos os oxigênios de fosfato não ligados e/ou de um ou mais dos oxigênios de fosfato de ligação na ligação da espinha dorsal fosfodiéster (uma modificação de espinha dorsal exemplificativa); (ii) alteração, por exemplo, substituição, de um constituinte do açúcar ribose, por exemplo, do 2' hidroxila no açúcar ribose (uma modificação exemplar no

açúcar); (iii) substituição por atacado da fração fosfato por ligantes "desfosfo" (uma modificação exemplificativa da espinha dorsal); (iv) modificação ou substituição de uma nucleobase de ocorrência natural, incluindo uma nucleobase não canônica (uma modificação de base exemplificativa); (v) substituição ou modificação da espinha dorsal ribose-fosfato (uma modificação exemplificativa da espinha dorsal); (vi) modificação da extremidade 3' ou da extremidade 5' do oligonucleotídeo, por exemplo, remoção, modificação ou substituição de um grupo fosfato terminal ou conjugação de uma fração, capeamento ou ligante (tais modificações de capeamento 3' ou 5' podem compreender uma modificação de açúcar e/ou espinha dorsal); e (vii) modificação ou substituição do açúcar (uma modificação exemplificativa do açúcar).

[00326] Como observado acima, em algumas modalidades, uma composição ou formulação aqui divulgada compreende um mRNA compreendendo um quadro de leitura aberto (ORF) que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease, como aqui descrito. Em algumas modalidades, um mRNA compreendendo um ORF que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease, é fornecido, usado ou administrado. Em algumas modalidades, o ORF que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA é um "agente de ligação a DNA guiado por RNA modificado" ou simplesmente um "ORF modificado", que é usado como abreviação para indicar que o ORF é modificado em uma ou mais das seguintes maneiras: (1) o ORF modificado tem um teor de uridina que varia de seu teor mínimo de uridina a 150% do teor mínimo de uridina; (2) o ORF modificado tem um teor de dinucleotídeo de uridina que varia do seu teor mínimo de dinucleotídeo de uridina a 150% do teor mínimo de dinucleotídeo de uridina; (3) o ORF modificado possui pelo menos 90% de identidade com qualquer uma de SEQ ID

NOs: 201, 204, 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 ou 266; (4) o ORF modificado consiste em um conjunto de códons dos quais pelo menos 75% dos códons são códons listados na Tabela 3A dos códons mínimos de uridina; ou (5) o ORF modificado compreende pelo menos uma uridina modificada. Em algumas modalidades, o ORF modificado é modificada em pelo menos duas, três ou quatro das formas anteriores. Em algumas modalidades, o ORF modificado compreende pelo menos uma uridina modificada e é modificado em pelo menos um, dois, três ou todos os itens (1) - (4) acima.

**Tabela 3A dos Códons Mínimos de Uridina**

	Aminoácido	Códon mínimo de uridina
A	Alanina	GCA ou GCC ou GCG
G	Glicina	GGA ou GGC ou GGG
V	Valina	GUC ou GUA ou GUG
D	Ácido aspártico	GAC
E	Ácido glutâmico	GAA ou GAG
I	Isoleucina	AUC ou AUA
T	Treonina	ACA ou ACC ou ACG
N	Asparagina	AAC
K	Lisina	AAG ou AAA
S	Serina	AGC
R	Arginina	AGA ou AGG
L	Leucina	CUG ou CUA ou CUC
P	Prolina	CCG ou CCA ou CCC
H	Histidina	CAC
Q	Glutamina	CAG ou CAA
F	Fenilalanina	UUC
Y	Tirosina	UAC
C	Cisteína	UGC
W	Triptofano	UGG
M	Metionina	AUG

[00327] Em qualquer uma das modalidades anteriores, o ORF modificado pode consistir em um conjunto de códons dos quais pelo

menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% dos códons são códons listados na Tabela 3A mostrando os Códons Mínimos de Uridina.

[00328] Em qualquer uma das modalidades anteriores, o ORF modificado pode compreender uma sequência com pelo menos 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% de identidade com qualquer uma das SEQ ID NO: 201, 204, 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 ou 266.

[00329] Em qualquer uma das modalidades anteriores, o ORF modificado pode ter um teor de uridina que varia de seu teor mínimo de uridina a 150%, 145%, 140%, 135%, 130%, 125%, 120%, 115%, 110%, 105%, 104%, 103%, 102% ou 101% do teor mínimo de uridina.

[00330] Em qualquer uma das modalidades anteriores, o ORF modificado pode ter um teor de dinucleotídeo de uridina que varia de seu teor mínimo de dinucleotídeo de uridina a 150%, 145%, 140%, 135%, 130%, 125%, 120%, 115%, 110%, 105%, 104%, 103%, 102% ou 101% do teor mínimo de dinucleotídeo de uridina.

[00331] Em qualquer uma das modalidades anteriores, o ORF modificado pode compreender uma uridina modificada pelo menos em uma, uma pluralidade de, ou todas as posições de uridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é uma uridina modificada na posição 5, por exemplo, com um halogênio, metil ou etil. Em algumas modalidades, a uridina modificada é uma pseudouridina modificada na posição 1, por exemplo, com um halogênio, metil ou etil. A uridina modificada pode ser, por exemplo, pseudouridina, N1-metil-pseudouridina, 5-metoxiuridina, 5-iodouridina ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a uridina modificada é 5-metoxiuridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é 5-iodouridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é pseudouridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é N1-metil-pseudouridina. Em algumas modalidades, a uridina modificada é

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

[00332] Em algumas modalidades, pelo menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 100% das posições de uridina em um mRNA de acordo com a divulgação são uridinas modificadas. Em algumas modalidades, 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95%, ou 90-100% das posições de uridina em um mRNA de acordo com a divulgação são uridinas modificadas, por exemplo, 5-metoxiuridina, 5-iodouridina, N1-metil pseudouridina, pseudouridina ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95%, ou 90-100% das posições de uridina em um mRNA de acordo com a divulgação são 5-metoxiuridina. Em algumas modalidades, 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95%, ou 90-100% das posições de uridina em um mRNA de acordo com a divulgação são pseudouridina. Em algumas modalidades, 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95%, ou 90-100% das posições de uridina em um mRNA de acordo com a divulgação são N1-metil pseudouridina. Em algumas modalidades, 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95%, ou 90-100% das posições de uridina em um mRNA de acordo com a divulgação são 5-iodouridina. Em

algumas modalidades, 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95%, ou 90-100% das posições de uridina em um mRNA de acordo com a divulgação são 5-metoxiuridina e o restante é N1-metil pseudouridina. Em algumas modalidades, 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95%, ou 90-100% das posições de uridina em um mRNA de acordo com a divulgação são 5-iodouridina e o restante é N1-metil pseudouridina.

[00333] Em algumas modalidades, o mRNA compreende pelo menos uma UTR de um mRNA de mamífero expresso, como um mRNA expresso constitutivamente. Um mRNA é considerado constitutivamente expresso em um mamífero se for continuamente transcrito em pelo menos um tecido de um mamífero adulto saudável. Em algumas modalidades, o mRNA compreende um 5' UTR, 3' UTR ou 5' e 3' UTRs a partir de um RNA de mamífero expresso, tal como um mRNA de mamífero expresso constitutivamente. O mRNA da actina é um exemplo de um mRNA expresso constitutivamente.

[00334] Em algumas modalidades, o mRNA compreende pelo menos uma UTR da hidroxisteroide 17-beta desidrogenase 4 (HSD17B4 ou HSD), por exemplo, uma UTR de 5' da HSD. Em algumas modalidades, o mRNA compreende pelo menos uma UTR de um mRNA de globina, por exemplo, mRNA de alfa globina humana (HBA), mRNA de beta globina humana (HBB) ou mRNA de *Xenopus laevis* beta globina (XBG). Em algumas modalidades, o mRNA compreende um 5' UTR, 3' UTR ou 5' e 3' UTRs de um mRNA de globina, como HBA, HBB ou XBG. Em algumas modalidades, o mRNA compreende uma UTR 5' do hormônio de crescimento bovino, citomegalovírus (CMV), Hba-a1 de camundongo, HSD, um gene da albumina, HBA, HBB ou XBG. Em algumas modalidades, o mRNA compreende uma UTR 3' do hormônio de crescimento bovino, citomegalovírus, Hba-a1 de camundongo, HSD, um gene de albumina, HBA, HBB ou XBG. Em algumas modalidades, o

mRNA compreende UTRs 5' e 3' do hormônio de crescimento bovino, citomegalovírus, Hba-a1 de camundongo, HSD, um gene da albumina, HBA, HBB, XBG, proteína de choque térmico 90 (Hsp90), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), beta-actina, alfa-tubulina, proteína tumoral (p53) ou receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR).

[00335] Em algumas modalidades, o mRNA compreende UTRs 5' e 3' que são da mesma fonte, por exemplo, um mRNA expressado constitutivamente como actina, albumina ou globina como HBA, HBB ou XBG.

[00336] Em algumas modalidades, o mRNA não compreende uma UTR 5', por exemplo, não há nucleotídeos adicionais entre o capeamento 5' e o códon de partida. Em algumas modalidades, o mRNA compreende uma sequência de Kozak (descrita abaixo) entre o capeamento 5' e o códon de início, mas não possui nenhuma UTR 5' adicional. Em algumas modalidades, o mRNA não compreende uma UTR 3', por exemplo, não há nucleotídeos adicionais entre o códon de parada e a cauda poli-A.

[00337] Em algumas modalidades, o mRNA compreende uma sequência de Kozak. A sequência de Kozak pode afetar o início da tradução e o rendimento geral de um polipeptídeo traduzido de um mRNA. Uma sequência de Kozak inclui um códon de metionina que pode funcionar como o códon de início. Uma sequência de Kozak mínima é NNNRUGN em que pelo menos um dos seguintes é verdadeiro: o primeiro N é A ou G e o segundo N é G. No contexto de uma sequência nucleotídica, R significa uma purina (A ou G). Em algumas modalidades, a sequência de Kozak é RNNRUGN, NNNRUGG, RNNRUGG, RNNAUGN, NNNAUGG, ou RNNAUGG. Em algumas modalidades, a sequência de Kozak é rccRUGg com zero incompatibilidades ou com até uma ou duas incompatibilidades para posições em minúsculas. Em algumas modalidades, a sequência de

Kozak é rccAUGg com zero incompatibilidades ou com até uma ou duas incompatibilidades para posições em minúsculas. Em algumas modalidades, a sequência Kozak é gccRccAUGG (SEQ ID NO: 277) com zero incompatibilidades ou com até uma, duas ou três incompatibilidades para posições em minúsculas. Em algumas modalidades, a sequência de Kozak é gccAccAUG com zero incompatibilidades ou com até uma, duas, três ou quatro incompatibilidades para posições em minúsculas. Em algumas modalidades, a sequência de Kozak é GCCACCAUG. Em algumas modalidades, a sequência Kozak é gccgccRccAUGG (SEQ ID NO: 278) com zero incompatibilidades ou com até uma, duas, três ou quatro incompatibilidades para posições em minúsculas.

[00338] Em algumas modalidades, o mRNA que compreende um ORF que codifica um agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende uma sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 1, opcionalmente em que o ORF da SEQ ID NO: 1 (isto é, SEQ ID NO: 204) é substituído por um ORF alternativo de qualquer uma das SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 ou 266.

[00339] Em algumas modalidades, o mRNA que compreende um ORF que codifica um agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende uma sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 244, opcionalmente em que o ORF da SEQ ID NO: 244 (isto é, SEQ ID NO: 204) é substituído por um ORF alternativo de qualquer uma das SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 ou 266.

[00340] Em algumas modalidades, o mRNA que compreende um ORF que codifica um agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende uma sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 256, opcionalmente em que o ORF da SEQ ID NO: 256 (isto é, SEQ ID NO: 204) é substituído por um ORF alternativo de

qualquer uma das SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 ou 266.

[00341] Em algumas modalidades, o mRNA que compreende um ORF que codifica um agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende uma sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 257, opcionalmente em que o ORF da SEQ ID NO: 257 (isto é, SEQ ID NO: 204) é substituído por um ORF alternativo de qualquer uma das SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 ou 266.

[00342] Em algumas modalidades, o mRNA que compreende um ORF que codifica um agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende uma sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 257, opcionalmente em que o ORF da SEQ ID NO: 258 (isto é, SEQ ID NO: 204) é substituído por um ORF alternativo de qualquer uma das SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 ou 266.

[00343] Em algumas modalidades, o mRNA que compreende um ORF que codifica um agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende uma sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 259, opcionalmente em que o ORF da SEQ ID NO: 259 (isto é, SEQ ID NO: 204) é substituído por um ORF alternativo de qualquer uma das SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 ou 266.

[00344] Em algumas modalidades, o mRNA que compreende um ORF que codifica um agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende uma sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 260, opcionalmente em que o ORF da SEQ ID NO: 260 (isto é, SEQ ID NO: 204) é substituído por um ORF alternativo de qualquer uma das SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 ou 266.

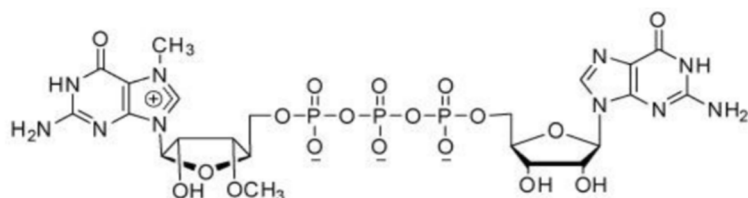
[00345] Em algumas modalidades, o mRNA que compreende um ORF que codifica um agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende uma sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 261, opcionalmente em que o ORF da SEQ ID NO: 261 (isto é, SEQ ID NO: 204) é substituído por um ORF alternativo de qualquer uma das SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 ou 266.

[00346] Em algumas modalidades, o grau de identidade para as sequências opcionalmente substituídas das SEQ ID NOs 243, 244 ou 256-261 é de 95%. Em algumas modalidades, o grau de identidade para as sequências opcionalmente substituídas das SEQ ID NOs 243, 244 ou 256-261 é de 98%. Em algumas modalidades, o grau de identidade para as sequências opcionalmente substituídas das SEQ ID NOs 243, 244 ou 256-261 é de 99%. Em algumas modalidades, o grau de identidade para as sequências opcionalmente substituídas das SEQ ID NOs 243, 244 ou 256-261 é de 100%.

[00347] Em algumas modalidades, um mRNA divulgado neste documento compreende um capeamento 5', como um Cap0, Cap1 ou Cap2. Um capeamento 5' é geralmente um ribonucleotídeo de 7-metilguanina (que pode ser adicionalmente modificado, conforme discutido abaixo, por exemplo, com relação ao ARCA) ligado através de um 5'-trifosfato à posição 5' do primeiro nucleotídeo da cadeia 5'-a-3' do mRNA, isto é, o primeiro nucleotídeo cap-proximal. No Cap0, as riboses do primeiro e do segundo nucleotídeos cap-proximais do mRNA compreendem um 2'-hidroxila. No Cap1, as riboses do primeiro e do segundo nucleotídeos transcritos do mRNA compreendem um 2'-metoxi e um 2'-hidroxil, respectivamente. No Cap2, as riboses do primeiro e do segundo nucleotídeos cap-proximais do mRNA compreendem um 2'-metoxi. Ver, por exemplo, Katibah *et al.* (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30; Abbas *et al.* (2017) *Proc Natl Acad Sci USA*

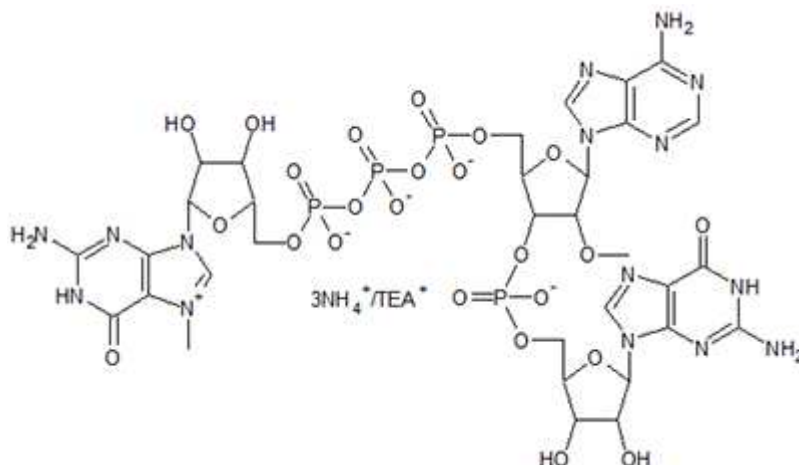
114(11):E2106-E2115. A maioria dos mRNAs eucarióticos endógenos superiores, incluindo os mRNAs de mamíferos, como os mRNAs humanos, compreendem Cap1 ou Cap2. Cap0 e outras estruturas de capeamento diferentes de Cap1 e Cap2 podem ser imunogênicas em mamíferos, como seres humanos, devido ao reconhecimento como "não próprio" por componentes do sistema imunológico inato, como IFIT-1 e IFIT-5, que podem resultar em níveis elevados de citocinas, incluindo interferon tipo I. Os componentes do sistema imunológico inato, como o IFIT-1 e o IFIT-5, também podem competir com o eIF4E pela ligação de um mRNA com um capeamento diferente de Cap1 ou Cap2, potencialmente inibindo a tradução do mRNA.

[00348] Um capeamento pode ser incluído cotranscricionalmente. Por exemplo, ARCA (análogo de capeamento antirreverso; Thermo Fisher Scientific Cat. Nº AM8045) é um análogo de capeamento que compreende um 7-metilguanina 3'-metoxi-5'-trifosfato ligado à posição 5' de um ribonucleotídeo de guanina que pode ser incorporado *in vitro* em um transcrito no início. O ARCA resulta em um capeamento Cap0 em que a posição 2' do primeiro nucleotídeo cap-proximal é hidroxila. Ver, por exemplo, Stepinski *et al.*, (2001) "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG," *RNA* 7: 1486–1495. A estrutura do ARCA é mostrada abaixo.



[00349] CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies Cat. Nº N-7113) ou CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies Cat. Nº N-7133) pode ser usado para fornecer uma estrutura Cap1 cotranscricionalmente. As versões 3'-O-metiladas de CleanCap™ AG e

CleanCap™ GG também estão disponíveis na TriLink Biotechnologies como Cat. Nos. N-7413 e N-7433, respectivamente. A estrutura CleanCap™ AG é mostrada abaixo.



[0001] Alternativamente, um capeamento pode ser adicionado a um RNA pós-transcricionalmente. Por exemplo, a enzima de capeamento Vaccinia está disponível comercialmente (New England Biolabs Cat. N° M2080S) e possui atividades de RNA trifosfatase e guanililtransferase, fornecidas por sua subunidade D1, e guanina metiltransferase, fornecidas por sua subunidade D12. Como tal, pode adicionar uma 7-metilguanina a um RNA, de modo a originar Cap0, na presença de S-adenosilmetionina e GTP. Ver, por exemplo, Guo, P. e Moss, B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4023-4027; Mao, X. and Shuman, S. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 24472-24479. Para uma discussão adicional das abordagens de capeamentos, ver, por exemplo, WO2017/053297 e Ishikawa *et al.*, *Nucl. Acids. Symp. Ser.* (2009) No. 53, 129-130.

[0002] Em algumas modalidades, o mRNA compreende ainda uma cauda poli-adenilada (poli-A). Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende pelo menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 adeninas, opcionalmente até 300 adeninas. Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 nucleotídeos de adenina. Em alguns casos, a cauda poli-A é "interrompida" com uma ou mais "âncoras" de nucleotídeos não adenina em um ou mais locais dentro da

cauda poli-A. As caudas poli-A podem compreender pelo menos 8 nucleotídeos de adenina consecutivos, mas também compreender um ou mais nucleotídeos não adenina. Como utilizado neste documento, "nucleotídeos não adenina" refere-se a nucleotídeos naturais ou não naturais que não compreendem adenina. Os nucleotídeos de guanina, timina e citosina são nucleotídeos não adenina exemplificativos. Assim, as caudas de poli-A no mRNA aqui descrito podem compreender nucleotídeos de adenina consecutivos localizados 3' a nucleotídeos que codificam um agente de ligação a DNA guiado por RNA ou uma sequência de interesse. Em alguns casos, as caudas poli-A no mRNA compreendem nucleotídeos de adenina não consecutivos localizados 3' para nucleotídeos que codificam um agente de ligação a DNA guiado por RNA ou uma sequência de interesse, em que nucleotídeos não adenina interrompem os nucleotídeos adenina em intervalos espaçados regular ou irregularmente.

[0003] Em algumas modalidades, o um ou mais nucleotídeos não adenina são posicionados para interromper os nucleotídeos adenina consecutivos, de modo que uma proteína de ligação a poli(A) possa se ligar a um trecho de nucleotídeos adenina consecutivos. Em algumas modalidades, um ou mais nucleotídeos não adenina estão localizados 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 adenina consecutivos. Em algumas modalidades, o um ou mais nucleotídeos não-adenina está localizado após pelo menos 8-100 nucleotídeos adenina consecutivos. Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina é após um, dois, três, quatro, cinco, seis ou sete nucleotídeos de adenina e é seguido por pelo menos 8 nucleotídeos adenina consecutivos.

[0004] A cauda poli-A pode compreender uma sequência de nucleotídeos de adenina consecutivos seguidos por um ou mais

nucleotídeos não adenina, opcionalmente seguidos por nucleotídeos adenina adicionais.

[0005] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina. Em algumas modalidades, o(s) nucleotídeo(s) não adenina estão localizados após pelo menos 8, 9, 10, 11 ou 12 nucleotídeos adenina consecutivos. Em alguns casos, o um ou mais nucleotídeos não adenina estão localizados após pelo menos 8-50 nucleotídeos adenina consecutivos. Em algumas modalidades, o 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 adenina consecutivos.

[0006] 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 citosina. Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina é um nucleotídeo timina. Em alguns casos, onde mais de um nucleotídeo não adenina está presente, o nucleotídeo não adenina pode ser selecionado de: a) nucleotídeos guanina e timina; b) nucleotídeos de guanina e citosina; c) nucleotídeos de timina e citosina; ou d) nucleotídeos de guanina, timina e citosina. Um exemplo de cauda poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina é fornecido como SEQ ID NO: 4.

[0007] Em algumas modalidades, o mRNA compreende ainda uma cauda poli-adenilada (poli-A). Em alguns casos, a cauda poli-A é "interrompida" com uma ou mais "âncoras" de nucleotídeos não adenina em um ou mais locais dentro da cauda poli-A. As caudas poli-A podem compreender pelo menos 8 nucleotídeos de adenina consecutivos, mas também compreender um ou mais nucleotídeos não adenina. Como

utilizado neste documento, "nucleotídeos não adenina" refere-se a nucleotídeos naturais ou não naturais que não compreendem adenina. Os nucleotídeos de guanina, timina e citosina são nucleotídeos não adenina exemplificativos. Assim, as caudas de poli-A no mRNA aqui descrito podem compreender nucleotídeos de adenina consecutivos localizados 3' a nucleotídeos que codificam um agente de ligação a DNA guiado por RNA ou uma sequência de interesse. Em alguns casos, as caudas poli-A no mRNA compreendem nucleotídeos de adenina não consecutivos localizados 3' para nucleotídeos que codificam um agente de ligação a DNA guiado por RNA ou uma sequência de interesse, em que nucleotídeos não adenina interrompem os nucleotídeos adenina em intervalos espaçados regular ou irregularmente.

[0008] Em algumas modalidades, o um ou mais nucleotídeos não adenina são posicionados para interromper os nucleotídeos adenina consecutivos, de modo que uma proteína de ligação a poli(A) possa se ligar a um trecho de nucleotídeos adenina consecutivos. Em algumas modalidades, um ou mais nucleotídeos não adenina estão localizados 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 adenina consecutivos. Em algumas modalidades, o um ou mais nucleotídeos não-adenina está localizado após pelo menos 8-100 nucleotídeos adenina consecutivos. Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina é após um, dois, três, quatro, cinco, seis ou sete nucleotídeos de adenina e é seguido por pelo menos 8 nucleotídeos adenina consecutivos.

[0009] 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 adenina adicionais.

[0010] Em algumas modalidades, a cauda poli-A compreende ou

contém um nucleotídeo não adenina ou um trecho consecutivo de 2-10 nucleotídeos não adenina. Em algumas modalidades, o(s) nucleotídeo(s) não adenina estão localizados após pelo menos 8, 9, 10, 11 ou 12 nucleotídeos adenina consecutivos. Em alguns casos, o um ou mais nucleotídeos não adenina estão localizados após pelo menos 8-50 nucleotídeos adenina consecutivos. Em algumas modalidades, o 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 adenina consecutivos.

[0011] 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 citosina. Em algumas modalidades, o nucleotídeo não adenina é um nucleotídeo timina. Em alguns casos, onde mais de um nucleotídeo não adenina está presente, o nucleotídeo não adenina pode ser selecionado de: a) nucleotídeos guanina e timina; b) nucleotídeos de guanina e citosina; c) nucleotídeos de timina e citosina; ou d) nucleotídeos de guanina, timina e citosina. Um exemplo de cauda poli-A compreendendo nucleotídeos não adenina é fornecido como SEQ ID NO: 4:  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAACCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAAAAAAAAAAAA.

[0012] Modificações químicas como as listadas acima podem ser combinadas para fornecer gRNAs e/ou mRNAs modificados que compreendem nucleosídeos e nucleotídeos (coletivamente "resíduos") que podem ter duas, três, quatro ou mais modificações. Por exemplo, um resíduo modificado pode ter um açúcar modificado e uma nucleobase modificada. Em algumas modalidades, todas as bases de

um gRNA são modificadas, *por exemplo*, todas as bases têm um grupo fosfato modificado, como um grupo fosforotioato. Em certas modalidades, todos ou substancialmente todos os grupos fosfato de uma molécula de gRNA são substituídos por grupos fosforotioato. Em algumas modalidades, os gRNAs modificados compreendem pelo menos um resíduo modificado na extremidade 5' do RNA ou próximo a ela. Em algumas modalidades, os gRNAs modificados compreendem pelo menos um resíduo modificado na extremidade 3' do RNA ou próximo a ela.

[0013] Em algumas modalidades, o gRNA compreende um, dois, três ou mais resíduos modificados. Em algumas modalidades, pelo menos 5% (*por exemplo*, pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou 100%) das posições em um gRNA modificado são nucleosídeos ou nucleotídeos modificados.

[0014] Os ácidos nucleicos não modificados podem ser propensos à degradação, *por exemplo*, nucleases intracelulares ou aquelas encontradas no soro. Por exemplo, as nucleases podem hidrolisar as ligações fosfodiéster do ácido nucleico. Por conseguinte, em um aspecto, os gRNAs aqui descritos podem conter um ou mais nucleosídeos ou nucleotídeos modificados, *por exemplo*, para introduzir estabilidade em relação a nucleases intracelulares ou baseadas em soro. Em algumas modalidades, as moléculas de gRNA modificado aqui descritas podem exibir uma resposta imune inata reduzida quando introduzidas em uma população de células, tanto *in vivo* quanto *ex vivo*. O termo "resposta imune inata" inclui uma resposta celular a ácidos nucleicos exógenos, incluindo ácidos nucleicos de fita simples, que

envolvem a indução da expressão e liberação de citocinas, particularmente os interferons, e a morte celular.

[0015] Em algumas modalidades de uma modificação da espinha dorsal, o grupo fosfato de um resíduo modificado pode ser modificado substituindo um ou mais dos oxigênios por um substituinte diferente. Além disso, o resíduo modificado, *por exemplo*, resíduo modificado presente em um ácido nucleico modificado, pode incluir a substituição por atacado de uma fração fosfato não modificada por um grupo fosfato modificado, como descrito aqui. Em algumas modalidades, a modificação de espinha dorsal da espinha dorsal de fosfato pode incluir alterações que resultam em um ligante não carregado ou um ligante carregado com distribuição de carga assimétrica.

[0016] Exemplos de grupos fosfato modificados incluem fosforotioato, fosforosselenatos, fosfatos de borano, ésteres de borano fosfato, fosfonatos de hidrogênio, fosforamidatos, fosfonatos de alquil ou aril e fosfotriésteres. O átomo de fósforo em um grupo fosfato não modificado é aquiral. No entanto, a substituição de um dos oxigênios sem ponte por um dos átomos ou grupos de átomos acima pode tornar o átomo de fósforo quiral. O átomo de fósforo estereogênico pode possuir a configuração "R" (aqui Rp) ou a configuração "S" (aqui Sp). A espinha dorsal também pode ser modificada pela substituição de um oxigênio em ponte (*isto é*, o oxigênio que liga o fosfato ao nucleosídeo), por nitrogênio (fosforamamidatos em ponte), enxofre (fosforotioatos em ponte) e carbono (metilenofosfonatos em ponte). A substituição pode ocorrer no oxigênio de ligação ou em ambos os oxigênio de ligação.

[0017] O grupo fosfato pode ser substituído por conectores que não contenham fósforo em certas modificações na espinha dorsal. Em algumas modalidades, o grupo fosfato carregado pode ser substituído por uma fração neutra. Exemplos de frações que podem substituir o grupo fosfato podem incluir, sem limitação, *por exemplo*, fosfonato de

metil, hidroxilamino, siloxano, carbonato, carboximetil, carbamato, amida, tioéter, ligante de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formalcetal, oxima, metilenoimino, metilenometilimino, metileno-hidrazo, metilenodimetil-hidrazo e metileno-oximetilimino.

[0018] Os andaimes que podem imitar ácidos nucleicos também podem ser construídos em que o ligante de fosfato e o açúcar ribose são substituídos por nucleosídeos ou substitutos de nucleotídeos resistentes à nuclease. Tais modificações podem compreender modificações na espinha dorsal e no açúcar. Em algumas modalidades, as nucleobases podem ser amarradas por uma espinha dorsal substituta. Os exemplos podem incluir, sem limitação, os substitutos de nucleosídeos de morfolino, ciclobutil, pirrolidina e ácido nucleico peptídico (PNA).

[0019] Os nucleosídeos modificados e nucleotídeos modificados podem incluir uma ou mais modificações no grupo açúcar, *isto é*, na modificação do açúcar. Por exemplo, o grupo 2' hidroxil(OH) pode ser modificado, *por exemplo*, substituído por vários substituintes "oxi" ou "desoxi" diferentes. Em algumas modalidades, modificações no grupo 2' hidroxila podem melhorar a estabilidade do ácido nucleico, uma vez que o hidroxila não pode mais ser desprotonado para formar um íon 2'-alcóxido.

[0020] Exemplos de modificações no grupo 2' hidroxila podem incluir alcoxi ou ariloxi (OR, em que "R" pode ser, *por exemplo*, alquil, cicloalquil, aril, aralquil, heteroaril ou açúcar); polietilenoglicóis (PEG),  $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$  em que R pode ser, *por exemplo*, H ou alquil opcionalmente substituído, e n pode ser um número inteiro de 0 a 20 (*por exemplo*, de 0 a 4, de 0 a 8, de 0 a 10, de 0 a 16, de 1 a 4, de 1 a 8, de 1 a 10, de 1 a 16, de 1 a 20, de 2 a 4, de 2 a 8, de 2 a 10, de 2 a 16, de 2 a 20, de 4 a 8, de 4 a 10, de 4 a 16 e de 4 a 20). Em algumas modalidades, a modificação do grupo 2' hidroxila pode ser 2'-O-Me. Em

algumas modalidades, a modificação do grupo 2' hidroxila pode ser uma modificação de 2'-fluoro, que substitui o grupo 2' hidroxila por um fluoreto. Em algumas modalidades, a modificação do grupo 2' hidroxila pode incluir ácidos nucleicos (bloqueados) (LNA) nos quais o 2' hidroxila pode ser conectado, *por exemplo*, por um C<sub>1-6</sub> alquilenos ou ponte de C<sub>1-6</sub> heteroalquilenos, ao carbono 4' do mesmo açúcar ribose, onde pontes exemplificativas podem incluir pontes metileno, propileno, éter ou amino; O-amino (em que amino pode ser, *por exemplo*, NH<sub>2</sub>; alquilamino, dialquilamino, heterociclil, arilamino, diarilamino, heteroarilamino ou di-heteroarilamino, etilenodiamina ou poliamino) e aminoalcoxi, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-amino, (em que amino pode ser, *por exemplo*, NH<sub>2</sub>; alquilamino, dialquilamino, heterociclil, arilamino, diarilamino, heteroarilamino ou di-heteroarilamino, etilenodiamina ou poliamino). Em algumas modalidades, a modificação do grupo 2' hidroxila pode incluir ácidos nucleicos "desbloqueados" (UNA) nos quais o anel ribose não possui a ligação C2'-C3'. Em algumas modalidades, a modificação do grupo 2' hidroxila pode incluir o grupo metoxietil (MOE), (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, *por exemplo*, um derivado de PEG).

[0021] Modificações "desoxi" 2' podem incluir hidrogênio (*isto é* açúcares desoxirribose, *por exemplo*, nas porções salientes do dsRNA parcialmente); halo (*por exemplo*, bromo, cloro, fluoro, ou iodo); amino (em que amino pode ser, *por exemplo*, NH<sub>2</sub>; alquilamino, dialquilamino, heterociclil, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, di-heteroarilamino ou aminoácido); NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- amino (em que amino pode ser, *por exemplo*, como descrito aqui), -NHC(O)R (em que R pode ser, *por exemplo*, alquil, cicloalquil, aril, aralquil, heteroaril ou açúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquil; tioalcoxi; e alquil, cicloalquil, aril, alquenil e alquinil, que podem ser opcionalmente substituídos por *por exemplo*, um amino como descrito aqui.

[0022] A modificação do açúcar pode compreender um grupo de

açúcar que também pode conter um ou mais carbonos que possuem a configuração estereoquímica oposta à do carbono correspondente na ribose. Assim, um ácido nucleico modificado pode incluir nucleotídeos contendo, *por exemplo*, arabinose, como açúcar. Os ácidos nucleicos modificados também podem incluir açúcares básicos. Esses açúcares abásicos também podem ser modificados ainda mais em um ou mais átomos de açúcar constituintes. Os ácidos nucleicos modificados também podem incluir um ou mais açúcares que estão na forma L, *por exemplo*, L-nucleosídeos.

[0023] Os nucleosídeos modificados e nucleotídeos modificados descritos aqui, que podem ser incorporados em um ácido nucleico modificado, podem incluir uma base modificada, também chamada de nucleobase. Exemplos de nucleobases incluem, mas não estão limitados a, adenina (A), guanina (G), citosina (C) e uracilo (U). Estas nucleobases podem ser modificadas ou totalmente substituídas para fornecer resíduos modificados que podem ser incorporados em ácidos nucleicos modificados. A nucleobase do nucleotídeo pode ser selecionada independentemente de uma purina, uma pirimidina, um análogo de purina ou análogo de pirimidina. Em algumas modalidades, a nucleobase pode incluir, por exemplo, derivados naturais e sintéticos de uma base.

[0024] Nas modalidades que empregam um RNA guia duplo, cada um dos crRNA e do RNA tracr pode conter modificações. Tais modificações podem estar em uma ou ambas as extremidades do RNAt crRNA e/ou tracr. Em modalidades compreendendo um sgRNA, um ou mais resíduos em uma ou nas duas extremidades do sgRNA podem ser quimicamente modificados ou o sgRNA inteiro pode ser quimicamente modificado. Certas modalidades compreendem uma modificação na extremidade 5'. Certas modalidades compreendem uma modificação na extremidade 3'. Em certas modalidades, um ou mais ou todos os

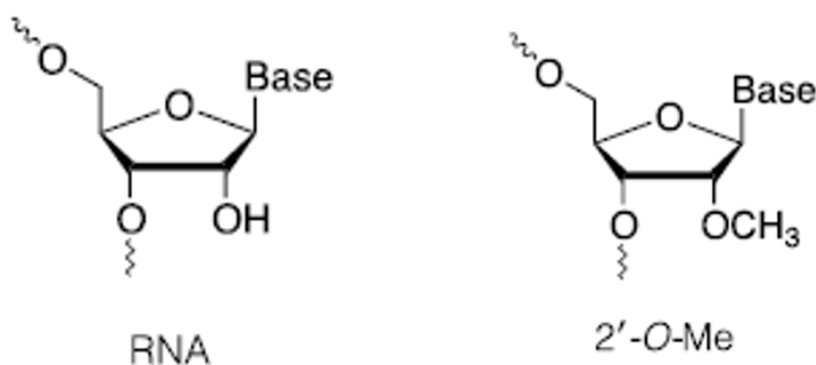
nucleotídeos na saliência de fita única de uma molécula de RNA guisa são desoxinucleotídeos.

[0025] Em algumas modalidades, os RNAs de guia aqui divulgados compreendem um dos padrões de modificação divulgados na US 62/431.756, depositada em 8 de dezembro de 2016, intitulada "Chemically Modified Guide RNAs," cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

[0026] Em algumas modalidades, a invenção compreende um mRNA compreendendo uma ou mais modificações. Em algumas modalidades, a modificação compreende um nucleotídeo modificado em 2'-O-metil (2'-O-Me). Em algumas modalidades, a modificação compreende uma ligação fosforotioato (PS) entre nucleotídeos.

[0027] Os termos "mA", "mC", "mU" ou "mG" podem ser usados para denotar um nucleotídeo que foi modificado com 2'-O-Me.

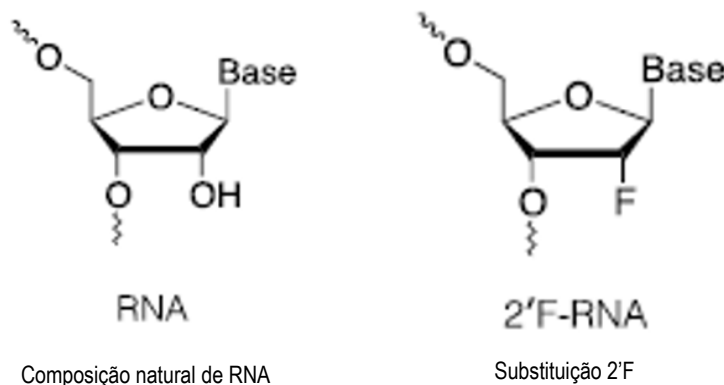
[0028] A modificação de 2'-O-metil pode ser representada da seguinte forma:



[0029] Outra modificação química que demonstrou influenciar os anéis de açúcar nucleotídico é a substituição do halogênio. Por exemplo, a substituição de 2'-fluoro (2'-F) nos anéis de açúcar nucleotídico pode aumentar a afinidade de ligação ao oligonucleotídeo e a estabilidade da nuclease.

[0030] Neste pedido, os termos "fA", "fC", "fU" ou "fG" podem ser usados para denotar um nucleotídeo que foi substituído por 2'-F.

[0031] A substituição de 2'-F pode ser representada da seguinte forma:

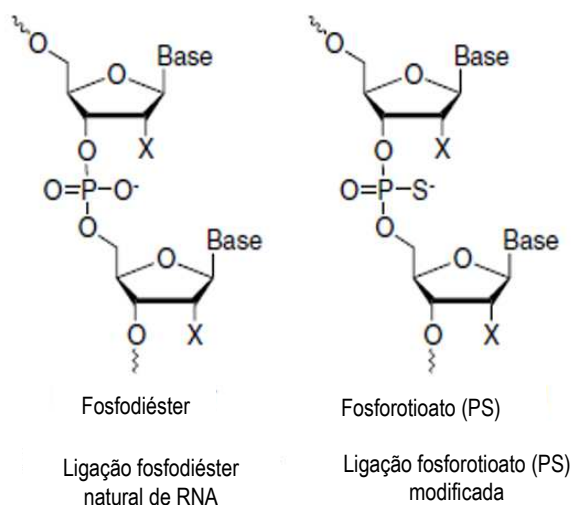


[0032] A ligação ou ligação de fosfortioato (PS) refere-se a uma ligação em que um enxofre é substituído por um oxigênio fosfato não híbrido em uma ligação de fosfodiéster, por exemplo, nas ligações entre bases de nucleotídeos. Quando fosfortioatos são utilizados para gerar oligonucleotídeos, os oligonucleotídeos modificados também podem ser referidos como S-oligos.

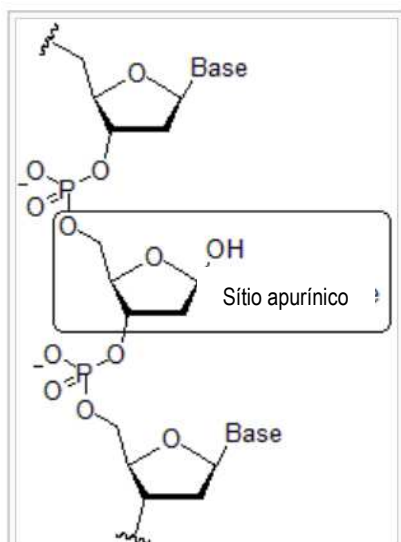
[0033] Um "\*" pode ser usado para representar uma modificação do PS. Neste pedido, os termos A\*, C\*, U\* ou G\* podem ser usados para denotar um nucleotídeo que está ligado ao próximo (por exemplo, 3') nucleotídeo com uma ligação PS.

[0034] 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.

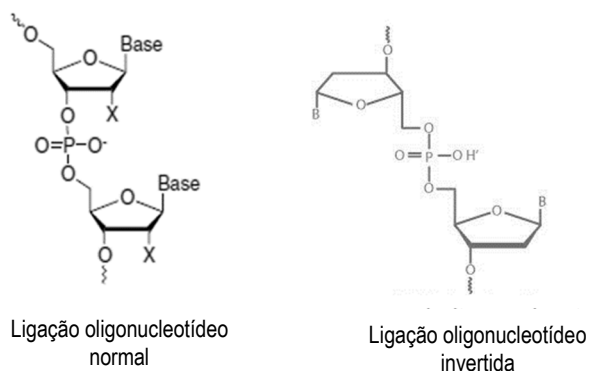
[0035] O diagrama abaixo mostra a substituição de S- em um oxigênio fosfato não híbrido, gerando uma ligação PS em vez de uma ligação fosfodiéster:



[0036] Os nucleotídeos abásicos se referem àqueles que não possuem bases nitrogenadas. A figura abaixo mostra um oligonucleotídeo com um sítio abásico (também conhecido como apurínico) que não possui uma base:



[0037] Bases invertidas referem-se àquelas com ligações que são invertidas da ligação normal de 5' para 3' (isto é, uma ligação de 5' para 5' ou uma ligação de 3' para 3'). Por exemplo:



[0038] Um nucleotídeo abásico pode ser ligado com uma ligação invertida. Por exemplo, um nucleotídeo abásico pode ser ligado ao nucleotídeo terminal 5' por meio de uma ligação 5' a 5', ou um nucleotídeo abásico pode ser conectado ao nucleotídeo terminal 3' por meio de uma ligação 3' a 3'. Um nucleotídeo abásico invertido no nucleotídeo terminal 5' ou 3' também pode ser chamado de capeamento terminal abásico invertido.

[0039] Em algumas modalidades, um ou mais dos primeiros três, quatro ou cinco nucleotídeos no terminal 5' e um ou mais dos últimos três, quatro ou cinco nucleotídeos no terminal 3' são modificados. Em algumas modalidades, a modificação é um nucleotídeo abásico invertido 2'-O-Me, 2'-F, ligação PS ou outra modificação nucleotídica bem conhecida na técnica para aumentar a estabilidade e/ou desempenho.

[0040] Em algumas modalidades, os quatro primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os últimos quatro nucleotídeos no terminal 3' estão ligados a ligações fosforotioato (PS).

[0041] Em algumas modalidades, os três primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os três últimos nucleotídeos no terminal 3' compreendem um nucleotídeo modificado em 2'-O-metil (2'-O-Me). Em algumas modalidades, os três primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os três últimos nucleotídeos no terminal 3' compreendem um nucleotídeo modificado em 2'-fluoro (2'-F). Em algumas modalidades, os três

primeiros nucleotídeos no terminal 5' e os três últimos nucleotídeos no terminal 3' compreendem um nucleotídeo abásico invertido.

[0042] Em algumas modalidades, o RNA guia compreende um sgRNA modificado. Em algumas modalidades, o sgRNA compreende o padrão de modificação mostrado na SEQ ID No: 3, em que N é qualquer nucleotídeo natural ou não natural e em que a totalidade dos N's compreende uma sequência guia que direciona uma nuclease para uma sequência alvo.

[0043] Em algumas modalidades, o RNA guia compreende um sgRNA mostrado em qualquer uma das SEQ ID No: 87-124. Em algumas modalidades, o RNA guia compreende um sgRNA compreendendo qualquer uma das sequências guia da SEQ ID No: 5-82 e os nucleotídeos da SEQ ID No: 125, em que os nucleotídeos da SEQ ID No: 125 estão na extremidade 3' da sequência guia, e em que a sequência guia pode ser modificada como mostrado na SEQ ID No: 3.

### C. **Complexo ribonucleoproteico**

[0044] Em algumas modalidades, uma composição é abrangida compreendendo um ou mais gRNAs compreendendo uma ou mais sequências guia da Tabela 1 ou um ou mais sgRNAs da Tabela 2 e um agente de ligação ao DNA guiado por RNA, por exemplo, uma nuclease, como uma nuclease Cas, como Cas9. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA codificado possui atividade de clivase, que também pode ser referida como atividade de endonuclease de fita dupla. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende uma Cas nuclease. Exemplos de nucleases Cas9 incluem aquelas dos sistemas CRISPR do tipo II de *S. pyogenes*, *S. aureus* e outros procariontes (ver, por exemplo, a lista no próximo parágrafo) e versões modificadas (por exemplo, engenheiradas ou mutantes). Ver, por exemplo,

US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1. Outros exemplos de Cas nucleases incluem um complexo Csm ou Cmr de um sistema CRISPR do tipo III ou a subunidade Cas10, Csm1 ou Cmr2 do mesmo; e um complexo Cascade de um sistema CRISPR do tipo I ou a sua subunidade Cas3 do mesmo. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ser de um sistema Tipo IIA, Tipo IIB ou Tipo IIC. Para discussão de vários sistemas CRISPR e Cas nucleases, ver, por exemplo, Makarova *et al.*, NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova *et al.*, NAT. REV. MICROBIOL, 13: 722-36 (2015); Shmakov *et al.*, MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015).

[0045] As espécies exemplificativas não limitativas das quais a Cas nuclease pode ser derivada incluem *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus gasseri*, *Francisella novicida*, *Wolinella succinogenes*, *Sutterella wadsworthensis*, *Gammaproteobacterium*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Fibrobacter succinogene*, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Treponema denticola*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas sp.*, *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus sp.*, *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor becscii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finegoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*,

*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter* sp., *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc* sp., *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira* sp., *Lyngbya* sp., *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria* sp., *Petrotoga mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, *Acidaminococcus* sp., *Lachnospiraceae* bacterium ND2006, e *Acaryochloris marina*.

[0046] Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cas9 nuclease de *Streptococcus pyogenes*. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cas9 nuclease de *Streptococcus thermophilus*. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cas9 nuclease de *Neisseria meningitidis*. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cas9 nuclease de *Staphylococcus aureus*. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cpf1 nuclease de *Francisella novicida*. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cpf1 nuclease de *Acidaminococcus* sp. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a Cpf1 nuclease de *Lachnospiraceae* bacterium ND2006. Em outras modalidades, a Cas nuclease é a Cpf1 nuclease de *Francisella tularensis*, *Lachnospiraceae* bacterium, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, ou *Porphyromonas macacae*. Em certas modalidades, a Cas nuclease é uma Cpf1 nuclease de um *Acidaminococcus* ou *Lachnospiraceae*.

[0047] Em algumas modalidades, o gRNA em conjunto com um agente de ligação ao DNA guiado por RNA é chamado de complexo de ribonucleoproteínas (RNP). Em algumas modalidades, o agente de

ligação ao DNA guiado por RNA é uma Cas nuclease. Em algumas modalidades, o gRNA em conjunto com uma Cas nuclease é chamado de Cas RNP. Em algumas modalidades, o RNP compreende componentes Tipo I, Tipo II ou Tipo III. Em algumas modalidades, a Cas nuclease é a proteína Cas9 do sistema CRISPR/Cas tipo II. Em alguma modalidade, o gRNA em conjunto com Cas9 é chamado de Cas9 RNP.

[0048] Cas9 do tipo selvagem possui dois domínios de nuclease: RuvC e HNH. O domínio RuvC cliva a fita de DNA não alvo, e o domínio HNH cliva a fita alvo de DNA. Em algumas modalidades, a proteína Cas9 compreende mais de um domínio RuvC e/ou mais de um domínio HNH. Em algumas modalidades, a proteína Cas9 é uma Cas9 do tipo selvagem. Em cada uma das modalidades de composição, uso e método, o Cas induz uma quebra de fita dupla no DNA alvo.

[0049] Cas9 do tipo selvagem possui dois domínios de nuclease: RuvC e HNH. O domínio RuvC cliva a fita de DNA não alvo, e o domínio HNH cliva a fita alvo de DNA. Em algumas modalidades, a Cas9 nuclease compreende mais de um domínio RuvC e/ou mais de um domínio HNH. Em algumas modalidades, a nuclease Cas9 é uma Cas9 do tipo selvagem. Em algumas modalidades, a Cas9 é capaz de induzir uma quebra de fita dupla no DNA alvo. Em certas modalidades, a Cas nuclease pode clivar dsDNA, pode clivar uma fita de dsDNA ou pode não ter atividade de clivase ou nickase de DNA. Uma sequência de aminoácidos Cas9 exemplificativa é fornecida como SEQ ID NO: 203. Uma sequência ORF de mRNA de Cas9 exemplificativa, que inclui códons de início e parada, é fornecida como SEQ ID NO: 204. Uma sequência de codificação de mRNA de Cas9 exemplificativa, adequada para inclusão em uma proteína de fusão, é fornecida como SEQ ID NO: 210.

[0050] Em algumas modalidades, são utilizadas Cas nucleases quiméricas, em que 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 Cas nuclease pode ser uma nuclease modificada.

[0051] Em outras modalidades, a Cas nuclease pode ser de um sistema CRISPR/Cas de Tipo I. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ser um componente do complexo Cascade de um sistema CRISPR/Cas Tipo I. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ser uma proteína Cas3. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ser de um sistema CRISPR/Cas de Tipo III. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode ter uma atividade de clivagem de RNA.

[0052] Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA possui atividade de nickase de fita única, isto é, pode cortar uma fita de DNA para produzir uma quebra de fita única, também conhecida como "corte". Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende uma Cas nickase. Uma nickase é uma enzima que cria um corte no dsDNA, isto é, corta uma fita, mas não a outra da dupla hélice do DNA. Em algumas modalidades, uma Cas nickase é uma versão de uma Cas nuclease (por exemplo, uma Cas nuclease discutida acima) na qual um sítio ativo endonucleolítico é inativado, por exemplo, por uma ou mais alterações (por exemplo, mutações pontuais) em um domínio catalítico. Ver, por exemplo, Patente US 8.889.356 para discussão de Cas nickases e alterações exemplificativas no domínio catalítico. Em algumas modalidades, uma Cas nickase como uma Cas9 nickase tem um domínio RuvC ou HNH inativado. Uma sequência de aminoácidos Cas9 nickase exemplificativa é fornecida como SEQ ID NO: 206. Uma sequência ORF de mRNA de Cas9 nickase exemplificativa, que inclui códons de início e parada, é fornecida como SEQ ID NO: 207. Uma sequência de codificação de

mRNA de Cas9 nickase exemplificativa, adequada para inclusão em uma proteína de fusão, é fornecida como SEQ ID NO: 211.

[0053] Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA é modificado para conter apenas um domínio de nuclease funcional. Por exemplo, a proteína do agente pode ser modificada de modo que um dos domínios da nuclease seja mutado ou completamente ou parcialmente excluído para reduzir sua atividade de clivagem de ácido nucleico. Em algumas modalidades, uma nickase é usada tendo um domínio RuvC com atividade reduzida. Em algumas modalidades, uma nickase é usada tendo um domínio RuvC inativo. Em algumas modalidades, uma nickase é usada tendo um domínio HNH com atividade reduzida. Em algumas modalidades, uma nickase é usada tendo um domínio HNH inativo.

[0054] Em algumas modalidades, um aminoácido conservado dentro de um domínio de nuclease da proteína Cas é substituído para reduzir ou alterar a atividade da nuclease. Em algumas modalidades, uma Cas nuclease pode compreender uma substituição de aminoácidos no domínio da RuvC nuclease ou semelhante a RuvC. Substituições de aminoácidos exemplificativas no domínio da RuvC nuclease ou semelhante a RuvC incluem D10A (com base na proteína Cas9 de *S. pyogenes*). Ver, por exemplo, Zetsche *et al.* (2015) *Cell* Oct 22:163(3): 759-771. Em algumas modalidades, a Cas nuclease pode compreender uma substituição de aminoácidos no domínio da HNH nuclease ou semelhante a HNH. Substituições de aminoácidos exemplificativas no domínio da HNH nuclease ou semelhante a HNH incluem E762A, H840A, N863A, H983A e D986A (com base na proteína Cas9 de *S. pyogenes*). Ver, por exemplo, Zetsche *et al.* (2015). Outras substituições de aminoácidos exemplificativas incluem D917A, E1006A e D1255A (com base na sequência de *Francisella novicida* U112 Cpf1 (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1\_FRATN))).

[0055] Em algumas modalidades, um mRNA que codifica uma nickase é fornecido em combinação com um par de RNAs guia que são complementares às fitas de sentido e antissentido da sequência alvo, respectivamente. Nesta modalidade, os RNAs guia direcionam a nickase para uma sequência alvo e introduzem um DSB gerando um nick em fitas opostas da sequência alvo (isto é, duplo corte). Em algumas modalidades, o uso de duplo corte pode melhorar a especificidade e reduzir os efeitos fora do alvo. Em algumas modalidades, uma nickase é usada junto com dois RNAs guia separados, direcionando fitas opostas de DNA, para produzir um corte duplo no DNA alvo. Em algumas modalidades, uma nickase é usada junto com dois RNAs guia separados que são selecionados para estarem próximos para produzir um corte duplo no DNA alvo.

[0056] Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA carece de atividade de clivase e nickase. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende um polipeptídeo de ligação ao DNA de dCas. Um polipeptídeo dCas possui atividade de ligação ao DNA, enquanto essencialmente carece de atividade catalítica (clivase/nickase). Em algumas modalidades, o polipeptídeo dCas é um polipeptídeo dCas9. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA sem atividade de clivase e nickase ou o polipeptídeo de ligação a dCas é uma versão de uma nuclease Cas (por exemplo, uma nuclease Cas discutida acima) na qual seus sítios ativos endonucleolíticos são inativados, por exemplo, por uma ou mais alterações (por exemplo, mutações pontuais) em seus domínios catalíticos. Ver, por exemplo, US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1. Uma sequência de aminoácidos dCas9 exemplificativa é fornecida como SEQ ID NO: 208. Uma sequência ORF de mRNA de Cas9 exemplificativa, que inclui códons de início e parada, é fornecida como SEQ ID NO: 209. Uma sequência de codificação de

mRNA de Cas9 exemplificativa, adequada para inclusão em uma proteína de fusão, é fornecida como SEQ ID NO: 212.

[0057] Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA compreende um ou mais domínios funcionais heterólogos (por exemplo, é ou compreende um polipeptídeo de fusão).

[0058] Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode facilitar o transporte do agente de ligação ao DNA guiado por RNA para o núcleo de uma célula. Por exemplo, o domínio funcional heterólogo pode ser um sinal de localização nuclear (NLS). Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com 1-10 NLS(s). Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com 1-5 NLS(s). Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com um NLS. Quando um NLS é usado, o NLS pode ser ligado no N-terminal ou no C-terminal da sequência do agente de ligação ao DNA guiada por RNA. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido no C-terminal com pelo menos um NLS. Um NLS também pode ser inserido na sequência do agente de ligação ao DNA guiado por RNA. Em outras modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com mais de um NLS. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com 2, 3, 4 ou 5 NLSs. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com dois NLSs. Em certas circunstâncias, os dois NLSs podem ser os mesmos (*por exemplo*, dois SV40 NLSs) ou diferentes. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA é fundido a duas sequências SV40 NLS ligadas no terminal carboxi. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com dois NLSs, um ligado no N-terminal e um no C-terminal. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado

por RNA pode ser fundido com 3 NLSs. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser fundido com nenhum NLS. Em algumas modalidades, o NLS pode ser uma sequência monopartida, como, *por exemplo*, o SV40 NLS, PKKKRKV (SEQ ID NO: 274) ou PKKKRRV (SEQ ID NO: 275). Em algumas modalidades, o NLS pode ser uma sequência bipartida, como o NLS da nucleoplasmina, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 276). Numa modalidade específica, um único PKKKRKV (SEQ ID NO: 274) NLS pode ser ligado no C-terminal do agente de ligação ao DNA guiado por RNA. Um ou mais ligantes são opcionalmente incluídos no sítio de fusão. Em algumas modalidades, um ou mais NLS(s) de acordo com qualquer uma das modalidades anteriores estão presentes no agente de ligação ao DNA guiado por RNA em combinação com um ou mais domínios funcionais heterólogos adicionais, como qualquer um dos domínios funcionais heterólogos descritos abaixo.

[0059] Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode ser capaz de modificar a meia-vida intracelular do agente de ligação ao DNA guiado por RNA. Em algumas modalidades, a meia-vida do agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser aumentada. Em algumas modalidades, a meia-vida do agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser reduzida. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode ser capaz de aumentar a estabilidade do agente de ligação ao DNA guiado por RNA. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode ser capaz de reduzir a estabilidade do agente de ligação ao DNA guiado por RNA. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode atuar como um peptídeo sinal para degradação de proteínas. Em algumas modalidades, a degradação de proteínas pode ser mediada por enzimas proteolíticas, como, *por exemplo*, proteassomas, proteases lisossômicas ou proteases de calpaína. Em algumas modalidades, o

domínio funcional heterólogo pode compreender uma sequência PEST. Em algumas modalidades, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA pode ser modificado pela adição de ubiquitina ou uma cadeia de polubiquitina. Em algumas modalidades, a ubiquitina pode ser uma proteína do tipo ubiquitina (UBL). Exemplos não limitativos de proteínas do tipo ubiquitina incluem modificador pequeno do tipo ubiquitina (SUMO), proteína reativa cruzada da ubiquitina (UCRP, também conhecida como gene 15 estimulado por interferon-15 (ISG15)), modificador-1 relacionado à ubiquitina (URM1), proteína-8 desregulada no desenvolvimento expressa em células precursoras dos neurônios (NEDD8, também chamada Rub1 em *S. cerevisiae*), associada ao antígeno leucocitário humano F (FAT10), autofagia-8 (ATG8) e -12 (ATG12), proteína semelhante a Fau ubiquitina (FUB1), UBL ancorado na membrana (MUB), modificador de dobra de ubiquitina-1 (UFM1) e proteína-5 semelhante à ubiquitina (UBL5).

[0060] Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode ser um domínio marcador. Exemplos não limitativos de domínios marcadores incluem proteínas fluorescentes, marcadores de purificação, marcadores de epítomos e sequências de genes repórteres. Em algumas modalidades, o domínio marcador pode ser uma proteína fluorescente. Exemplos não limitativos de proteínas fluorescentes adequadas incluem proteínas fluorescentes verdes (*por exemplo*, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Esmeralda, Verde Azami, Verde Azami Monomérico, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), proteínas fluorescentes amarelas (*por exemplo*, YFP, EYFP, Citrina, Vênus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), proteínas fluorescentes azuis (*por exemplo*, EBFP, EBFP2, Azurita, mKalamal, GFPuv, Safira, Safira-T), proteínas fluorescentes cianas (*por exemplo*, ECFP, cerúleo, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), proteínas fluorescentes vermelhas (*por exemplo*, mKate, mKate2, mPlum, monômero DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-

Express, DsRed2, DsRed-monômero, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eRedberry2, mStrawberry, Jred) e proteínas fluorescentes laranjas (mOrange, mKO, Kusabira-Orange, Komabira-Monomérica-Orange, mTangerina, tdTomato) ou qualquer outra proteína fluorescente adequada. Em outras modalidades, o domínio marcador pode ser uma etiqueta de purificação e/ou uma etiqueta de epítipo. Etiquetas exemplificativas não limitativas incluem glutationa-S-transferase (GST), proteína de ligação à quitina (CBP), proteína de ligação à maltose (MBP), tioredoxina (TRX), poli (NANP), etiqueta de purificação por afinidade em tandem (TAP), myc, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 8xHis, proteína transportadora de biotina carboxil (BCCP), poli-His e calmodulina. Genes repórter exemplificativos não limitativos incluem glutationa-S-transferase (GST), peroxidase de rábano silvestre (HRP), cloranfenicol acetiltransferase (CAT), beta-galactosidase, beta-glucuronidase, luciferase ou proteínas fluorescentes.

[0061] Em modalidades adicionais, o domínio funcional heterólogo pode direcionar o agente de ligação ao DNA guiado por RNA para uma organela, tipo de célula, tecido ou órgão específico. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo pode direcionar o agente de ligação ao DNA guiado por RNA para mitocôndrias.

[0062] Em outras modalidades, o domínio funcional heterólogo pode ser um domínio efetor. Quando o agente de ligação ao DNA guiado por RNA é direcionado para sua sequência alvo, *por exemplo*, quando uma Cas nuclease é direcionada para uma sequência alvo por um gRNA, o domínio efetor pode modificar ou afetar a sequência alvo. Em algumas modalidades, o domínio efetor pode ser escolhido a partir de um domínio de ligação de ácido nucleico, um domínio nuclease (por exemplo, um domínio nuclease não Cas), um domínio de modificação

epigenética, um domínio de ativação transcricional ou um domínio repressor transcricional. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo é uma nuclease, como uma nuclease FokI. Ver, por exemplo, Patente US 9.023.649. Em algumas modalidades, o domínio funcional heterólogo é um ativador ou repressor da transcrição. Ver, por exemplo, Qi *et al.*, “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression,” *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera *et al.*, “RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors,” *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali *et al.*, “CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering,” *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert *et al.*, “CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes,” *Cell* 154:442-51 (2013). Como tal, o agente de ligação ao DNA guiado por RNA torna-se essencialmente um fator de transcrição que pode ser direcionado para ligar uma sequência alvo desejada usando um RNA guia.

#### **D. Determinação da eficácia dos gRNAs**

[0063] Em algumas modalidades, a eficácia de um gRNA é determinada quando distribuída ou expressa em conjunto com outros componentes que formam uma RNP. Em algumas modalidades, o gRNA é expresso juntamente com uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma proteína Cas. Em algumas modalidades, o gRNA é distribuído a ou expresso em uma linhagem celular que já expressa de maneira estável uma nuclease de DNA guiada por RNA, como uma proteína Cas. Em algumas modalidades, o gRNA é distribuído a uma célula como parte de uma RNP. Em algumas modalidades, o gRNA é distribuído a uma célula junto com um mRNA que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease.

[0064] Como descrito aqui, o uso de uma nuclease de DNA guiado por RNA e um RNA guia divulgado aqui pode levar a quebras de fita

dupla no DNA que podem produzir erros na forma de mutações de inserção/exclusão (indel) mediante reparo por máquinas celulares. Muitas mutações devidas a indels alteram o quadro de leitura ou introduzem códons de parada prematura e, portanto, produzem uma proteína não funcional.

[0065] Em algumas modalidades, a eficácia de determinados gRNAs é determinada com base em modelos *in vitro*. Em algumas modalidades, o modelo *in vitro* são células HEK293 que expressam estavelmente Cas9 (HEK293\_Cas9). Em algumas modalidades, o modelo *in vitro* são células de hepatocarcinoma humano HUH7. Em algumas modalidades, o modelo *in vitro* são células HepG2. Em algumas modalidades, o modelo *in vitro* são hepatócitos primários humanos. Em algumas modalidades, o modelo *in vitro* são hepatócitos primários de cynomolgus. No que diz respeito à utilização de hepatócitos primários humanos, os hepatócitos primários humanos disponíveis no mercado podem ser utilizados para proporcionar maior consistência entre as experiências. Em algumas modalidades, o número de sítios fora do alvo nos quais ocorre uma deleção ou inserção em um modelo *in vitro* (por exemplo, em hepatócitos primários humanos) é determinado, por exemplo, analisando o DNA genômico de hepatócitos primários humanos transfectados *in vitro* com mRNA de Cas9 e o RNA guia. Em algumas modalidades, essa determinação compreende a análise de DNA genômico de hepatócitos primários humanos transfectados *in vitro* com mRNA de Cas9, o RNA guia e um oligonucleotídeo doador. Procedimentos exemplificativos para tais determinações são fornecidos nos exemplos de trabalho abaixo.

[0066] Em algumas modalidades, a eficácia de gRNAs específicos é determinada em vários modelos de células *in vitro* para um processo de seleção de gRNA. Em algumas modalidades, é realizada uma comparação de dados de linhagem celular com os gRNAs selecionados.

Em algumas modalidades, a triagem cruzada em vários modelos de células é realizada.

[0067] Em algumas modalidades, a eficácia de determinados gRNAs é determinada com base *em modelos in vivo*. Em algumas modalidades, o modelo *in vivo* é um modelo de roedor. Em algumas modalidades, o modelo de roedor é um camundongo que expressa um gene *TTR* humano, que pode ser um gene *TTR* humano mutante. Em algumas modalidades, o modelo *in vivo* é um primata não humano, por exemplo, macaco cynomolgus.

[0068] Em algumas modalidades, a eficácia de um RNA guia é medida pela porcentagem de edição do *TTR*. Em algumas modalidades, a porcentagem de edição do *TTR* é comparada com a porcentagem de edição necessária para obter o knockdown da proteína *TTR*, por exemplo, no meio de cultura de células no caso de um modelo *in vitro* ou no soro ou tecido no caso de um modelo *in vivo*.

[0069] Em algumas modalidades, a eficácia de um RNA guia é medida pelo número e/ou frequência de indels em sequências fora do alvo dentro do genoma do tipo de célula alvo. Em algumas modalidades, são fornecidos RNAs guia eficazes que produzem indels em sítios fora do alvo em frequências muito baixas (por exemplo, <5%) em uma população de células e/ou em relação à frequência da criação de indel no sítio alvo. Assim, a divulgação fornece RNAs guia que não exibem formação indel fora do alvo no tipo de célula alvo (por exemplo, um hepatócito) ou que produzem uma frequência de formação indel fora do alvo de <5% em uma população celular e/ou em relação à frequência de criação de indel no sítio alvo. Em algumas modalidades, a divulgação fornece RNAs guia que não exibem formação indel fora do alvo no tipo de célula alvo (por exemplo, hepatócitos). Em algumas modalidades, são fornecidos RNAs guia que produzem indels em menos de 5 sítios fora do alvo, por exemplo, conforme avaliado por um

ou mais métodos aqui descritos. Em algumas modalidades, são fornecidos RNAs guia que produzem indels menores ou iguais a 4, 3, 2 ou 1 sítios fora do alvo, por exemplo, como avaliados por um ou mais métodos aqui descritos. Em algumas modalidades, os sítios fora do alvo não ocorrem em uma região de codificação de proteínas no genoma da célula alvo (por exemplo, hepatócitos).

[0070] Em algumas modalidades, a detecção de eventos de edição de genes, como a formação de mutações de inserção/deleção ("indel") e eventos de reparo direcionado por homologia (HDR) no DNA alvo, utiliza amplificação linear com um iniciador marcado e isolando os produtos de amplificação marcados (aqui após referido como método "LAM-PCR" ou "Linear Amplification (LA)").

[0071] Em algumas modalidades, o método compreende isolar o DNA celular de uma célula que foi induzida a ter uma quebra de fita dupla (DSB) e, opcionalmente, que foi fornecida com um modelo de HDR para reparar o DSB; realizar pelo menos um ciclo de amplificação linear do DNA com um iniciador marcado; isolar os produtos de amplificação linear que compreendem etiqueta, descartando assim qualquer produto de amplificação que foi amplificado com um iniciador não marcado; opcionalmente amplificar ainda mais os produtos isolados; e analisar os produtos de amplificação linear, ou os produtos amplificados adicionais, para determinar a presença ou ausência de um evento de edição, como, por exemplo, uma quebra de fita dupla, uma sequência de inserção, exclusão ou modelo de HDR no DNA alvo. Em alguns casos, o evento de edição pode ser quantificado. A quantificação e semelhantes, conforme aqui utilizados (incluindo no contexto de eventos de edição HDR e não HDR, como indels) incluem a detecção da frequência e/ou tipo(s) de eventos de edição em uma população.

[0072] Em algumas modalidades, apenas um ciclo de amplificação linear é conduzido.

[0073] Em alguns casos, o iniciador marcado compreende um código de barras molecular. Em algumas modalidades, o iniciador marcado compreende um código de barras molecular e apenas um ciclo de amplificação linear é conduzido.

[0074] Em algumas modalidades, a etapa de análise compreende sequenciar os produtos amplificados lineares ou os produtos amplificados adicionais. O sequenciamento pode compreender qualquer método conhecido pelos versados na técnica, incluindo o sequenciamento de próxima geração e a clonagem dos produtos de amplificação linear ou produtos amplificados adicionais em um plasmídeo e o sequenciamento do plasmídeo ou de uma porção do plasmídeo. Em outros aspectos, a etapa de análise compreende realizar PCR digital (dPCR) ou PCR digital de gotículas (ddPCR) nos produtos amplificados lineares ou nos produtos amplificados adicionais. Em outros casos, a etapa de análise compreende contatar os produtos amplificados lineares ou outros produtos amplificados com uma sonda de ácido nucleico projetada para identificar o DNA que compreende a sequência do modelo de HDR e detectar as sondas que se ligaram ao(s) produto(s) amplificado(s) ou produto(s) amplificado(s) adicional(is). Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar a localização do modelo de HDR no DNA alvo.

[0075] Em certas modalidades, o método compreende ainda determinar a sequência de um sítio de inserção no DNA alvo, em que o sítio de inserção é o sítio em que o modelo de HDR se incorpora ao DNA alvo e em que o sítio de inserção pode incluir alguma sequência de DNA alvo e algumas sequências de modelos HDR.

[0076] Em algumas modalidades, a amplificação linear do DNA alvo com um iniciador marcado é realizada por 1-50 ciclos, 1-60 ciclos, 1-70 ciclos, 1-80 ciclos, 1-90 ciclos ou 1-100 ciclos.

[0077] Em algumas modalidades, a amplificação linear do DNA alvo

com um iniciador marcado compreende uma etapa de desnaturação para separar duplexes de DNA, uma etapa de recozimento para permitir a ligação do iniciador e uma etapa de alongamento. Em algumas modalidades, a amplificação linear é isotérmica (não requer uma mudança de temperatura). Em algumas modalidades, a amplificação linear isotérmica é uma amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP), uma amplificação de deslocamento de fita (SDA), uma amplificação dependente de helicase ou uma reação de amplificação de enzima nicking.

[0078] Em algumas modalidades, o iniciador marcado emparelha com o DNA alvo pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 90, pelo menos 100, pelo menos 110, pelo menos 120, pelo menos 130, pelo menos 140, pelo menos 150, pelo menos 160, pelo menos 170, pelo menos 180, pelo menos 190, pelo menos 200, pelo menos 210, pelo menos 220, pelo menos 230, pelo menos 240, pelo menos 250, pelo menos 260, pelo menos 270, pelo menos 280, pelo menos 290, pelo menos 300, pelo menos 1.000, pelo menos 5.000 ou pelo menos 10.000 nucleotídeos de distância do local do evento de edição esperado, por exemplo, o sítio de inserção, deleção ou inserção de modelo.

[0079] Em algumas modalidades, o iniciador marcado compreende um código de barras molecular. Em algumas modalidades, o código de barras molecular compreende uma sequência que não é complementar ao DNA alvo. Em algumas modalidades, o código de barras molecular compreende 6, 8, 10 ou 12 nucleotídeos.

[0080] Em algumas modalidades, o marcador no iniciador é biotina, estreptavidina, digoxigenina, uma sequência de DNA ou isotiocianato de fluoresceína (FITC).

[0081] Em algumas modalidades, os produtos de amplificação linear são isolados usando um reagente de captura específico para a

etiqueta no iniciador. Em algumas modalidades, o reagente de captura está em uma esfera, suporte sólido, matriz ou coluna. Em algumas modalidades, a etapa de isolamento compreende contatar o(s) produto(s) de amplificação linear com um reagente de captura específico para a etiqueta no iniciador. Em algumas modalidades, o reagente de captura é biotina, estreptavidina, digoxigenina, uma sequência de DNA ou isotiocianato de fluoresceína (FITC).

[0082] Em algumas modalidades, o marcador é biotina e o reagente de captura é estreptavidina. Em algumas modalidades, o marcador é estreptavidina e o reagente de captura é biotina. Em algumas modalidades, a etiqueta está no terminal 5' do iniciador, no terminal 3' do iniciador, ou interno ao iniciador. Em algumas modalidades, a etiqueta e/ou o reagente de captura são removidos após a etapa de isolamento. Em algumas modalidades, a etiqueta e/ou o reagente de captura não são removidos e as etapas adicionais de amplificação e análise são realizadas na presença de etiqueta e/ou captura.

[0083] Em algumas modalidades, a amplificação adicional é não linear. Em algumas modalidades, a amplificação adicional é PCR digital, qPCR ou RT-PCR. Em algumas modalidades, o sequenciamento é o sequenciamento de próxima geração (NGS).

[0084] Em algumas modalidades, o DNA alvo é genômico ou mitocondrial. Em algumas modalidades, o DNA alvo é o DNA genômico de uma célula procariótica ou eucariótica. Em algumas modalidades, o DNA alvo é mamífero. O DNA alvo pode ser de uma célula que não se divide ou de uma célula que se divide. Em algumas modalidades, o DNA alvo pode ser de uma célula primária. Em algumas modalidades, o DNA alvo é de uma célula replicadora.

[0085] Em alguns casos, o DNA celular é cortado antes da amplificação linear. Em algumas modalidades, o DNA cortado tem um tamanho médio entre 0,5 kb e 20 kb. Em alguns casos, o DNA celular é

cortado em um tamanho médio de 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,25, 3,5, 3,75, 4,0, 4,25, 4,5, 4,75, 5,0, 5,25, 5,5, 5,75, 6,0, 6,25, 6,5, 6,75, 7,0, 7,25, 7,5, 7,75, 8,0, 8,25, 8,5, 8,75, 9,75, 9,25, 9,5, 9,75, 10,0, 10,25, 10,5, 10,75, 11,0, 11,25, 11,5, 11,75, 12,0, 12,25, 12,5, 12,75, 13,0, 13,25, 13,5, 13,75, 14,0, 14,25, 14,5, 14,75, 15,05, 15,25, 15,5, 15,5, 15,75, 16,0, 16,25, 16,5, 16,75, 17,0, 17,25, 17,5, 17,75, 18,0, 18,25, 18,5, 18,75, 19,0, 19,25, 19,5, 19,75 ou 20,0 kb. Em alguns casos, o DNA celular é cortado em um tamanho médio de cerca de 1,5 kb.

[0086] Em algumas modalidades, a eficácia de um RNA guia é medida por secreção de TTR. Em algumas modalidades, a secreção de TTR é medida usando um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) com meio de cultura celular ou soro. Em algumas modalidades, a secreção de TTR é medida nos mesmos sistemas ou modelos *in vitro* ou *in vivo* usados para medir a edição. Em algumas modalidades, a secreção de TTR é medida em hepatócitos primários humanos. Em algumas modalidades, a secreção de TTR é medida em células HUH7. Em algumas modalidades, a secreção de TTR é medida em células HepG2.

[0087] Os ensaios ELISA são geralmente conhecidos pelos versados na matéria e podem ser concebidos para determinar os níveis séricos de TTR. Numa modalidade exemplificativa, o sangue é coletado e o soro é isolado. Os níveis séricos totais de TTR podem ser determinados usando um Kit ELISA de Pré-albumina de Camundongo (Transtiretina) (Aviva Systems Biology, Cat. OKIA00111) ou kit semelhante para medir a TTR humana. Se nenhum kit estiver disponível, um ELISA pode ser desenvolvido usando placas pré-revestidas com anticorpo de captura específico para a TTR que está sendo medida. A placa é incubada em seguida à temperatura ambiente por um período de tempo antes da lavagem. O conjugado enzima-

anticorpo anti-TTR é adicionado e inoculado. O conjugado de anticorpo não ligado é removido e a placa é lavada antes da adição da solução de substrato cromogênico que reage com a enzima. A placa é lida em um leitor de placas apropriado em uma absorbância específica para a enzima e o substrato usado.

[0088] Em algumas modalidades, a quantidade de TTR nas células (incluindo aquelas do tecido) mede a eficácia de um gRNA. Em algumas modalidades, a quantidade de TTR nas células é medida usando western blot. Em algumas modalidades, a célula usada são células HUH7. Em algumas modalidades, a célula usada é um hepatócito primário humano. Em algumas modalidades, a célula usada é uma célula primária obtida de um animal. Em algumas modalidades, a quantidade de TTR é comparada à quantidade de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase GAPDH (um gene de limpeza) para controlar alterações no número de células.

### **III. Formulações de LNP e tratamento de ATTR**

[0089] Em algumas modalidades, é fornecido um método para induzir uma quebra de fita dupla (DSB) dentro do gene *TTR*, compreendendo administrar uma composição compreendendo um RNA guia compreendendo qualquer uma ou mais sequências guia das SEQ ID Nos: 5-82, ou qualquer um ou mais dos sgRNAs das SEQ ID Nos: 87-124. Em algumas modalidades, os gRNAs compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID Nos: 5-82 são administrados para induzir um DSB no gene *TTR*. Os RNAs guia podem ser administrados em conjunto com uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease (por exemplo, Cas9) ou um mRNA ou vetor que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease (por exemplo, Cas9).

[0090] Em algumas modalidades, é fornecido um método para modificar o gene *TTR*, compreendendo administrar uma composição

compreendendo um RNA guia compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID Nos: 5-82, ou qualquer um ou mais dos sgRNAs da SEQ ID Nos: 87-124. Em algumas modalidades, os gRNAs compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID Nos: 5-82, ou qualquer um ou mais dos sgRNAs da SEQ ID Nos: 87-124, são administrados para modificar o gene *TTR*. Os RNAs guia podem ser administrados em conjunto com uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease (por exemplo, Cas9) ou um mRNA ou vetor que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease (por exemplo, Cas9).

[0091] Em algumas modalidades, um método de tratamento de ATTR é fornecido um método para modificar o gene *TTR*, compreendendo administrar uma composição compreendendo um RNA guia compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID NOs: 5-82, ou qualquer um ou mais dos sgRNAs da SEQ ID Nos: 87-124. Em algumas modalidades, os gRNAs compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID NOs: 5-82, ou qualquer um ou mais dos sgRNAs da SEQ ID Nos: 87-124 são administrados para tratar ATTR. Os RNAs guia podem ser administrados em conjunto com uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease (por exemplo, Cas9) ou um mRNA ou vetor que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease (por exemplo, Cas9).

[0092] Em algumas modalidades, um método de redução da concentração sérica de *TTR* é fornecido compreendendo administrar um RNA guia compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID NOs: 5-82, ou qualquer um ou mais dos sgRNAs da SEQ ID Nos: 87-124. Em algumas modalidades, os gRNAs compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID NOs: 5-82 ou qualquer um ou mais dos sgRNAs da SEQ ID Nos:

87-124 são administrados para reduzir ou impedir o acúmulo de TTR em amiloides ou fibrilas amiloides. Os RNAs podem ser administrados em conjunto com uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease (por exemplo, Cas9) ou um mRNA ou vetor que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease (por exemplo, Cas9).

[0093] Em algumas modalidades, é fornecido um método para reduzir ou impedir o acúmulo de TTR em amiloides ou fibrilas amiloides de um sujeito, compreendendo administrar uma composição compreendendo um RNA guia compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID NOs: 5-82, ou qualquer um ou mais dos sgRNAs das SEQ ID Nos: 87-124. Em algumas modalidades, é fornecido um método para reduzir ou impedir o acúmulo de TTR em amiloides ou fibrilas amiloides de um sujeito, compreendendo administrar uma composição compreendendo qualquer um ou mais dos sgRNAs das SEQ ID Nos: 87-113. Em algumas modalidades, os gRNAs compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia das SEQ ID NOs: 5-82 ou qualquer um ou mais dos sgRNAs das SEQ ID Nos: 87-124 são administrados para reduzir ou impedir o acúmulo de TTR em amiloides ou fibrilas amiloides. Os RNAs podem ser administrados em conjunto com uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease (por exemplo, Cas9) ou um mRNA ou vetor que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease (por exemplo, Cas9).

[0094] Em algumas modalidades, os gRNAs compreendendo as sequências guia da Tabela 1 ou um ou mais sgRNAs da Tabela 2, juntamente com uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease induzem DSBs, e a junção não homóloga (NHEJ) durante o reparo leva a uma mutação no gene *TTR*. Em algumas modalidades, o NHEJ leva a uma deleção ou inserção de um nucleotídeo (s), o que

induz uma mudança de quadro ou mutação sem sentido no gene *TTR*.

[0095] Em algumas modalidades, a administração dos RNAs guia da invenção (por exemplo, em uma composição aqui fornecida) reduz os níveis (por exemplo, níveis séricos) de TTR no sujeito e, portanto, impede a acumulação e agregação de TTR em amiloides ou fibrilas amiloides.

[0096] Em algumas modalidades, reduzir ou impedir o acúmulo de TTR em amiloides ou fibrilas amiloides de um sujeito compreende reduzir ou impedir a deposição de TTR em um ou mais tecidos do sujeito, como estômago, cólon ou tecido nervoso. Em algumas modalidades, o tecido nervoso compreende nervo ciático ou gânglio da raiz dorsal. Em algumas modalidades, a deposição de TTR é reduzida em dois, três ou quatro do estômago, cólon, gânglio da raiz dorsal e nervo ciático. O nível de deposição em um determinado tecido pode ser determinado usando uma amostra de biópsia, por exemplo, usando imunocoloração. Em algumas modalidades, a redução ou prevenção do acúmulo de TTR em amiloides ou fibrilas amiloides de um sujeito e/ou redução ou prevenção da deposição de TTR é inferida com base na redução dos níveis séricos de TTR por um período de tempo. Conforme discutido nos exemplos, verificou-se que a redução dos níveis séricos de TTR de acordo com os métodos e usos aqui fornecidos pode resultar na remoção da TTR depositada de tecidos como os discutidos acima e nos exemplos, por exemplo, medidos 8 semanas após a administração da composição.

[0097] Em algumas modalidades, o sujeito é mamífero. Em algumas modalidades, o sujeito é humano. Em algumas modalidades, o sujeito é vaca, porco, macaco, ovelha, cachorro, gato, peixe ou ave.

[0098] Em algumas modalidades, o uso de um RNAs guia compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia na Tabela 1 ou um ou mais sgRNAs da Tabela 2 (por exemplo, em uma

composição aqui fornecida) é fornecido para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma sujeito humano com ATTR.

[0099] Em algumas modalidades, os RNAs, composições e formulações guia são administrados por via intravenosa. Em algumas modalidades, os RNAs, composições e formulações guia são administrados na circulação hepática.

[00100] Em algumas modalidades, uma única administração de uma composição compreendendo um RNA guia aqui fornecido é suficiente para derrubar a expressão da proteína mutante. Em algumas modalidades, uma única administração de uma composição compreendendo um RNA guia aqui fornecido é suficiente para eliminar a expressão da proteína mutante em uma população de células. Em outras modalidades, mais de uma administração de uma composição compreendendo um RNA guia aqui fornecido pode ser benéfica para maximizar a edição via efeitos cumulativos. Por exemplo, uma composição aqui fornecida pode ser administrada 2, 3, 4, 5 ou mais vezes, como 2 vezes. As administrações podem ser separadas por um período que varia de, por exemplo, 1 dia a 2 anos, como 1 a 7 dias, 7 a 14 dias, 14 dias a 30 dias, 30 dias a 60 dias, 60 dias a 120 dias, 120 dias a 183 dias, 183 dias a 274 dias, 274 dias a 366 dias ou 366 dias a 2 anos.

[00101] Em algumas modalidades, uma composição é administrada em uma quantidade eficaz na faixa de 0,01 a 10 mg/kg (mpk), por exemplo, 0,01 a 0,1 mpk, 0,1 a 0,3 mpk, 0,3 a 0,5 mpk, 0,5 a 1 mpk, 1 a 2 mpk, 2 a 3 mpk, 3 a 5 mpk, 5 a 10 mpk ou 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 5 ou 10 mpk.

[00102] Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento com as composições da invenção é vista em 1 ano, 2 anos, 3 anos, 4 anos, 5 anos ou 10 anos após a distribuição. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento com as composições da invenção é avaliada

medindo os níveis séricos de TTR antes e após o tratamento. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento com as composições avaliadas via redução dos níveis séricos de TTR é observada em 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses ou 11 meses.

[00103] Em algumas modalidades, o tratamento diminui ou interrompe a progressão da doença.

[00104] Em algumas modalidades, o tratamento retarda ou interrompe a progressão da FAP. Em algumas modalidades, o tratamento resulta em melhora, estabilização ou retardo da mudança nos sintomas de neuropatia sensorial-motora. ou neuropatia autonômica.

[00105] Em algumas modalidades, o tratamento resulta em melhora, estabilização ou retardo da mudança nos sintomas da FAC. Em algumas modalidades, o tratamento resulta em melhora, estabilização ou retardo dos sintomas de alteração de cardiomiopatia restritiva ou insuficiência cardíaca congestiva.

[00106] Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento é medida pelo aumento do tempo de sobrevivência do sujeito.

[00107] Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento é medida pela melhora ou lentidão da progressão nos sintomas de neuropatia sensorial-motora. ou autonômica. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento é medida por um aumento ou retardo da diminuição da capacidade de mover uma área do corpo ou sentir em qualquer área do corpo. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento é medida por melhora ou retardo da diminuição da capacidade de engolir; respirar; usar braços, mãos, pernas ou pés; ou caminhar. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento é medida pela melhora ou um retardo da progressão da neuralgia. Em algumas modalidades, a

neuralgia é caracterizada por dor, queimação, formigamento ou sensação anormal. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento é medida pela melhora ou um retardo do aumento da hipotensão postural, tontura, dismotilidade gastrointestinal, disfunção da bexiga ou disfunção sexual. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento é medida pela melhora ou um retardo da progressão da fraqueza. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento é medida usando eletromiograma, testes de condução nervosa ou resultados relatados pelo paciente.

[00108] Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento é medida pela melhora ou retardo da progressão dos sintomas de insuficiência cardíaca congestiva ou CHF. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento é medida por uma diminuição ou retardo do aumento da falta de ar, dificuldade em respirar, fadiga ou inchaço nos tornozelos, pés, pernas, abdômen ou veias no pescoço. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento é medida pela melhora ou um retardo da progressão do acúmulo de líquidos no corpo, que pode ser avaliada por medidas como ganho de peso, micção frequente ou tosse noturna. Em algumas modalidades, a eficácia do tratamento é medida usando testes de biomarcadores cardíacos (como peptídeo natriurético do tipo B [BNP] ou peptídeo natriurético pro-tipo B do N-terminal [NT-proBNP]), testes de função pulmonar, radiografias, ou eletrocardiografia.

#### **A. Terapia de Combinação**

[00109] Em algumas modalidades, a invenção compreende terapias combinadas compreendendo qualquer um dos gRNAs compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia divulgadas na Tabela 1 ou qualquer um ou mais dos sgRNAs na Tabela 2 (por exemplo, em uma composição aqui fornecida) juntamente com uma terapia adicional adequada para aliviar os sintomas de ATTR.

[00110] Em algumas modalidades, a terapia adicional para ATTR é

um tratamento para neuropatia sensorial-motora. ou autonômica. Em algumas modalidades, o tratamento para neuropatia sensorial-motora. ou autonômica é uma droga anti-inflamatória não esteroide, antidepressiva, medicamento anticonvulsivante, medicamento antiarrítmico ou agente narcótico. Em algumas modalidades, o antidepressivo é um agente tricíclico ou um inibidor da recaptação de serotonina-noradrenalina. Em algumas modalidades, o antidepressivo é amitriptilina, duloxetina ou venlafaxina. Em algumas modalidades, o agente anticonvulsivante é gabapentina, pregabalina, topiramato ou carbamazepina. Em algumas modalidades, a terapia adicional para neuropatia sensorial-motora. é a estimulação elétrica nervosa transcutânea.

[00111] Em algumas modalidades, a terapia adicional para ATTR é um tratamento para cardiomiopatia restritiva ou insuficiência cardíaca congestiva (CHF). Em algumas modalidades, o tratamento para CHF é um inibidor de ACE, antagonista da aldosterona, bloqueador do receptor da angiotensina, bloqueador beta, digoxina, diurético ou dinitrato de isossorbida/cloridrato de hidralazina. Em algumas modalidades, o inibidor de ACE é enalapril, captopril, ramipril, perindopril, imidapril ou quinapril. Em algumas modalidades, o antagonista da aldosterona é eplerenona ou espironolactona. Em algumas modalidades, o bloqueador do receptor da angiotensina é azilsartana, cadesartana, eprosartana, irbesartana, losartana, olmesartana, telmisartana ou valsartana. Em algumas modalidades, o betabloqueador é acebutolol, atenolol, bisoprolol, metoprolol, nadolol, nebivolol ou propranolol. Em algumas modalidades, o diurético é clorotiazida, clortalidona, hidroclorotiazida, indapamida, metolazona, bumetanida, furosemida, torsemida, amilorida ou triametereno.

[00112] Em algumas modalidades, a terapia de combinação compreende qualquer um dos gRNAs compreendendo uma ou mais das

sequências guia divulgadas na Tabela 1 ou qualquer um ou mais dos sgRNAs na Tabela 2 (por exemplo, em uma composição fornecida aqui) juntamente com um siRNA que direciona TTR ou TTR mutante. Em algumas modalidades, o siRNA é qualquer siRNA capaz de reduzir ou eliminar ainda mais a expressão de TTR de tipo selvagem ou mutante. Em algumas modalidades, o siRNA é a droga Patisirana (ALN-TTR02) ou ALN-TTRsc02. Em algumas modalidades, o siRNA é administrado após qualquer um dos gRNAs compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia divulgadas na Tabela 1 ou qualquer um ou mais dos sgRNAs na Tabela 2 (por exemplo, em uma composição aqui fornecida). Em algumas modalidades, o siRNA é administrado regularmente após o tratamento com qualquer uma das composições de gRNA fornecidas neste documento.

[00113] Em algumas modalidades, a terapia de combinação compreende qualquer um dos gRNAs compreendendo uma ou mais das sequências guia divulgadas na Tabela 1 ou qualquer um ou mais dos sgRNAs na Tabela 2 (por exemplo, em uma composição fornecida aqui) juntamente com um nucleotídeo antissentido que direciona TTR ou TTR mutante. Em algumas modalidades, o nucleotídeo antissentido é qualquer nucleotídeo antissentido capaz de reduzir ou eliminar ainda mais a expressão de TTR de tipo selvagem ou mutante. Em algumas modalidades, o nucleotídeo antissentido é o medicamento Inoterseno (IONS-TTRRx). Em algumas modalidades, o nucleotídeo antissentido é administrado após qualquer um dos gRNAs compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia divulgadas na Tabela 1 ou qualquer um ou mais dos sgRNAs na Tabela 2 (por exemplo, em uma composição aqui fornecida). Em algumas modalidades, o nucleotídeo antissentido é administrado regularmente após o tratamento com qualquer uma das composições de gRNA fornecidas neste documento.

[00114] Em algumas modalidades, a terapia de combinação

compreende qualquer um dos gRNAs que compreende qualquer uma ou mais das sequências guia divulgadas na Tabela 1 ou qualquer um ou mais dos sgRNAs na Tabela 2 (por exemplo, em uma composição aqui fornecida) juntamente com um estabilizador de moléculas pequenas que promove a estabilização cinética da forma tetramérica corretamente dobrada de TTR. Em algumas modalidades, o estabilizador de moléculas pequenas é a droga tafamidis (Vyndaqel®) ou diflunisal. Em algumas modalidades, o estabilizador de moléculas pequenas é administrado após qualquer um dos gRNAs compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia divulgadas na Tabela 1 ou qualquer um ou mais dos sgRNAs na Tabela 2 (por exemplo, em uma composição aqui fornecida). Em algumas modalidades, o estabilizador de moléculas pequenas é administrado regularmente após o tratamento com qualquer uma das composições de gRNA fornecidas neste documento.

#### **B. Distribuição de composições de gRNA**

[00115] Em algumas modalidades, as composições de RNA guia descritas aqui, sozinhas ou codificadas em um ou mais vetores, são formuladas ou administradas através de uma nanopartícula lipídica; ver, por exemplo, PCT/US2017/024973, depositado em 30 de março de 2017, intitulado “LIPID NANOPARTICLE FORMULATIONS FOR CRISPR/CAS COMPONENTS,” cujo conteúdo é incorporado por referência na sua totalidade. Qualquer nanopartícula lipídica (LNP) conhecida por aqueles versados na técnica como capaz de fornecer nucleotídeos a sujeitos pode ser utilizada com os RNAs guia aqui descritos, bem como o mRNA que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, como Cas ou Cas9, ou uma nuclease de DNA guiado por RNA, como a própria proteína Cas ou Cas9.

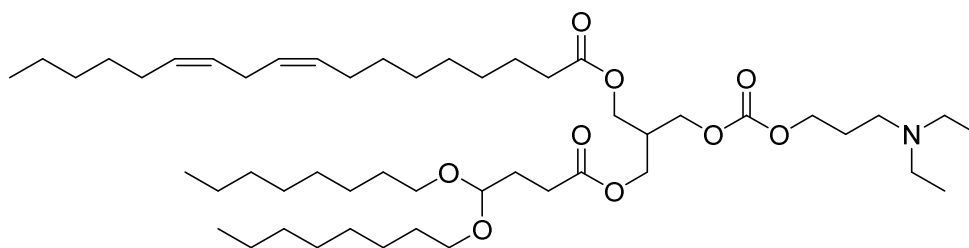
[00116] Aqui são divulgadas várias modalidades de formulações de LNP para RNAs, incluindo cargas CRISPR/Cas. Tais formulações de

LNP podem incluir (i) um lipídeo CCD, como um lipídeo amina, (ii) um lipídeo neutro, (iii) um lipídeo auxiliar e (iv) um lipídeo furtivo, como um lipídeo PEG. Algumas modalidades das formulações de LNP incluem um "lipídeo amina", juntamente com um lipídeo auxiliar, um lipídeo neutro e um lipídeo furtivo, como um lipídeo PEG. Por "nanopartícula lipídica" entende-se uma partícula que compreende uma pluralidade de (isto é, mais de uma) moléculas lipídicas fisicamente associadas entre si por forças intermoleculares.

#### Lipídeos CCD

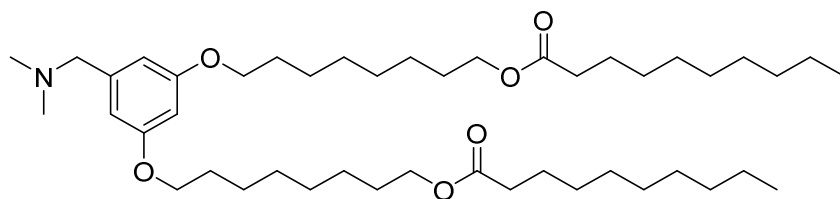
[00117] As composições lipídicas para distribuição de mRNA de CRISPR/Cas e componentes de RNA guia para uma célula hepática compreendem um lipídeo CCD.

[00118] Em algumas modalidades, o lipídeo do CCD é o lipídeo A, que é (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato, também chamado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato. O lipídeo A pode ser descrito como:



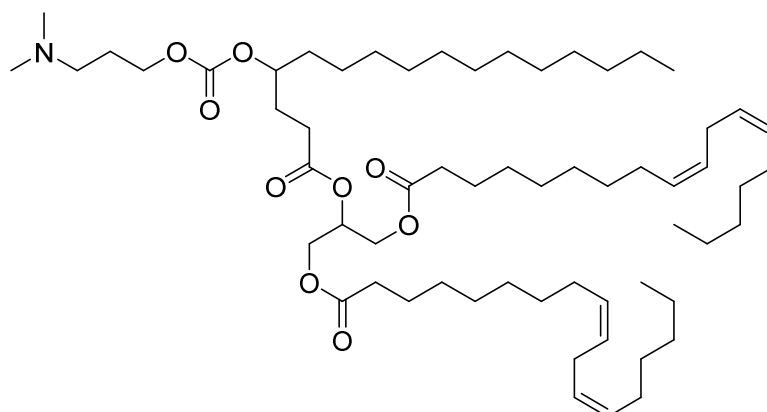
[00119] O lipídeo A pode ser sintetizado de acordo com WO2015/095340 (por exemplo, pp. 84-86).

[00120] Em algumas modalidades, o lipídeo CCD é o lipídeo B, que é ((5-((dimetilamino)metil)-1,3-fenileno)bis(oxi))bis(octano-8,1-di-il)bis(decanoato), também chamado ((5-((dimetilamino)metil)-1,3-fenileno)bis(oxi))bis(octano-8,1-di-il)bis(decanoato). O lipídeo B pode ser descrito como:



[00121] O lipídeo B pode ser sintetizado de acordo com WO2014/136086 (por exemplo, pp. 107-09).

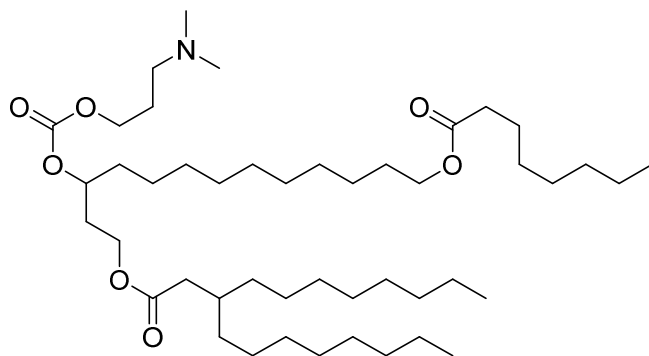
[00122] Em algumas modalidades, o lipídeo CCD é o lipídeo C, que é 2-((4-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)hexadecanoil)oxi)propano-1,3-di-il (9Z,9'Z,12Z, 12'Z)-bis(octadeca-9,12-dienoato). O lipídeo C pode ser



descrito como:

[00123] Em algumas modalidades, o lipídeo CCD é o lipídeo D, que é 3-(((3-(dimetilamino) propoxi)carbonil)oxi)-13-(octanoiloxi)tridecil 3-octilundecanoato.

[00124] O lipídeo D pode ser descrito como:



[00125] O lipídeo C e o lipídeo D podem ser sintetizados de acordo com WO2015/095340.

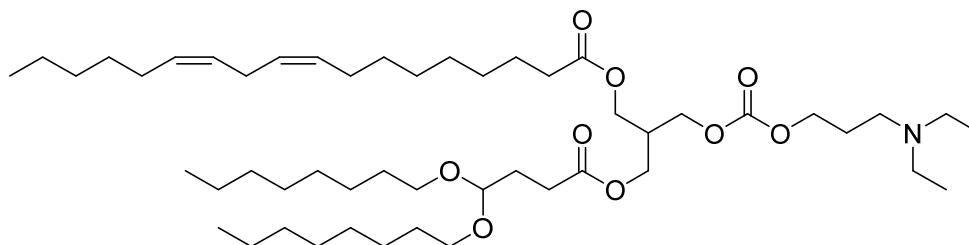
[00126] O lipídeo CCD também pode ser equivalente ao lipídeo A,

lipídeo B, lipídeo C ou lipídeo D. Em certas modalidades, o lipídeo CCD é equivalente ao lipídeo A, um equivalente ao lipídeo B, um equivalente ao lipídeo C ou um equivalente ao lipídeo D.

[00127] Lipídeos de amina

[00128] Em algumas modalidades, as composições de LNP para a distribuição de agentes biologicamente ativos compreendem um "lipídeo amina", que é definido como lipídeo A, lipídeo B, lipídeo C, lipídeo D ou equivalentes de lipídeo A (incluindo análogos acetais do lipídeo A), equivalentes de lipídeo B, equivalentes de lipídeo C e equivalentes de lipídeo D.

[00129] Em algumas modalidades, o lipídeo de amina é o lipídeo A, que é (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato, também chamado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato. O lipídeo A pode ser descrito como:



[00130] O lipídeo A pode ser sintetizado de acordo com WO2015/095340 (por exemplo, pp. 84-86). Em certas modalidades, o lipídeo de amina é equivalente ao lipídeo A.

[00131] Em certas modalidades, um lipídeo de amina é um análogo do lipídeo A. Em certas modalidades, um análogo de lipídeo A é um análogo acetal do lipídeo A. Em determinadas composições de LNP, o análogo acetal é um análogo acetal C4-C12. Em algumas modalidades, o análogo acetal é um análogo acetal C5-C12. Em modalidades adicionais, o análogo acetal é um análogo acetal C5-C10. Em outras

modalidades, o análogo acetal é escolhido dentre um análogo acetal de C4, C5, C6, C7, C9, C10, C11 e C12.

[00132] Os lipídeos de amina adequados para utilização nas LNPs aqui descritas são biodegradáveis *in vivo*. Os lipídeos de aminas têm baixa toxicidade (por exemplo, são tolerados em modelos animais sem efeito adverso em quantidades maiores ou iguais a 10 mg/kg). Em certas modalidades, as LNPs compreendendo um lipídeo de amina incluem aquelas em que pelo menos 75% do lipídeo de amina é removido do plasma dentro de 8, 10, 12, 24 ou 48 horas ou 3, 4, 5, 6, 7 ou 10 dias. Em certas modalidades, as LNPs que compreendem um lipídeo de amina incluem aquelas em que pelo menos 50% do mRNA ou do gRNA são eliminados do plasma dentro de 8, 10, 12, 24 ou 48 horas ou 3, 4, 5, 6, 7, ou 10 dias. Em certas modalidades, as LNPs compreendendo um lipídeo de amina incluem aquelas em que pelo menos 50% da LNP é eliminado do plasma dentro de 8, 10, 12, 24 ou 48 horas ou 3, 4, 5, 6, 7 ou 10 dias, por exemplo, medindo um lipídeo (por exemplo, um lipídeo de amina), RNA (por exemplo, mRNA) ou outro componente. Em certas modalidades, o componente lipídeo encapsulado em lipídeo versus lipídeo livre, RNA ou ácido nucleico do LNP é medido.

[00133] A depuração lipídica pode ser medida como descrito na literatura. Ver Maier, MA, *et al.* Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. *Mol. Ther.* 2013, 21(8), 1570-78 (“Maier”). Por exemplo, em Maier, os sistemas LNP-siRNA contendo siRNA direcionado às luciferases foram administrados a camundongos machos C57Bl/6 de seis a oito semanas de idade a 0,3 mg/kg por injeção intravenosa em bolus via veia da cauda lateral. Amostras de sangue, fígado e baço foram coletadas em 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 e 168 horas após a dose. Os camundongos foram perfundidos com solução salina

antes da coleta de tecido e as amostras de sangue foram processadas para obter plasma. Todas as amostras foram processadas e analisadas por LC-MS. Além disso, Maier descreve um procedimento para avaliar a toxicidade após a administração de formulações de LNP-siRNA. Por exemplo, um siRNA direcionado à luciferase foi administrado a 0, 1, 3, 5 e 10 mg/kg (5 animais/grupo) via injeção intravenosa em bolus intravenosa a um volume de dose de 5 mL/kg em ratos Sprague-Dawley machos. Após 24 horas, cerca de 1 mL de sangue foi obtido da veia jugular de animais conscientes e o soro foi isolado. 72 horas após a dose, todos os animais foram sacrificados para necrópsia. Foi realizada avaliação de sinais clínicos, peso corporal, química sérica, pesos de órgãos e histopatologia. Embora Maier descreva métodos para avaliar formulações de siRNA-LNP, esses métodos podem ser aplicados para avaliar a depuração, farmacocinética e toxicidade da administração de composições de LNP da presente divulgação.

[00134] Os lipídeos de amina levam a um aumento da taxa de depuração. Em algumas modalidades, a taxa de depuração é uma taxa de depuração lipídica, por exemplo, a taxa na qual um lipídeo de amina é eliminado do sangue, soro ou plasma. Em algumas modalidades, a taxa de depuração é uma taxa de depuração de RNA, por exemplo, a taxa na qual um mRNA ou um gRNA é eliminado do sangue, soro ou plasma. Em algumas modalidades, a taxa de depuração é a taxa na qual a LNP é eliminada do sangue, soro ou plasma. Em algumas modalidades, a taxa de depuração é a taxa na qual a LNP é eliminada de um tecido, como tecido do fígado ou tecido do baço. Em certas modalidades, uma alta taxa de depuração leva a um perfil de segurança sem efeitos adversos substanciais. Os lipídeos da amina reduzem o acúmulo de LNP na circulação e nos tecidos. Em algumas modalidades, uma redução no acúmulo de LNP na circulação e nos tecidos leva a um perfil de segurança sem efeitos adversos substanciais.

[00135] Os lipídeos de amina da presente divulgação podem ser ionizáveis dependendo do pH do meio em que estão. Por exemplo, em um meio levemente ácido, os lipídeos de amina podem ser protonados e, assim, carregar uma carga positiva. Por outro lado, em um meio ligeiramente básico, como, por exemplo, sangue onde o pH é de aproximadamente 7,35, os lipídeos de amina podem não ser protonados e, portanto, não têm carga. Em algumas modalidades, os lipídeos de amina da presente divulgação podem ser protonados a um pH de pelo menos cerca de 9. Em algumas modalidades, os lipídeos de amina da presente divulgação podem ser protonados a um pH de pelo menos cerca de 9. Em algumas modalidades, os lipídeos de amina da presente divulgação podem ser protonados a um pH de pelo menos cerca de 10.

[00136] A capacidade de um lipídeo de amina suportar uma carga está relacionada ao seu pKa intrínseco. Por exemplo, os lipídeos de amina da presente divulgação podem cada um, independentemente, ter um pKa na faixa de cerca de 5,8 a cerca de 6,2. Por exemplo, os lipídeos de amina da presente divulgação podem cada um, independentemente, ter um pKa na faixa de cerca de 5,8 a cerca de 6,5. Isto pode ser vantajoso, pois foi descoberto que lipídeos catiônicos com um pKa variando entre 5,1 e 7,4 são eficazes para a distribuição de carga in vivo, por exemplo, para o fígado. Além disso, verificou-se que lipídeos catiônicos com um pKa variando entre cerca de 5,3 e cerca de 6,4 são eficazes para a distribuição in vivo, por exemplo, para tumores. Ver, por exemplo, WO2014/136086.

#### Lipídeos adicionais

[00137] "Lipídeos neutros" adequados para uso em uma composição lipídica da divulgação incluem, por exemplo, uma variedade de lipídeos neutros, não carregados ou zwitteriônicos. Exemplos de fosfolipídeos neutros adequados para uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, 5-heptadecilbenzeno-1,3-diol (resorcinol),

dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), pofosfolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), fosfatidilcolina (PLPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina de ovo (EPC), dilaurililfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina (PMPC), 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina (PSPC), 1,2-diaracidilol -3-fosfocolina (DBPC), 1-estearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina (SPPC), 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC), palmitoilolilfosfatidilcolina (POPC), lisofosfatidilcolina, dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), dilinoleoilfosfatidilcolina distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), palmitoiloleoil fosfatidiletanolamina (POPE), lisofosfatidiletanolamina e combinações dos mesmos. Numa modalidade, o fosfolípídeo neutro pode ser selecionado do grupo que consiste em distearoilfosfatidilcolina (DSPC) e dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPE). Noutra modalidade, o fosfolípídeo neutro pode ser distearoilfosfatidilcolina (DSPC).

[00138] Os "lipídeos auxiliares" incluem esteroides, esteróis e alquil resorcinóis. Os lipídeos auxiliares adequados para uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, colesterol, 5-heptadecilresorcinol e hemissuccinato de colesterol. Numa modalidade, o lipídeo auxiliar pode ser colesterol. Numa modalidade, o lipídeo auxiliar pode ser hemissuccinato de colesterol.

[00139] "Lipídeos furtivos" são lipídeos que alteram o período de tempo em que as nanopartículas podem existir in vivo (por exemplo, no sangue). Os lipídeos furtivos podem ajudar no processo de formulação, por exemplo, reduzindo a agregação de partículas e controlando o tamanho das partículas. Os lipídeos furtivos aqui utilizados podem modular as propriedades farmacocinéticas do LNP. Os lipídeos furtivos

adequados para uso em uma composição lipídica da divulgação incluem, mas não estão limitados a, lipídeos furtivos com um grupo principal hidrofílico ligado a uma fração lipídica. Lipídeos furtivos adequados para uso em uma composição lipídica da presente divulgação e informações sobre a bioquímica de tais lipídeos podem ser encontrados em Romberg *et al.*, *Pharmaceutical Research*, Vol. 25, No. 1, 2008, pg. 55-71 e Hoekstra *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52. Lipídeos de PEG adequados adicionais são divulgados, por exemplo, em WO 2006/007712.

[00140] Em uma modalidade, o grupo principal hidrofílico de lipídeo furtivo compreende uma fração de polímero selecionada de polímeros baseados em PEG. Os lipídeos furtivos podem compreender uma fração lipídica. Em algumas modalidades, o lipídeo furtivo é um lipídeo PEG.

[00141] Em uma modalidade, um lipídeo furtivo compreende uma fração de polímero selecionada de polímeros baseados em PEG (às vezes chamado de poli(óxido de etileno)), poli(oxazolina), poli(álcool vinílico), poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poliaminoácidos e poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida].

[00142] Numa modalidade, o lipídeo PEG compreende uma fração de polímero à base de PEG (às vezes referido como poli(óxido de etileno)).

[00143] O lipídeo PEG compreende ainda uma fração lipídica. Em algumas modalidades, a fração lipídica pode ser derivada de diacilglicerol ou diacilglicamida, incluindo aqueles que compreendem um grupo dialquilglicerol ou dialquilglicamida com comprimento de cadeia alquil independentemente compreendendo de cerca de C4 a cerca de C40 átomos de carbono saturados ou insaturados, em que a cadeia pode compreender um ou mais átomos de carbono funcionais grupos como, por exemplo, uma amida ou éster. Em algumas modalidades, o comprimento da cadeia alquil compreende cerca de C10

a C20. O grupo dialquilglicerol ou dialquilglicamida pode ainda compreender um ou mais grupos alquil substituídos. Os comprimentos da corrente podem ser simétricos ou assimétricos.

[00144] Salvo indicação em contrário, o termo "PEG", conforme usado aqui, significa qualquer polietileno glicol ou outro polímero de éter polialquilenos. Numa modalidade, o PEG é um polímero linear ou ramificado opcionalmente substituído de etileno glicol ou óxido de etileno. Numa modalidade, o PEG não é substituído. Em uma modalidade, o PEG é substituído, por exemplo, por um ou mais grupos alquil, alcoxi, acil, hidroxil ou aril. Numa modalidade, o termo inclui copolímeros de PEG, como PEG-poliuretano ou PEG-polipropileno (ver, por exemplo, J. Milton Harris, *Poli(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications* (1992)); em outra modalidade, o termo não inclui copolímeros de PEG. Em uma modalidade, o PEG tem um peso molecular de cerca de 130 a cerca de 50.000, em uma sub-modalidade, cerca de 150 a cerca de 30.000, em uma sub-modalidade, cerca de 150 a cerca de 20.000, em uma sub-modalidade de cerca de 150 a cerca de 15.000, em uma sub-modalidade, cerca de 150 a cerca de 10.000, em uma sub-modalidade, cerca de 150 a cerca de 6.000, em uma sub-modalidade, cerca de 150 a cerca de 5.000, em uma sub-modalidade, cerca de 150 a cerca de 4.000, em uma sub-modalidade, cerca de 150 a cerca de 3.000, em uma sub-modalidade, cerca de 300 a cerca de 3.000, em uma sub-modalidade, cerca de 1.000 a cerca de 3.000 e em uma sub-modalidade, cerca de 1.500 a cerca de 2.500.

[00145] Em certas modalidades, o PEG (por exemplo, conjugado a uma fração lipídica ou lipídeo, como um lipídeo furtivo), é um "PEG-2K", também denominado "PEG 2000", que tem um peso molecular médio de cerca de 2.000 daltons. O PEG-2K é representado aqui pela seguinte fórmula (I), em que  $n$  é 45, significando que o grau médio de

polimerização do número compreende cerca de 45 subunidades. No entanto, outras modalidades de PEG conhecidas na técnica podem ser usadas, incluindo, por exemplo, aquelas em que o grau médio de polimerização compreende cerca de 23 subunidades ( $n = 23$ ) e/ou 68 subunidades ( $n = 68$ ). Em algumas modalidades,  $n$  pode variar de cerca de 30 a cerca de 60. Em algumas modalidades,  $n$  pode variar de cerca de 35 a cerca de 55. Em algumas modalidades,  $n$  pode variar de cerca de 40 a cerca de 50. Em algumas modalidades,  $n$  pode variar de cerca de 42 a cerca de 48. Em algumas modalidades,  $n$  pode ser 45. Em algumas modalidades,  $R$  pode ser selecionado de  $H$ , alquil substituído e alquil não substituído. Em algumas modalidades,  $R$  pode ser alquil não substituído. Em algumas modalidades,  $R$  pode ser metil.

[00146] Em qualquer uma das modalidades aqui descritas, o lipídeo PEG pode ser selecionado de PEG-dilauroilglicerol, PEG-dimiristoilglicerol (PEG-DMG) (catálogo # GM-020 de NOF, Tóquio, Japão), PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-distearoilglicerol (PEG -DSPE) (catálogo # DSPE-020CN, NOF, Tóquio, Japão), PEG-dilaurilglicamida, PEG-dimiristilglicamida, PEG-dipalmitoilglicamida e PEG-distearoililglicida, PEG-distearoililglicida, PEG-colesterol (1-[8'-(Cholest-5-en-3[beta]-oxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil-[ômega]-metil-poli(etileno glicol), PEG-DMB (3,4-ditetradecoxilbenzil-[ômega]-metil-poli(etileno glicol)éter), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietileno glicol)-2000] (PEG2k-DMG) (cat. # 880150P de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EUA), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietileno glicol)-2000] (PEG2k-DSPE) (cat. # 880120C de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EUA), 1,2-distearoil-sn-glicerol, metoxipolietilenoglicol (PEG2k-DSG; GS-020, NOF Tóquio, Japão), poli (etileno glicol)-2000-dimetacrilato (PEG2k-DMA) e 1,2-disteariloxipropil-3-amina-N- [metoxi (polietileno glicol)-2000] (PEG2k-DSA). Numa modalidade, o lipídeo

PEG pode ser PEG2k-DMG. Em algumas modalidades, o lipídeo PEG pode ser PEG2k-DSG. Numa modalidade, o lipídeo PEG pode ser PEG2k-DSPE. Numa modalidade, o lipídeo PEG pode ser PEG2k-DMA. Numa modalidade, o lipídeo PEG pode ser PEG2k-C-DMA. Em uma modalidade, o lipídeo PEG pode ser o composto S027, divulgado em WO2016/010840 (parágrafos [00240] a [00244]). Numa modalidade, o lipídeo PEG pode ser PEG2k-DSA. Numa modalidade, o lipídeo PEG pode ser PEG2k-C11. Em algumas modalidades, o lipídeo PEG pode ser PEG2k-C14. Em algumas modalidades, o lipídeo PEG pode ser PEG2k-C16. Em algumas modalidades, o lipídeo PEG pode ser PEG2k-C18.

#### Formulações LNP

[00147] A LNP pode conter (i) um lipídeo de amina para encapsulamento e escape endossômico, (ii) um lipídeo neutro para estabilização, (iii) um lipídeo auxiliar, também para estabilização e (iv) um lipídeo furtivo, como um lipídeo PEG.

[00148] Em algumas modalidades, uma composição de LNP pode compreender um componente de RNA que inclui um ou mais de um agente de ligação a DNA guiado a RNA, um mRNA de Cas nuclease, um mRNA de Cas nuclease Classe 2, um mRNA de Cas9 e um gRNA. Em algumas modalidades, uma composição de LNP pode incluir uma Cas nuclease Classe 2 e um gRNA como componente de RNA. Em certas modalidades, uma composição de LNP pode compreender o componente de RNA, um lipídeo de amina, um lipídeo auxiliar, um lipídeo neutro e um lipídeo furtivo. Em certas composições de LNP, o lipídeo auxiliar é o colesterol. Em outras composições, o lipídeo neutro é DSPC. Em modalidades adicionais, o lipídeo furtivo é PEG2k-DMG ou PEG2k-C11. Em certas modalidades, a composição de LNP compreende lipídeo A ou um equivalente de lipídeo A; um lípido auxiliar; um lípido neutro; um lípido furtivo; e um RNA guia. Em certas

composições, o lipídeo amina é o lipídeo A. Em certas composições, o lipídeo de amina é o lipídeo A ou um análogo acetal do mesmo; o lipídeo auxiliar é o colesterol; o lipídeo neutro é DSPC; e o lípido furtivo é o PEG2k-DMG.

[00149] Em certas modalidades, as composições lipídicas são descritas de acordo com as respectivas razões molares dos lipídeos componentes na formulação. Modalidades da presente divulgação fornecem composições lipídicas descritas de acordo com as respectivas razões molares dos lipídeos componentes na formulação. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo de amina pode ser de cerca de 30% em mol a cerca de 60% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo amina pode ser de cerca de 40% em mol a cerca de 60% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo de amina pode ser de cerca de 45% em mol a cerca de 60% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo de amina pode ser de cerca de 50% em mol a cerca de 60% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo amina pode ser de cerca de 55% em mol a cerca de 60% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo amina pode ser de cerca de 50% em mol a cerca de 55% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo de amina pode ser de cerca de 50% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo de amina pode ser de cerca de 55% em mol. Em algumas modalidades, a amina lipídica em % em mol do lote de LNP será de  $\pm 30\%$ ,  $\pm 25\%$ ,  $\pm 20\%$ ,  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$  ou  $\pm 2,5\%$  da % em mol alvo. Em algumas modalidades, a amina lipídica em % em mol do lote de LNP será de  $\pm 4\%$  em mol,  $\pm 3\%$  em mol,  $\pm 2\%$  em mol,  $\pm 1,5\%$  em mol,  $\pm 1\%$  em mol,  $\pm 0,5\%$  em mol, ou  $\pm 0,25\%$  em mol da % em mol alvo. Todos os números de % em mol são dados como uma fração do componente lipídico das composições de LNP. Em certas modalidades, a variabilidade entre lotes de LNP da amina lipídica em % em mol será menor que 15%, menor que 10% ou menor que 5%.

[00150] Numa modalidade, a % em mol do lipídeo neutro pode estar entre cerca de 5% em mol e cerca de 15% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo neutro pode ser de cerca de 7% em mol a cerca de 12% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo neutro pode ser de cerca de 9% em mol. Em algumas modalidades, o lipídeo neutro em % em mol do lote de LNP será de  $\pm 30\%$ ,  $\pm 25\%$ ,  $\pm 20\%$ ,  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$  ou  $\pm 2,5\%$  da % em mol de lipídeo neutro alvo. Em certas modalidades, a variabilidade entre lotes de LNP em mol será menor que 15%, menor que 10% ou menor que 5%.

[00151] Numa modalidade, a % em mol do lipídeo auxiliar pode ser de cerca de 20% em mol a cerca de 60% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo auxiliar pode ser de cerca de 25% em mol a cerca de 55% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo auxiliar pode ser de cerca de 25% em mol a cerca de 50% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo auxiliar pode ser de cerca de 25% em mol a cerca de 40% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo auxiliar pode ser de cerca de 30% em mol a cerca de 50% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo auxiliar pode ser de cerca de 30% em mol a cerca de 40% em mol. Em uma modalidade, a % em mol do lipídeo auxiliar é ajustada com base nas concentrações de lipídeo de amina, lipídeo neutro e lipídeo PEG para levar o componente lipídico a 100% em mol. Em algumas modalidades, o auxiliar em % em mol do lote de LNP será de  $\pm 30\%$ ,  $\pm 25\%$ ,  $\pm 20\%$ ,  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$  ou  $\pm 2,5\%$  da % em mol alvo. Em certas modalidades, a variabilidade entre lotes de LNP em mol será menor que 15%, menor que 10% ou menor que 5%.

[00152] Numa modalidade, a % em mol do lipídeo PEG pode ser de cerca de 1% em mol a cerca de 10% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo PEG pode ser de cerca de 2% em mol a cerca de 10% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo PEG pode ser

de cerca de 2% em mol a cerca de 8% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo PEG pode ser de cerca de 2% em mol a cerca de 4% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo PEG pode ser de cerca de 2,5% em mol a cerca de 4% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo PEG pode ser de cerca de 3% em mol. Numa modalidade, a % em mol do lipídeo PEG pode ser de cerca de 2,5% em mol. Em algumas modalidades, o lipídeo PEG em % em mol do lote de LNP será de  $\pm 30\%$ ,  $\pm 25\%$ ,  $\pm 20\%$ ,  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$  ou  $\pm 2,5\%$  da % em mol de lipídeo PEG alvo. Em certas modalidades, a variabilidade entre lotes de LNP em mol será menor que 15%, menor que 10% ou menor que 5%.

[00153] Em certas modalidades, a carga inclui um mRNA que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA (por exemplo, uma Cas nuclease, uma Cas nuclease Classe 2 ou Cas9) e um gRNA ou um ácido nucleico que codifica um gRNA ou uma combinação de mRNA e gRNA. Numa modalidade, uma composição de LNP pode compreender um lipídeo A ou seus equivalentes. Em alguns aspectos, o lipídeo amina é o lipídeo A. Em alguns aspectos, o lipídeo amina é um equivalente do lipídeo A, por exemplo, um análogo do lipídeo A. Em certos aspectos, o lipídeo amina é um análogo acetal do lipídeo A. Em várias modalidades, uma composição de LNP compreende um lipídeo amina, um lipídeo neutro, um lipídeo auxiliar e um lipídeo PEG. Em certas modalidades, o lipídeo auxiliar é o colesterol. Em certas modalidades, o lipídeo neutro é DSPC. Em modalidades específicas, o lipídeo PEG é PEG2k-DMG. Em algumas modalidades, uma composição de LNP pode compreender um lipídeo A, um lipídeo auxiliar, um lipídeo neutro e um lipídeo PEG. Em algumas modalidades, uma composição de LNP compreende um lipídeo amina, DSPC, colesterol e um lipídeo PEG. Em algumas modalidades, a composição de LNP compreende um lipídeo PEG compreendendo DMG. Em certas

modalidades, o lipídeo amina é selecionado do lipídeo A e um equivalente do lipídeo A, incluindo um análogo de acetal do lipídeo A. Em modalidades adicionais, uma composição de LNP compreende lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG.

[00154] Modalidades da presente divulgação também fornecem composições lipídicas descritas de acordo com a razão molar entre os grupos amina com carga positiva do lipídeo amina (N) e os grupos fosfato com carga negativa (P) do ácido nucleico a ser encapsulado. Isso pode ser matematicamente representado pela equação N/P. Em algumas modalidades, uma composição de LNP pode compreender um componente lipídico que compreende um lipídeo amina, um lipídeo auxiliar, um lipídeo neutro e um lipídeo auxiliar; e um componente de ácido nucleico, em que a razão N/P é de cerca de 3 a 10. Em algumas modalidades, uma composição de LNP pode compreender um componente lipídico que compreende um lipídeo amina, um lipídeo auxiliar, um lipídeo neutro e um lipídeo auxiliar; e um componente de RNA, em que a razão N/P é de cerca de 3 a 10. Numa modalidade, a razão N/P pode ser cerca de 5-7. Numa modalidade, a razão N/P pode ser cerca de 4,5-8. Numa modalidade, a razão N/P pode ser cerca de 6. Numa modalidade, a razão N/P pode ser  $6 \pm 1$ . Numa modalidade, a razão N/P pode ser cerca de  $6 \pm 0.5$ . Em algumas modalidades, a razão N/P será de  $\pm 30\%$ ,  $\pm 25\%$ ,  $\pm 20\%$ ,  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$  ou  $\pm 2,5\%$  da razão N/P alvo. Em certas modalidades, a variabilidade entre lotes de LNP em mol será menor que 15%, menor que 10% ou menor que 5%.

[00155] Em algumas modalidades, o componente de RNA pode compreender um mRNA, como um mRNA aqui divulgado, por exemplo, codificando uma Cas nuclease. Numa modalidade, o componente de RNA pode compreender um mRNA de Cas9. Em algumas composições compreendendo um mRNA que codifica uma Cas nuclease, a LNP compreende ainda um ácido nucleico de gRNA, como um gRNA. Em

algumas modalidades, o componente de RNA compreende um mRNA da Cas nuclease e um gRNA. Em algumas modalidades, o componente de RNA compreende um mRNA de Cas nuclease Classe 2 e um gRNA. [00156] Em certas modalidades, uma composição de LNP pode compreender um mRNA aqui divulgado, por exemplo, codificando uma Cas nuclease, como uma Cas nuclease Classe 2, um lipídeo de amina, um lipídeo auxiliar, um lipídeo auxiliar, um lipídeo neutro e um lipídeo PEG. Em certas composições de LNP compreendendo um mRNA que codifica uma Cas nuclease, tal como uma Cas nuclease Classe 2, o lipídeo auxiliar é o colesterol. Em outras composições compreendendo um mRNA que codifica uma Cas nuclease, tal como uma Cas nuclease Classe 2, o lípido neutro é DSPC. Em modalidades adicionais compreendendo um mRNA que codifica uma Cas nuclease, tal como uma Cas nuclease Classe 2, o lipídeo PEG é PEG2k-DMG ou PEG2k-C11. Em composições específicas que compreendem um mRNA que codifica uma Cas nuclease, tal como uma Cas nuclease Classe 2, o lipídeo amina é selecionado do lipídeo A e seus equivalentes, como um análogo acetal do lipídeo A.

[00157] Em algumas modalidades, uma composição de LNP pode compreender um gRNA. Em certas modalidades, uma composição de LNP pode compreender um lipídeo amina, um gRNA, um lipídeo auxiliar, um lipídeo neutro e um lipídeo PEG. Em certas composições de LNP compreendendo um gRNA, o lipídeo auxiliar é o colesterol. Em algumas composições compreendendo um gRNA, o lipídeo neutro é DSPC. Em modalidades adicionais compreendendo um gRNA, o lipídeo PEG é PEG2k-DMG ou PEG2k-C11. Em certas modalidades, o lipídeo amina é selecionado do lipídeo A e seus equivalentes, como um análogo acetal do lipídeo A.

[00158] Numa modalidade, uma composição de LNP pode compreender um sgRNA. Numa modalidade, uma composição de LNP

pode compreender um sgRNA de Cas9. Numa modalidade, uma composição de LNP pode compreender um sgRNA de Cpf1. Em algumas composições compreendendo um sgRNA, a LNP inclui um lipídeo amina, um lipídeo auxiliar, um lipídeo neutro e um lipídeo PEG. Em certas composições compreendendo um sgRNA, o lipídeo auxiliar é o colesterol. Em outras composições compreendendo um sgRNA, o lipídeo neutro é DSPC. Em modalidades adicionais compreendendo um sgRNA, o lipídeo PEG é PEG2k-DMG ou PEG2k-C11. Em certas modalidades, o lipídeo amina é selecionado do lipídeo A e seus equivalentes, como análogos acetais do lipídeo A.

[00159] Em certas modalidades, uma composição de LNP compreende um mRNA que codifica uma Cas nuclease e um gRNA, que pode ser um sgRNA. Em uma modalidade, uma composição de LNP pode compreender um lipídeo amina, um mRNA que codifica uma Cas nuclease, um gRNA, um lipídeo auxiliar, um lipídeo neutro e um lipídeo PEG. Em certas composições compreendendo um mRNA que codifica uma nuclease de Cas e um gRNA, o lipídeo auxiliar é o colesterol. Em algumas composições compreendendo um mRNA que codifica uma Cas nuclease e um gRNA, o lipídeo neutro é DSPC. Em modalidades adicionais compreendendo um mRNA que codifica uma Cas nuclease e um gRNA, o lipídeo PEG é PEG2k-DMG ou PEG2k-C11. Em certas modalidades, o lipídeo amina é selecionado do lipídeo A e seus equivalentes, como análogos acetais do lipídeo A.

[00160] Em certas modalidades, as composições de LNP incluem um mRNA de Cas nuclease, como um mRNA de Cas Classe 2 e pelo menos um gRNA. Em certas modalidades, a composição de LNP inclui uma razão de gRNA para mRNA de Cas nuclease, como mRNA de Cas nuclease Classe 2 de cerca de 25:1 a cerca de 1:25. Em certas modalidades, a formulação de LNP inclui uma razão de gRNA para mRNA de Cas nuclease, como mRNA de Cas nuclease Classe 2 de

cerca de 10:1 a cerca de 1:10. Em certas modalidades, a formulação de LNP inclui uma razão de gRNA para mRNA de Cas nuclease, como mRNA de Cas nuclease Classe 2 de cerca de 8:1 a cerca de 1:8. Conforme medido aqui, as razões são em peso. Em algumas modalidades, a formulação de LNP inclui uma razão de gRNA para mRNA de Cas nuclease, como mRNA de Cas Classe 2 de cerca de 5:1 a cerca de 1:5. Em algumas modalidades, a faixa da razão é de cerca de 3:1 a 1:3, cerca de 2:1 a 1:2, cerca de 5:1 a 1:2, cerca de 5:1 a 1:1, cerca de 3:1 a 1:2, cerca de 3:1 a 1:1, cerca de 3:1, cerca de 2:1 a 1:1. Em algumas modalidades, a razão de gRNA para mRNA é de cerca de 3:1 ou cerca de 2:1. Em algumas modalidades, a razão de mRNA de gRNA para Cas nuclease, como a Cas nuclease Classe 2, é de cerca de 1:1. A razão pode ser de cerca de 25:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:10, ou 1:25.

[00161] As composições de LNP aqui divulgadas podem incluir um ácido nucleico modelo. O ácido nucleico modelo pode ser coformulado com um mRNA que codifica uma Cas nuclease, tal como um mRNA de Cas nuclease Classe 2. Em algumas modalidades, o ácido nucleico modelo pode ser coformulado com um RNA guia. Em algumas modalidades, o ácido nucleico modelo pode ser co-formulado com um mRNA que codifica uma Cas nuclease e um RNA guia. Em algumas modalidades, o ácido nucleico modelo pode ser formulado separadamente de um mRNA que codifica uma Cas nuclease ou um RNA guia. O ácido nucleico modelo pode ser distribuído com ou separadamente das composições de LNP. Em algumas modalidades, o ácido nucleico modelo pode ser de fita simples ou dupla, dependendo do mecanismo de reparo desejado. O modelo pode ter regiões de homologia para o DNA alvo ou para sequências adjacentes ao DNA alvo.

[00162] Em algumas modalidades, os LNPs são formados pela

mistura de uma solução aquosa de RNA com uma solução lipídica à base de solvente orgânico, por exemplo, 100% de etanol. Soluções ou solventes adequados incluem ou podem conter: água, PBS, tampão Tris, NaCl, tampão citrato, etanol, clorofórmio, éter dietílico, ciclohexano, tetra-hidrofurano, metanol, isopropanol. Um tampão farmacologicamente aceitável, por exemplo, para administração in vivo de LNPs, pode ser usado. Em certas modalidades, um tampão é usado para manter o pH da composição compreendendo LNPs em pH 6,5 ou acima. Em certas modalidades, um tampão é usado para manter o pH da composição compreendendo LNPs em pH 7,0 ou acima. Em certas modalidades, a composição tem um pH variando de cerca de 7,2 a cerca de 7,7. Em modalidades adicionais, a composição tem um pH variando de cerca de 7,3 a cerca de 7,7 ou variando de cerca de 7,4 a cerca de 7,6. Em outras modalidades, a composição tem um pH de cerca de 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6 ou 7,7. O pH de uma composição pode ser medido com uma sonda de micro pH. Em certas modalidades, um crioprotetor é incluído na composição. Exemplos não limitativos de crioprotetores incluem sacarose, trealose, glicerol, DMSO e etileno glicol. Composições exemplificativas podem incluir até 10% de crioprotetor, como, por exemplo, sacarose. Em certas modalidades, a composição de LNP pode incluir cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10% de crioprotetor. Em certas modalidades, a composição de LNP pode incluir cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10% de sacarose. Em algumas modalidades, a composição de LNP pode incluir um tampão. Em algumas modalidades, o tampão pode compreender um tampão fosfato (PBS), um tampão Tris, um tampão citrato e misturas dos mesmos. Em certas modalidades exemplificativas, o tampão compreende NaCl. Em certas modalidades, o NaCl é omitido. Quantidades exemplificativas de NaCl podem variar de cerca de 20 mM a cerca de 45 mM. Quantidades exemplificativas de NaCl podem variar de cerca de 40 mM a cerca de

50 mM. Em algumas modalidades, a quantidade de NaCl é de cerca de 45 mM. Em algumas modalidades, o tampão é um tampão Tris. Quantidades exemplificativas de Tris podem variar de cerca de 20 mM a cerca de 60 mM. Quantidades exemplificativas de Tris podem variar de cerca de 40 mM a cerca de 60 mM. Em algumas modalidades, a quantidade de Tris é de cerca de 50 mM. Em algumas modalidades, o tampão compreende NaCl e Tris. Certas modalidades exemplificativas das composições de LNP contêm sacarose a 5% e NaCl 45 mM em tampão Tris. Em outras modalidades exemplificativas, as composições contêm sacarose em uma quantidade de cerca de 5% p/v, cerca de NaCl 45 mM e cerca de Tris 50 mM a pH 7,5. As quantidades de sal, tampão e crioprotetor podem variar de tal modo que a osmolalidade da formulação geral seja mantida. Por exemplo, a osmolaridade final pode ser mantida em menos de 450 mOsm/L. Em outras modalidades, a osmolaridade está entre 350 e 250 mOsm/L. Certas modalidades têm uma osmolalidade final de 300 +/- 20 mOsm/L.

[00163] Em algumas modalidades, mistura microfluídica, mistura T ou mistura cruzada é usada. Em certos aspectos, as taxas de fluxo, tamanho da junção, geometria da junção, forma da junção, diâmetro do tubo, soluções e/ou concentrações de RNA e lipídeos podem variar. As composições de LNP ou LNP podem ser concentradas ou purificadas, por exemplo, via diálise, filtração de fluxo tangencial ou cromatografia. Os LNPs podem ser armazenados como uma suspensão, uma emulsão ou um pó liofilizado, por exemplo. Em algumas modalidades, uma composição de LNP é armazenada a 2-8°C, em certos aspectos, as composições de LNP são armazenadas à temperatura ambiente. Em modalidades adicionais, uma composição de LNP é armazenada congelada, por exemplo, a -20°C ou -80°C. Em outras modalidades, uma composição de LNP é armazenada a uma temperatura variando de cerca de 0°C a cerca de -80°C. As composições de LNP congeladas

podem ser descongeladas antes do uso, por exemplo no gelo, a 4°C, à temperatura ambiente ou a 25°C. As composições de LNP congeladas podem ser mantidas a várias temperaturas, por exemplo no gelo, a 4°C, à temperatura ambiente, a 25°C ou a 37°C.

[00164] Em algumas modalidades, uma composição de LNP tem mais de cerca de 80% de encapsulamento. Em algumas modalidades, uma composição de LNP tem um tamanho de partícula menor que cerca de 120 nm. Em algumas modalidades, uma composição de LNP tem um pdi menor que cerca de 0,2. Em algumas modalidades, pelo menos duas dessas características estão presentes. Em algumas modalidades, cada uma dessas três características está presente. Os métodos analíticos para determinar esses parâmetros são discutidos abaixo na seção geral de reagentes e métodos.

[00165] Em algumas modalidades, mistura microfluídica, mistura T ou mistura cruzada é usada. Em certos aspectos, as taxas de fluxo, tamanho da junção, geometria da junção, forma da junção, diâmetro do tubo, soluções e/ou concentrações de RNA e lipídeos podem variar. As composições de LNP ou LNP podem ser concentradas ou purificadas, por exemplo, via diálise ou cromatografia. Os LNPs podem ser armazenados como uma suspensão, uma emulsão ou um pó liofilizado, por exemplo. Em algumas modalidades, as composições de LNP são armazenadas a 2-8°C, em certos aspectos, as composições de LNP são armazenadas à temperatura ambiente. Em modalidades adicionais, a composição de LNP é armazenada congelada, por exemplo a -20°C ou -80°C. Em outras modalidades, a composição de LNP é armazenada a uma temperatura variando de 0°C a -80°C. As composições de LNP congeladas podem descongelar antes de usar, por exemplo, no gelo, à temperatura ambiente ou a 25°C.

[00166] A Dispersão Dinâmica da Luz ("DLS") pode ser usada para caracterizar o índice de polidispersividade ("pdi") e o tamanho das LNPs

da presente divulgação. A DLS mede a dispersão da luz resultante da submissão de uma amostra a uma fonte de luz. PDI, conforme determinado a partir de medições DLS, representa a distribuição do tamanho de partícula (em torno do tamanho médio de partícula) em uma população, com uma população perfeitamente uniforme tendo um PDI de zero. Em algumas modalidades, o pdi pode variar de 0,005 a 0,75. Em algumas modalidades, o pdi pode variar de 0,01 a 0,5. Em algumas modalidades, o pdi pode variar de 0,02 a 0,4. Em algumas modalidades, o pdi pode variar de 0,03 a 0,35. Em algumas modalidades, o pdi pode variar de 0,1 a 0,35.

[00167] Em algumas modalidades, os LNPs aqui divulgados têm um tamanho de 1 a 250 nm. Em algumas modalidades, os LNPs têm um tamanho de 10 a 200 nm. Em outras modalidades, os LNPs têm um tamanho de 20 a 150 nm. Em algumas modalidades, os LNPs têm um tamanho de 50 a 150 nm. Em algumas modalidades, os LNPs têm um tamanho de 50 a 100 nm. Em algumas modalidades, os LNPs têm um tamanho de 50 a 120 nm. Em algumas modalidades, os LNPs têm um tamanho de 75 a 150 nm. Em algumas modalidades, os LNPs têm um tamanho de 30 a 200 nm. Salvo indicação em contrário, todos os tamanhos aqui referidos são os tamanhos médios (diâmetros) das nanopartículas totalmente formadas, medidas por dispersão dinâmica da luz num Malvern Zetasizer. A amostra de nanopartículas é diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para que a taxa de contagem seja de aproximadamente 200-400 kcts. Os dados são apresentados como uma média ponderada da medida de intensidade. Em algumas modalidades, as LNPs são formadas com uma eficiência média de encapsulamento variando de 50% a 100%. Em algumas modalidades, as LNPs são formadas com uma eficiência média de encapsulamento variando de 50% a 70%. Em algumas modalidades, as LNPs são formadas com uma eficiência média de encapsulamento

variando de 70% a 90%. Em algumas modalidades, as LNPs são formadas com uma eficiência média de encapsulamento variando de 90% a 100%. Em algumas modalidades, as LNPs são formadas com uma eficiência média de encapsulamento variando de 75% a 95%.

[00168] Em algumas modalidades, as LNPs associadas aos gRNAs aqui divulgados são para uso na preparação de um medicamento para o tratamento de ATTR. Em algumas modalidades, as LNPs associadas aos gRNAs divulgados neste documento são para uso na preparação de um medicamento para reduzir ou impedir a acumulação e agregação de TTR em amiloides ou fibrilas amiloides em sujeitos com ATTR. Em algumas modalidades, as LNPs associadas aos gRNAs aqui divulgados são para uso na preparação de um medicamento para reduzir a concentração sérica de TTR. Em algumas modalidades, as LNPs associadas aos gRNAs aqui divulgados são para uso no tratamento de ATTR em um sujeito, como um mamífero, por exemplo, um primata como um humano. Em algumas modalidades, as LNPs associadas aos gRNAs aqui divulgados são para uso na redução ou prevenção da acumulação e agregação de TTR em amiloides ou fibrilas amiloides em sujeitos com ATTR, como um mamífero, por exemplo, um primata como um humano. Em algumas modalidades, as LNPs associadas aos gRNAs aqui divulgados são para uso na redução da concentração sérica de TTR em um sujeito, como um mamífero, por exemplo, um primata como um humano.

[00169] A eletroporação também é um meio bem conhecido para distribuição de carga, e qualquer metodologia de eletroporação pode ser usada para distribuição de qualquer um dos gRNAs aqui divulgados. Em algumas modalidades, a eletroporação pode ser usada para distribuir qualquer um dos gRNAs aqui divulgados e uma nuclease de DNA guiado por RNA, como Cas9, ou um mRNA que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, como Cas9.

[00170] Em algumas modalidades, a invenção compreende um método para distribuir qualquer um dos gRNAs aqui divulgados a uma célula ex vivo, em que o gRNA está associado a um LNP ou não associado a um LNP. Em algumas modalidades, o gRNA/LNP ou gRNA também está associado a uma nuclease de DNA guiado por RNA, como Cas9, ou um mRNA que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, como Cas9.

[00171] Em certas modalidades, a invenção compreende vetores de DNA ou RNA que codificam qualquer um dos RNAs guia compreendendo qualquer uma ou mais das sequências guia descritas aqui. Em algumas modalidades, além das sequências guia de RNA, os vetores compreendem ainda ácidos nucleicos que não codificam RNAs guia. Os ácidos nucleicos que não codificam o RNA guia incluem, mas não estão limitados a, promotores, intensificadores, sequências reguladoras e ácidos nucleicos que codificam uma nuclease de DNA guiado por RNA, que pode ser uma nuclease como Cas9. Em algumas modalidades, o vetor compreende uma ou mais sequência(s) de nucleotídeos que codificam um crRNA, um trRNA ou um crRNA e trRNA. Em algumas modalidades, o vetor compreende uma ou mais sequência(s) de nucleotídeos que codificam um sgRNA e um mRNA que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, que pode ser uma Cas nuclease, como Cas9 ou Cpf1. Em algumas modalidades, o vetor compreende uma ou mais sequência(s) de nucleotídeos que codificam um crRNA, um trRNA e um mRNA que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, que pode ser uma proteína Cas, como Cas9. Numa modalidade, o Cas9 é de *Streptococcus pyogenes* (isto é, Spy Cas9). Em algumas modalidades, a sequência nucleotídica que codifica o crRNA, trRNA ou crRNA e trRNA (que pode ser um sgRNA) compreende ou consiste em uma sequência guia flanqueada por toda ou parte de uma sequência de repetição de um sistema CRISPR/Cas

de ocorrência natural. O ácido nucleico compreendendo ou consistindo no crRNA, trRNA ou crRNA e trRNA pode ainda compreender uma sequência de vetores em que a sequência de vetores compreende ou consiste em ácidos nucleicos que não são naturalmente encontrados juntos com o crRNA, trRNA ou crRNA e trRNA.

[00172] Em algumas modalidades, o crRNA e o trRNA são codificados por ácidos nucleicos não contíguos dentro de um vetor. Em outras modalidades, o crRNA e o trRNA podem ser codificados por um ácido nucleico contíguo. Em algumas modalidades, o crRNA e o trRNA são codificados por fitas opostas de um único ácido nucleico. Em outras modalidades, o crRNA e o trRNA são codificados pela mesma fita de um único ácido nucleico.

[00173] Em algumas modalidades, o vetor pode ser circular. Em outras modalidades, o vetor pode ser linear. Em algumas modalidades, o vetor pode ser encerrado em uma nanopartícula lipídica, lipossoma, nanopartícula não lipídica ou capsídeo viral. Os vetores exemplificativos não limitativos incluem plasmídeos, fagomídeos, cosmídeos, cromossomos artificiais, minicromossomos, transposons, vetores virais e vetores de expressão.

[00174] Em algumas modalidades, o vetor pode ser um vetor viral. Em algumas modalidades, o vetor viral pode ser geneticamente modificado a partir de sua contraparte do tipo selvagem. Por exemplo, o vetor viral pode compreender uma inserção, exclusão ou substituição de um ou mais nucleotídeos para facilitar a clonagem ou de modo que uma ou mais propriedades do vetor sejam alteradas. Tais propriedades podem incluir capacidade de empacotamento, eficiência de transdução, imunogenicidade, integração de genoma, replicação, transcrição e tradução. Em algumas modalidades, uma porção do genoma viral pode ser excluída de modo que o vírus seja capaz de empacotar sequências exógenas com um tamanho maior. Em algumas modalidades, o vetor

viral pode ter uma eficiência de transdução intensificada. Em algumas modalidades, a resposta imune induzida pelo vírus em um hospedeiro pode ser reduzida. Em algumas modalidades, os genes virais (como, por exemplo, integrase) que promovem a integração da sequência viral em um genoma hospedeiro podem ser mutados de modo que o vírus se torne não integrante. Em algumas modalidades, o vetor viral pode estar com defeito de replicação. Em algumas modalidades, o vetor viral pode compreender sequências de controle de transcrição ou tradução exógenas para conduzir a expressão de sequências de codificação no vetor. Em algumas modalidades, o vírus pode ser dependente do auxiliar. Por exemplo, o vírus pode precisar de um ou mais vírus auxiliares para fornecer componentes virais (como, por exemplo, proteínas virais) necessários para amplificar e empacotar os vetores em partículas virais. Nesse caso, um ou mais componentes auxiliares, incluindo um ou mais vetores que codificam os componentes virais, podem ser introduzidos em uma célula hospedeira juntamente com o sistema vetorial descrito neste documento. Em outras modalidades, o vírus pode ser livre de auxiliar. Por exemplo, o vírus pode ser capaz de amplificar e empacotar os vetores sem nenhum vírus auxiliar. Em algumas modalidades, o sistema vetorial descrito aqui também pode codificar os componentes virais necessários para a amplificação e empacotamento do vírus.

[00175] Os vetores virais exemplificativos não limitativos incluem o vetor de vírus adeno-associado (AAV), vetores de lentivírus, vetores de adenovírus, vetores adenovirais dependentes de auxiliares (HDA), vetores de vírus herpes simplex (HSV-1), bacteriófago T4, vetores de baculovírus e vetores de retrovírus. Em algumas modalidades, o vetor viral pode ser um vetor AAV. Em algumas modalidades, o vetor viral é AAV2, AAV3, AAV3B, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAVrh10 ou AAVLK03.

Em outras modalidades, o vetor viral pode um vetor de lentivírus.

[00176] Em algumas modalidades, o lentivírus pode não ser integrante. Em algumas modalidades, o vetor viral pode ser um vetor adenovírus. Em algumas modalidades, o adenovírus pode ser um adenovírus de capacidade de alta clonagem ou "sem reforço", onde todas as regiões virais codificadoras, além das repetições terminais invertidas 5' e 3' (ITRs) e o sinal de empacotamento ('I'), são excluídas do vírus para aumentar sua capacidade de empacotamento. Em ainda outras modalidades, o vetor viral pode ser um vetor HSV-1. Em algumas modalidades, o vetor baseado em HSV-1 é dependente do auxiliar e, em outras modalidades, é independente do auxiliar. Por exemplo, um vetor de amplicon que retém apenas a sequência de empacotamento requer um vírus auxiliar com componentes estruturais para empacotamento, enquanto um vetor HSV-1 excluído de 30kb que remove funções virais não essenciais não requer vírus auxiliar. Em modalidades adicionais, o vetor viral pode ser o bacteriófago T4. Em algumas modalidades, o bacteriófago T4 pode ser capaz de empacotar quaisquer moléculas lineares ou circulares de DNA ou RNA quando a cabeça do vírus é esvaziada. Em outras modalidades, o vetor viral pode ser um vetor de baculovírus. Em ainda outras modalidades, o vetor viral pode ser um vetor de retrovírus. Em modalidades que usam vetores AAV ou lentivirais, que possuem menor capacidade de clonagem, pode ser necessário usar mais de um vetor para distribuir todos os componentes de um sistema vetorial, conforme divulgado neste documento. Por exemplo, um vetor AAV pode conter sequências que codificam uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease, enquanto um segundo vetor AAV pode conter uma ou mais sequências guia.

[00177] Em algumas modalidades, o vetor pode ser capaz de direcionar a expressão de uma ou mais sequências de codificação em

uma célula. Em algumas modalidades, a célula pode ser uma célula procariótica, como, por exemplo, uma célula bacteriana. Em algumas modalidades, a célula pode ser uma célula eucariótica, como, por exemplo, uma célula de levedura, planta, inseto ou mamífero. Em algumas modalidades, a célula eucariótica pode ser uma célula de mamífero. Em algumas modalidades, a célula eucariótica pode ser uma célula de roedor. Em algumas modalidades, a célula eucariótica pode ser uma célula humana. Os promotores adequados para conduzir a expressão em diferentes tipos de células são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, o promotor pode ser do tipo selvagem. Em outras modalidades, o promotor pode ser modificado para expressão mais eficiente ou eficaz. Em ainda outras modalidades, o promotor pode ser truncado e ainda reter sua função. Por exemplo, o promotor pode ter um tamanho normal ou um tamanho reduzido adequado para o empacotamento adequado do vetor em um vírus.

[00178] Em algumas modalidades, o vetor pode compreender uma sequência de nucleotídeos que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma nuclease aqui descrita. Em algumas modalidades, a nuclease codificada pelo vetor pode ser uma proteína Cas. Em algumas modalidades, o sistema de vetor pode compreender uma cópia da sequência de nucleotídeos que codifica a nuclease. Em outras modalidades, o sistema de vetor pode compreender mais de uma cópia da sequência de nucleotídeos que codifica a nuclease. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica a nuclease pode estar operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de controle de transcrição ou tradução. Em algumas modalidades, a sequência nucleotídica que codifica a nuclease pode estar operacionalmente ligada a pelo menos um promotor.

[00179] Em algumas modalidades, o promotor pode ser constitutivo, induzível ou específico de tecido. Em algumas modalidades, o promotor

pode ser um promotor constitutivo. Os promotores constitutivos exemplificativos não limitativos incluem o promotor inicial imediato de citomegalovírus (CMV), promotor do vírus símio (SV40), promotor tardio principal de adenovírus (MLP), promotor do vírus do sarcoma Rous (RSV), promotor do vírus do tumor mamário de camundongos (MMTV), promotor de fosfoglicerato quinase (PGK), promotor do fator de alongamento alfa (EF1a), promotores de ubiquitina, promotores de actina, promotores de tubulina, promotores de imunoglobulina, um fragmento funcional do mesmo ou uma combinação de qualquer um dos anteriores. Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor de CMV. Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor de CMV truncado. Em outras modalidades, o promotor pode ser um promotor de EF1a. Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor induzível. Os promotores indutíveis exemplificativos não limitativos incluem aqueles induzíveis por choque térmico, luz, produtos químicos, peptídeos, metais, esteroides, antibióticos ou álcool. Em algumas modalidades, o promotor induzível pode ser aquele que possui um baixo nível de expressão basal (não induzida), como, por exemplo, o promotor Tet-On<sup>®</sup> (Clontech).

[00180] Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor específico de tecido, por exemplo, um promotor específico para expressão no fígado.

[00181] O vetor pode ainda compreender uma sequência nucleotídica que codifica o RNA guia aqui descrito. Em algumas modalidades, o vetor compreende uma cópia do RNA guia. Em outras modalidades, o vetor compreende mais de uma cópia do RNA guia. Em modalidades com mais de um RNA guia, os RNAs guia podem ser não idênticos, de modo que direcionem sequências alvo diferentes ou podem ser idênticos, pois direcionam a mesma sequência alvo. Em algumas modalidades em que os vetores compreendem mais de um

RNA guia, cada RNA guia pode ter outras propriedades diferentes, como atividade ou estabilidade dentro de um complexo com uma nuclease de DNA guiado por RNA, como um complexo Cas RNP. Em algumas modalidades, a sequência nucleotídica que codifica o RNA guia pode ser operacionalmente ligada a pelo menos uma sequência de controle de transcrição ou tradução, como um promotor, um UTR 3' ou um UTR 5'. Numa modalidade, o promotor pode ser um promotor de tRNA, *por exemplo*, tRNA<sup>Lys3</sup>, ou uma quimera de tRNA. *Ver Mefferd et al., RNA. 2015 21:1683-9; Scherer et al., Nucleic Acids Res. 2007 35: 2620–2628.* Em algumas modalidades, o promotor pode ser reconhecido pela RNA polimerase III (Pol III). Exemplos não limitativos de promotores de Pol III incluem promotores U6 e H1. Em algumas modalidades, a sequência nucleotídica que codifica o RNA guia pode ser operacionalmente ligada a um promotor U6 humano ou de camundongo. Em outras modalidades, a sequência nucleotídica que codifica o RNA guia pode ser operacionalmente ligada a um promotor H1 de camundongo ou humano. Em modalidades com mais de um RNA guia, os promotores usados para conduzir a expressão podem ser iguais ou diferentes. Em algumas modalidades, o nucleotídeo que codifica o crRNA do RNA guia e o nucleotídeo que codifica o trRNA do RNA guia podem ser fornecidos no mesmo vetor. Em algumas modalidades, o nucleotídeo que codifica o crRNA e o nucleotídeo que codifica o trRNA podem ser acionados pelo mesmo promotor. Em algumas modalidades, o crRNA e o trRNA podem ser transcritos em um único transcrito. Por exemplo, o crRNA e o trRNA podem ser processados a partir do único transcrito para formar um RNA guia de molécula dupla. Alternativamente, o crRNA e o trRNA podem ser transcritos para um RNA guia de molécula única (sgRNA). Em outras modalidades, o crRNA e o trRNA podem ser acionados por seus promotores correspondentes no mesmo vetor. Em ainda outras modalidades, o crRNA e o trRNA

podem ser codificados por diferentes vetores.

[00182] Em algumas modalidades, a sequência nucleotídica que codifica o RNA guia pode estar localizada no mesmo vetor compreendendo a sequência nucleotídica que codifica uma nuclease de DNA guiado por RNA, como uma Cas nuclease. Em algumas modalidades, a expressão do RNA guia e da nuclease de DNA guiado por RNA, como uma proteína Cas, pode ser conduzida por seus próprios promotores correspondentes. Em algumas modalidades, a expressão do RNA guia pode ser conduzida pelo mesmo promotor que direciona a expressão da nuclease de DNA guiado por RNA, como uma proteína Cas. Em algumas modalidades, o RNA guia e a nuclease de DNA guiado por RNA, como um transcrito de proteína Cas, podem estar contidos em um único transcrito. Por exemplo, o RNA guia pode estar dentro de uma região não traduzida (UTR) da nuclease de DNA guiada por RNA, como um transcrito da proteína Cas. Em algumas modalidades, o RNA guia pode estar dentro da UTR 5' da transcrição. Em outras modalidades, o RNA guia pode estar dentro da UTR 3' da transcrição. Em algumas modalidades, a meia-vida intracelular do transcrito pode ser reduzida contendo o RNA guia dentro de sua UTR 3' e, assim, encurtando o comprimento de sua UTR 3'. Em modalidades adicionais, o RNA guia pode estar dentro de um íntron do transcrito. Em algumas modalidades, sítios de emenda adequados podem ser adicionados no íntron dentro do qual o RNA guia está localizado, de modo que o RNA guia seja adequadamente emendado do transcrito. Em algumas modalidades, a expressão da nuclease de DNA guiado por RNA, como uma proteína Cas e o RNA guia a partir do mesmo vetor, em proximidade temporal estreita, pode facilitar a formação mais eficiente do complexo CRISPR RNP.

[00183] Em algumas modalidades, as composições compreendem um sistema vetorial. Em algumas modalidades, o sistema de vetor pode

compreender um único vetor. Em outras modalidades, o sistema de vetores pode compreender dois vetores. Em modalidades adicionais, o sistema de vetor pode compreender três vetores. Quando diferentes RNAs guia são usados para multiplexação, ou quando várias cópias do RNA guia são usadas, o sistema vetorial pode compreender mais de três vetores.

[00184] Em algumas modalidades, o sistema de vetor pode compreender promotores induzíveis para iniciar a expressão somente depois que ele é distribuído a uma célula alvo. Os promotores indutíveis exemplificativos não limitativos incluem aqueles induzíveis por choque térmico, luz, produtos químicos, peptídeos, metais, esteroides, antibióticos ou álcool. Em algumas modalidades, o promotor induzível pode ser aquele que possui um baixo nível de expressão basal (não induzida), como, por exemplo, o promotor Tet-On<sup>®</sup> (Clontech).

[00185] Em modalidades adicionais, o sistema de vetor pode compreender promotores específicos de tecido para iniciar a expressão somente após ser distribuído em um tecido específico.

[00186] O vetor pode ser distribuído por lipossoma, uma nanopartícula, um exossomo ou uma microvesícula. O vetor também pode ser distribuído por uma nanopartícula lipídica (LNP); ver, por exemplo, USSN 62/433.228, depositado em 12 de dezembro de 2016 e intitulado “LIPID NANOPARTICLE FORMULATIONS FOR CRISPR/CAS COMPONENTS,” cujo conteúdo é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Qualquer uma das formulações de LNP e LNPs aqui descritas é adequada para a distribuição das guias isoladamente ou em conjunto uma cas nuclease ou um mRNA que codifica uma cas nuclease. Em algumas modalidades, uma composição de LNP é englobada compreendendo: um componente de RNA e um componente lipídico, em que o componente lipídico compreende um lipídeo de amina, um lipídeo neutro, um lipídeo auxiliar e um lipídeo

furtivo; e em que a razão N/P é de cerca de 1-10.

[00187] Em alguns casos, o componente lipídico compreende o lipídeo A ou seu análogo acetal, colesterol, DSPC e PEG-DMG; e em que a razão N/P é de cerca de 1-10. Em algumas modalidades, o componente lipídico compreende: cerca de 40-60% em peso de lipídeo de amina; cerca de 5-15% em peso de lipídeo neutro; e cerca de 1,5 a 10% em mol de lipídeo PEG, em que o restante do componente lipídico é lipídeo auxiliar e em que a razão N/P da composição de LNP é de cerca de 3-10. Em algumas modalidades, o componente lipídico compreende cerca de 50-60% em peso de lipídeo de amina; cerca de 8 a 10% em peso de lipídeo neutro; e cerca de 2,5-4% em mol de lipídeo PEG, em que o restante do componente lipídico é lipídeo auxiliar e em que a razão N/P da composição de LNP é de cerca de 3-8. Em alguns casos, o componente lipídico compreende: cerca de 50-60% em peso de lipídeo de amina; cerca de 5-15% em mol de DSPC; e cerca de 2,5-4% em mol de lipídeo PEG, em que o restante do componente lipídico é colesterol e em que a razão N/P da composição de LNP é de cerca de 3-8. Em alguns casos, o componente lipídico compreende: 48-53% em mol de lipídeo A; cerca de 8-10% em mol de DSPC; e 1,5-10% em mol de lipídeo PEG, em que o restante do componente lipídico é colesterol e em que a razão N/P da composição de LNP é  $3-8 \pm 0,2$ .

[00188] Em algumas modalidades, o vetor pode ser distribuído sistemicamente. Em algumas modalidades, o vetor pode ser distribuído na circulação hepática.

[00189] 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 que 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.

[00190] 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. Conforme utilizado neste documento, o termo "incluir" e suas variantes gramaticais devem ser não limitativas, de modo que a recitação de itens em uma lista não exclua outros itens semelhantes que podem ser substituídos ou adicionados aos itens listados.

## **EXEMPLOS**

[00191] Os exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar certas modalidades divulgadas e não devem ser interpretados como limitando o escopo desta divulgação de nenhuma forma.

### **Exemplo 1. Materiais e Métodos**

#### ***Transcrição in vitro ("IVT") de mRNA da nuclease***

[00192] O mRNA de Cas9 contendo *Streptococcus pyogenes* tamponado e poliadenilado ("Spy") contendo N1-metil pseudo-U foi gerado por transcrição in vitro usando um modelo de DNA de plasmídeo linearizado e polimerase de RNA T7. O DNA do plasmídeo contendo um promotor T7, uma sequência para transcrição de acordo com a SEQ ID NO: 1 ou 2 e uma região poli (A/T) de 100 nt foi linearizada por

incubação a 37°C por 2 horas com XbaI com as seguintes condições: 200 ng/μL de plasmídeo, 2 U/μL de XbaI (NEB) e 1x tampão de reação. O XbaI foi inativado por aquecimento da reação a 65°C por 20 min. O plasmídeo linearizado foi purificado a partir de sais de enzima e tampão usando uma coluna de sílica maxi spin (Epoch Life Sciences) e analisado por gel de agarose para confirmar a linearização. A reação de IVT para gerar mRNA modificado por Cas9 foi incubada a 37°C por 4 horas nas seguintes condições: plasmídeo linearizado a 50 ng/μL; 2 mM cada de GTP, ATP, CTP e N1-metil pseudo-UTP (Trilink); ARCA 10 mM (Trilink); 5 U/mL de T7 RNA polimerase (NEB); 1 U/μL de inibidor da RNase murina (NEB); 0,004 U/μL de E. coli pirofosfatase inorgânica (NEB); e 1x tampão de reação. Após a incubação de 4 horas, a TURBO DNase (ThermoFisher) foi adicionada a uma concentração final de 0,01 U/μL e a reação foi incubada por mais 30 minutos para remover o modelo de DNA. O mRNA de Cas9 foi purificado a partir de enzimas e nucleotídeos usando um kit de limpeza de transcrição MegaClear de acordo com o protocolo do fabricante (ThermoFisher). Alternativamente, o mRNA foi purificado através de um protocolo de precipitação, que em alguns casos foi seguido por purificação por HPLC. Resumidamente, após a digestão com DNase, o mRNA foi precipitado adicionando 0,21x vol de uma solução de LiCl 7,5 M e misturando, e o mRNA precipitado foi peletizado por centrifugação. Uma vez removido o sobrenadante, o mRNA foi reconstituído em água. O mRNA foi precipitado novamente usando acetato de amônio e etanol. Foi adicionado acetato de amônio 5M à solução de mRNA para uma concentração final de 2M juntamente com 2x volume de EtOH a 100%. A solução foi misturada e incubada a -20°C por 15 min. O mRNA precipitado foi novamente peletizado por centrifugação, o sobrenadante foi removido e o mRNA foi reconstituído em água. Como etapa final, o mRNA foi precipitado usando acetato de sódio e etanol. Foi adicionado à solução 1/10 de acetato de sódio 3 M

(pH 5,5), juntamente com 2x volume de EtOH a 100%. A solução foi misturada e incubada a -20°C por 15 min. O mRNA precipitado foi novamente peletizado por centrifugação, o sobrenadante foi removido, o pelete foi lavado com etanol frio a 70% e deixado secar ao ar. O mRNA foi reconstituído em água. Para o mRNA purificado por HPLC, após a precipitação e reconstituição de LiCl, o mRNA foi purificado por HPLC RP-IP (ver, por exemplo, Kariko, *et al.* Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 21 e142). As frações escolhidas para a mistura foram combinadas e dessalinizadas por precipitação com acetato de sódio/etanol como descrito acima. A concentração do transcrito foi determinada medindo a absorbância da luz a 260 nm (Nanodrop) e o transcrito foi analisado por eletroforese capilar por Bioanalyzer (Agilent).

[00193] Quando as SEQ ID NOs: 1 e 2 são referidas abaixo em relação aos RNAs, entende-se que Ts devem ser substituídos por Us (que eram N1-metil pseudouridinas como descrito acima). Os mRNAs de Cas9 usados nos Exemplos incluem um capeamento de 5' e uma cauda de poli-A de 3', por exemplo, até 100 nts, e são identificados pela SEQ ID NO.

[00194] SEQ ID NO: 1: Sequência Cas9 1 para transcrição.

```
GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTAT
TCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTC
GGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCTGGGAAA
CACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGGAGAAA
CAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAAGCAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGA
ATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTTCGACGACAGCTTCTTCCA
CAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCG
GAAACATCGTTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAG
AAGCTGGTTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACAT
GATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCG
ACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAAC
GCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGA
AAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAACCTGATCGCAC
TGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTG
```

CAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCA  
GTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC  
TGAGAGTCAACACAGAAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGAC  
GAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTA  
CAAGGAAATCTTCTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAA  
GCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAA  
CTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAA  
CATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCT  
ACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTAC  
TACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAAGAGCGAAGA  
AACAAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCA  
TCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCCGAAGCACAGC  
CTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGG  
AATGAGAAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCA  
AGACAAACAGAAAAGGTACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGC  
TTGACAGCGTCGAAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAAACATACCA  
CGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCC  
TGGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTTGAAGACAGAGAAAATGATCGAAGAAAAGACTG  
AAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTATGAAGCAGCTGAAGAGAGAAGAAGATACAC  
AGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGA  
CAATCCTGGACTTCTGAAGAGCGACGGATTTCGAAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCAC  
GACGACAGCCTGACATTCAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTACAGCGGACAGGGAGACAG  
CCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCCGGCAATCAAGAAGGGAAATCCTGCAGA  
CAGTCAAGGTCTGACGAACTGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTC  
ATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAAT  
GAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTTCG  
AAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATG  
TACGTCGACCAGGAACGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCC  
GCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGTCTGACAAGAAGCGACAAGAACA  
GAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCTGACAAGAAGATGAAGAAGTACTGGAGA  
CAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAAGTTCGACAACCTGACAAAAGGCAGAGAG  
AGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAAACAAGAC  
AGATCACAAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAAGTACGACGAAAAC  
GACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTTCATCAACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAG  
AAAGGACTTCCAGTTCACAAGGTTCAGAGAAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCAT  
ACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAAGCGAATTC  
GTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAAGATGATCGAAAAGAGCGAACAGGAAAT  
CGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAA  
TCACACTGGCAAACGGAGAAAATCAGAAAAGAGACCGCTGATCGAAAACAAACGGAGAAAACAGGA  
GAAATCGTCTGGGACAAGGGAAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAAGGTCTGAGCATGCCGCA  
GGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGC  
CGAAGAGAAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAAGGAACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA  
GGATTCGACAGCCCAGCTCGCATAACAGCGTCTGGTCTGTCGAAAAGGTTCGAAAAGGGAAA  
GAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAAGAAGCAGCT  
TCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTG  
ATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTGAAGTGGAAAACGGAAGAAAAGAGAATGCTGGC  
AAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCC  
TGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAG  
CTGTTCTGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAG  
CAAGAGAGTTCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCTGAGCGCATAACAAGCACA  
GAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACTGACAAAACCTG

GGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCAC  
AAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAA  
TCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG  
CTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGAT  
CAATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAA  
CATAAATTTCTTTAATCATTTCGCTCTTTTCTCTGTCTTCAATTAATAAAAAAATGGAAAG  
AACCTCGAG

[00195] SEQ ID NO: 2: Sequência Cas9 2 para transcrição.

GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCTGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTAT  
TCGGATCCATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCGGTGGGTGG  
GCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAAACCCGA  
TAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTGACTCCGGCGAAAACCGCAG  
AAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGC  
TATCTGCAAGAGATCTFTTCGAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCT  
GGAAGAATCTTTCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACA  
TCGTGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTG  
GTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAA  
ATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGC  
TTTTCAATCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTTGAAGAAAACCCAATCAATGCTAGC  
GGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTGGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCT  
GATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCAC  
TGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTC  
TCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGC  
GGATCTGTTCTTCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCG  
TGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCAT  
CACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGA  
GATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCCAGG  
AAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAAGTCTG  
GTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACAACGGATCCATTCC  
CCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCT  
TCCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTG  
GGCCCACCTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCAT  
CACTCCTTGGAAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAAC  
GAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTT  
TACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAG  
GAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACAGAAAGCAATTGTGATCTGCTGTTCAAGACCA  
ACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTCGAC  
TCAGTGGAAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCT  
CCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAG  
ATATCGTCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACC  
TACGCTCATCTTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCGGTACACTGGTTG  
GGCCCGCCTCTCCCACAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACCTATCC  
TGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGACGAC  
AGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAGCACAAGTGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCA  
TGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATTCGCAAACCTGTGA  
AGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAA  
ATGGCCCGAGAAAACAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAACCTCCCGCAAAGGATGAAGCG  
GATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACA

CGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTG  
 GACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTC  
 CTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGA  
 AGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTC  
 CTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGG  
 ACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTA  
 CCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAG  
 CTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCCGACTTTCCGGAAGGA  
 CTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCA  
 ACGCTGTGGTCCGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTTGTGTAC  
 GGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAA  
 AGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACTGAAATTACGC  
 TGGCCAAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATC  
 GTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTGCAAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAA  
 TATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGA  
 GAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTC  
 GATTCCGCGACTGTGCGATACTCCGTCCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAA  
 AAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGAGA  
 AGAACCCGATTGATTTCCCTCGAGGCGAAGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATC  
 AAACCCCAAGTACTCACTGTTGCAACTGGAAAATGGTTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGC  
 CGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGGCCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATC  
 TTGCTTCGCACTACGAAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAACAGCAGCTTTTC  
 GTGGAGCAGCACAAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAATCTCCGAGTTTTCAAAGCG  
 CGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAAGTCCCTGTCCGCCCTACAATAAGCATAGAGATA  
 AGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACCCTGACTAACCTGGGAGCC  
 CCAGCCGCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGA  
 AGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATC  
 TGTCGACGCTGGGTGGCGATGGCGGTGGATCTCCGAAAAGAAGAGAAAGGTGTAATGAGCT  
 AGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAATGAAGATCA  
 ATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAACA  
 TAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAA  
 CCTCGAG

***Projeto de guia TTR humana e TTR humana com projeto de guia de homologia de macaco cynomolgus***

[00196] A seleção inicial do guia foi realizada in silico usando um genoma de referência humano (por exemplo, hg38) e regiões genômicas definidas pelo usuário de interesse (por exemplo, éxons de codificação da proteína TTR), para identificar PAMs nas regiões de interesse. Para cada PAM identificado, análises foram realizadas e estatísticas relatadas. As moléculas de gRNA foram ainda selecionadas e ordenadas com base em vários critérios (por exemplo, teor de GC, atividade predita no alvo e atividade potencial fora do alvo).

Um total de 68 RNAs guia foram projetados para a TTR (ENSG00000118271) direcionando as regiões de codificação de

proteínas nos Éxon 1, 2, 3 e 4. Do total de 68 guias, 33 eram 100% homólogos em macacos cynomolgus ("cyno"). Além disso, para 10 dos guias TTR humanos que não eram perfeitamente homólogos em cyno, os guias "substitutos" foram projetados e feitos em paralelo para combinar perfeitamente com a sequência alvo de cyno correspondente. Esses guias "substitutos" ou "ferramentas" podem ser rastreados em cyno, por exemplo, para aproximar a atividade e a função da sequência guia humana homóloga. Sequências guia e coordenadas genômicas correspondentes são fornecidas (Tabela 1). Todos os RNAs guia foram feitos como RNAs duplos e um subconjunto das sequências guia foram feitas como RNA guia único modificado (Tabela 2). Alinhamento de ID de guia entre os IDs de RNA guia duplo (dgRNA), IDs de RNA único guia modificado (sgRNA), o número de incompatibilidades para o genoma cyno, bem como os IDs correspondentes exatos de cyno são fornecidos (Tabela 3). Onde dgRNAs são usados nas experiências detalhadas ao longo dos Exemplos, a SEQ ID NO: 270 foi usada.

#### ***Distribuição de mRNA de Cas9 e RNA guia in vitro***

[00197] *Linhagem celular HEK293\_Cas9*. A linhagem celular de adenocarcinoma de rim embrionário humano HEK293 que expressa constitutivamente Spy Cas9 ("HEK293\_Cas9") foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 500 µg/ml de G418. As células foram plaqueadas a uma densidade de 10.000 células/poço em uma placa de 96 poços 24 horas antes da transfecção. As células foram transfectadas com Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, Cat. 13778150) de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram transfectadas com um lipoplex contendo crRNA individual (25 nM), trRNA (25 nM), Lipofectamine RNAiMAX (0,3 µL/poço) e OptiMem.

[00198] *Linhagem celular HUH7*. A linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano HUH7 (Banco de Células Japonesas de

Pesquisa em Bioresources, Cat. JCRB0403) foi cultivada em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%. As células foram plaqueadas a uma densidade de 15.000 células/poço em uma placa de 96 poços 20 horas antes da transfecção. As células foram transfectadas com Lipofectamine MessengerMAX (ThermoFisher, Cat. LMRNA003) de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram transfectadas sequencialmente com um lipoplex contendo mRNA Spy Cas9 (100 ng), MessengerMAX (0,3 µL/poço) e OptiMem, seguido de um lipoplex separado contendo crRNA individual (25 nM), RNA traçador (25 nM), MessengerMAX (0,3 µL/bem) e OptiMem.

[00199] *Linhagem celular HepG2*. A linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano HepG2 (American Type Culture Collection, Cat. HB-8065) foi cultivada em meio DMEM suplementado com soro bovino fetal a 10%. As células foram contadas e plaqueadas em placas de 96 poços revestidas com colágeno I Bio-coat (ThermoFisher, Cat. 877272) a uma densidade de 10.000 células/poço em uma placa de 96 poços 24 horas antes da transfecção. As células foram transfectadas com Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, Cat. 11668019) de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram transfectadas sequencialmente com lipoplex contendo mRNA Spy Cas9 (100 ng), Lipofectamine 2000 (0,2 µL/poço) e OptiMem, seguido de lipoplex separado contendo crRNA individual (25 nM), RNA traçador (25 nM), Lipofectamine 2000 (0,2 µL/poço) e OptiMem.

[00200] *Hepatócitos primários do fígado*. Os hepatócitos primários do fígado humano (PHH) e os hepatócitos primários do fígado do cynomolgus (PCH) (Gibco) foram cultivados de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen, protocolo 11.28.2012). Em resumo, as células foram descongeladas e ressuspensas em meio de descongelamento de hepatócitos com suplementos (Gibco, Cat. CM7000), seguidas de centrifugação a 100 g por 10 minutos para humanos e 80g por 4 minutos

para cyno. O sobrenadante foi descartado e as células peletizadas ressuspensas em meio de placas de hepatócitos mais pacote de suplementos (Invitrogen, Cat. A1217601 e CM3000). As células foram contadas e plaqueadas em placas de 96 poços revestidas com colágeno I Bio-coat (ThermoFisher, Cat. 877272) a uma densidade de 33.000 células/poço para humanos ou 60.000 células/poço para cyno (ou 65.000 células/poço ao testar efeitos em Proteína TTR, descrito mais abaixo). As células plaqueadas foram deixadas assentar e aderir por 6 ou 24 horas em uma incubadora de cultura de tecidos a 37°C e 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células foram verificadas quanto à formação de monocamada e o meio foi substituído por meio de cultura de hepatócitos por um pacote de suplementos sem soro (Invitrogen, Cat. A1217601 e CM4000).

[00201] As transfecções com base em Lipofectamine RNAiMax (ThermoFisher, Cat. 13778150) foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram transfectadas sequencialmente com um lipoplex contendo mRNA de Spy Cas9 (100 ng), Lipofectamine RNAiMax (0,4 µL/poço) e OptiMem seguido por um lipoplex separado contendo crRNA (25 nM) e RNA traçador (25 nM) ou sgRNA (25nM), Lipofectamine RNAiMax (0,4 µL/poço) e OptiMem.

[00202] A formação de ribonucleotídeo foi realizada antes da eletroporação ou transfecção da proteína Spy Cas9 carregada com RNAs guia (RNPs) nas células. Para guia duplo (dgRNAs), o crRNA individual e o trRNA foram pré-recozidos misturando quantidades equivalentes de reagente e incubando a 95°C por 2 min e resfriando até a temperatura ambiente. O guia único (sgRNAs) foi fervido a 95°C por 2 min e resfriado até a temperatura ambiente. O dgRNA ou sgRNA fervido foi incubado com a proteína Spy Cas9 em Optimem por 10 minutos em temperatura ambiente para formar um complexo de ribonucleoproteína (RNP).

[00203] Para eletroporação de RNP em hepatócitos humanos e citopatológicos primários, as células são descongeladas e ressuspensas no tampão P3 de célula primária de eletroporação Lonza a uma concentração de 2500 células por  $\mu\text{L}$  para hepatócitos humanos e 3500 células por  $\mu\text{L}$  para hepatócitos citológicos. Um volume de 20  $\mu\text{L}$  de células ressuspensas e 5  $\mu\text{L}$  de RNP são misturados por guia. 20  $\mu\text{L}$  da mistura são colocados em uma placa de eletroporação Lonza. As células foram eletroporadas usando o nucleofetor Lonza com o protocolo predefinido EX-147. Após a eletroporação, as células são transferidas para uma placa Biocoat contendo meios de manutenção pré-aquecidos e colocadas em uma incubadora de cultura de tecidos a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ .

[00204] Para transfecções de lipoplex da RNP, as células foram transfectadas com Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, Cat. 13778150) de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram transfectadas com um RNP contendo Spy Cas9 (10nM), guia individual (10 nM), RNA traçador (10 nM), Lipofectamine RNAiMAX (1,0  $\mu\text{L}$ /poço) e OptiMem. A formação de RNP foi realizada como descrito acima.

[00205] Os LNPs foram formados por mistura microfluídica das soluções de lipídeos e RNA usando um instrumento de bancada Precision Nanosystems NanoAssemblr™, de acordo com o protocolo do fabricante, ou mistura de fluxo cruzado.

Formulação de LNP – NanoAssemblr

[00206] Em geral, os componentes das nanopartículas lipídicas foram dissolvidos em etanol 100% com o componente lipídico de várias razões molares. As cargas de RNA foram dissolvidas em citrato 25 mM, NaCl 100 mM, pH 5,0, resultando em uma concentração de carga de RNA de aproximadamente 0,45 mg/mL. Os LNPs foram formulados com uma razão molar de amina lipídica para fosfato de RNA (N:P) de cerca de 4,5 ou cerca de 6, com a razão de mRNA para gRNA a 1:1 em peso.

[00207] Os LNPs foram formados por mistura microfluídica das soluções de lipídeos e RNA usando um instrumento de bancada Precision Nanosystems NanoAssemblr™, de acordo com o protocolo do fabricante. Uma razão de 2:1 de solvente aquoso para orgânico foi mantida durante a mistura usando taxas de fluxo diferenciais. Após a mistura, os LNPs foram coletados, diluídos em água (aproximadamente 1:1 v/v), mantidos por 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente diluídos com água (aproximadamente 1:1 v/v) antes da troca final do tampão. A troca final de tampão em Tris 50 mM, NaCl 45 mM, sacarose a 5% (p/v), pH 7,5 (TSS) foi concluída com colunas de dessalinização PD-10 (GE). Se necessário, as formulações foram concentradas por centrifugação com filtros centrífugos Amicon 100 kDa (Millipore). A mistura resultante foi então filtrada usando um filtro estéril de 0,2 µm. A LNP final foi armazenada a -80°C até uso posterior.

#### Formulação de LNP – Fluxo cruzado

[00208] Para as LNPs preparadas usando a técnica de fluxo cruzado, as LNPs foram formadas por impacto da mistura a jato do lipídeo em etanol com dois volumes de soluções de RNA e um volume de água. O lipídeo em etanol é misturado através de uma mistura cruzada com os dois volumes de solução de RNA. Uma quarta corrente de água é misturada com a corrente de saída do cruzado através de um tee em linha. (Ver WO2016010840 FIG.2.) As LNPs foram mantidas por 1 hora à temperatura ambiente e posteriormente diluídas com água (aproximadamente 1:1 v/v). As LNPs diluídas foram concentradas usando filtração de fluxo tangencial em um cartucho de folha plana (Sartorius, 100kD MWCO) e depois trocados por tampão por diafiltração em Tris 50 mM, NaCl 45 mM, sacarose a 5% (p/v), pH 7,5 (TSS). Alternativamente, a troca final de tampão no TSS foi concluída com as colunas de dessalinização PD-10 (GE). Se necessário, as formulações foram concentradas por centrifugação com filtros centrífugos Amicon

100 kDa (Millipore). A mistura resultante foi então filtrada usando um filtro estéril de 0,2 µm. A LNP final foi armazenada a 4°C ou -80°C até o uso posterior.

### ***Analítica de Formulação***

[00209] A Dispersão Dinâmica da Luz ("DLS") é usada para caracterizar o índice de polidispersidade ("pdi") e o tamanho das LNPs da presente divulgação. A DLS mede a dispersão da luz resultante da submissão de uma amostra a uma fonte de luz. PDI, conforme determinado a partir de medições DLS, representa a distribuição do tamanho de partícula (em torno do tamanho médio das partículas) em uma população, com uma população perfeitamente uniforme tendo uma PDI de zero. O tamanho médio das partículas e a polidispersidade são medidos por dispersão de luz dinâmica (DLS) usando um instrumento Malvern Zetasizer DLS. As amostras de LNP foram diluídas 30X em PBS antes de serem medidas por DLS. O diâmetro médio Z, que é uma medida baseada na intensidade do tamanho médio das partículas, foi relatado juntamente com o diâmetro médio numérico e a pdi. Um instrumento Malvern Zetasizer também é usado para medir o potencial zeta da LNP. As amostras são diluídas 1:17 (50uL em 800uL) em 0,1X PBS, pH 7,4 antes da medição.

[00210] Um ensaio baseado em fluorescência (Ribogreen®, ThermoFisher Scientific) é usado para determinar a concentração total de RNA e o RNA livre. A eficiência da encapsulação é calculada como  $(\text{RNA total} - \text{RNA livre})/\text{RNA total}$ . As amostras de LNP são diluídas adequadamente com 1x tampão TE contendo 0,2% de Triton-X 100 para determinar o RNA total ou 1x tampão TE para determinar o RNA livre. As curvas padrão são preparadas utilizando a solução de RNA inicial usada para fazer as formulações e diluídas em 1x tampão TE +/- 0,2% de Triton-X 100. O corante RiboGreen® diluído (de acordo com as instruções do fabricante) é adicionado a cada um dos padrões e

amostras e deixado incubar por aproximadamente 10 minutos em temperatura ambiente, na ausência de luz. Um leitor de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices) é usado para ler as amostras com excitação, corte automático e comprimentos de onda de emissão definidos para 488 nm, 515 nm e 525 nm, respectivamente. O RNA total e o RNA livre são determinados a partir das curvas padrão apropriadas.

[00211] A eficiência da encapsulação é calculada como  $(\text{RNA total} - \text{RNA livre})/\text{RNA total}$ . O mesmo procedimento pode ser usado para determinar a eficiência de encapsulamento de um componente de carga baseado em DNA. Para o DNA de fita simples, pode ser utilizado o Oligreen Dye, e para o DNA de fita dupla, o Picogreen Dye.

[00212] Normalmente, ao preparar LNPs, o encapsulamento era > 80%, o tamanho das partículas era <120 nm e o pdi era <0,2.

### ***Distribuição de LNP In Vivo***

[00213] A menos que indicado de outra forma, camundongos fêmeas CD-1, com idades entre 6 e 10 semanas de idade, foram usadas em cada estudo. Os animais foram pesados e agrupados de acordo com o peso corporal para preparar soluções de dosagem com base no peso médio do grupo. As LNPs foram dosadas pela veia lateral da cauda em um volume de 0,2 mL por animal (aproximadamente 10 mL por quilograma de peso corporal). Os animais foram observados aproximadamente 6 horas após a dose para efeitos adversos. O peso corporal foi medido 24 horas após a administração e os animais foram sacrificados em vários momentos por exsanguinação por punção cardíaca sob anestesia com isoflourane. O sangue foi coletado em tubos separadores de soro ou em tubos contendo citrato de sódio tamponado para plasma, conforme descrito aqui. Para estudos envolvendo edição in vivo, o tecido hepático foi coletado do lobo mediano ou de três lobos independentes (por exemplo, lobo mediano direito, mediano esquerdo e lateral esquerdo) de cada animal para extração e análise de DNA.

***Análise ELISA de Transtirretina (TTR) usada em estudos com animais***

[00214] O sangue foi coletado e o soro foi isolado como indicado. Os níveis séricos totais de TTR de camundongo foram determinados usando um Kit ELISA de Pré-albumina de Camundongo (Transtiretina) (Aviva Systems Biology, Cat. OKIA00111); os níveis séricos de TTR em ratos foram medidos usando um kit ELISA específico para ratos (código de catálogo Aviva Systems Biology OKIA00159); os níveis séricos de TTR humano foram medidos usando um kit ELISA específico humano (código de catálogo Aviva Systems Biology OKIA00081); cada um de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, os soros foram diluídos em série com o diluente da amostra do kit até uma diluição final de 10.000 vezes ou 5.000 vezes ao medir a TTR humana nos soros de camundongo. 100ul da curva padrão preparada ou amostras de soro diluído foram adicionadas à placa ELISA, incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e depois lavadas 3 vezes com tampão de lavagem fornecido. 100 uL de anticorpo de detecção foram então adicionados a cada poço e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente, seguidos por 3 lavagens. 100 uL de substrato são adicionados e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente antes da adição de 100 uL de solução de parada. A absorbância do conteúdo foi medida no leitor de placas Spectramax M5 com análise usando o software SoftmaxPro versão 7.0. Os níveis séricos de TTR foram quantificados fora da curva padrão usando ajuste logístico de 4 parâmetros e expressos em ug/mL de soro ou porcentagem de animais de controle relativo à nocaute (tratados com veículo).

***Isolamento de DNA genômico***

[00215] As células transfectadas foram colhidas após a transfecção às 24, 48 ou 72 horas. O DNA genômico foi extraído de cada poço de uma placa de 96 poços usando 50 µL/poço de solução de extração de

DNA BuccalAmp (Epicenter, Cat. QE09050) de acordo com o protocolo do fabricante. Todas as amostras de DNA foram submetidas a PCR e as análises NGS subsequentes, conforme descrito aqui.

### ***Análise de sequenciamento de próxima geração ("NGS")***

[00216] Para determinar quantitativamente a eficiência da edição no local alvo no genoma, foi utilizado o sequenciamento para identificar a presença de inserções e deleções introduzidas pela edição de genes.

[00217] Os iniciadores foram projetados em torno do sítio alvo dentro do gene de interesse (por exemplo, TTR), e a área genômica de interesse foi amplificada.

[00218] PCR adicional foi realizada de acordo com os protocolos do fabricante (Illumina) para adicionar química ao sequenciamento. Os amplicons foram sequenciados em um instrumento Illumina MiSeq. As leituras foram alinhadas a um genoma de referência (por exemplo, o genoma de referência humano (hg38), o genoma de referência cynomologus (mf5), o genoma de referência de rato (rn6) ou o genoma de referência de camundongo (mm10)) após eliminar aqueles com pontuações de baixa qualidade. Os arquivos resultantes que contêm as leituras foram mapeados para o genoma de referência (arquivos BAM), onde foram selecionadas leituras que se sobrepunham à região de interesse alvo e o número de leituras de tipo selvagem versus o número de leituras que contêm uma inserção, substituição ou deleção foi calculado.

[00219] A porcentagem de edição (por exemplo, "eficiência de edição" ou "porcentagem de edição" ou "frequência indel") é definida como o número total de leituras de sequência com inserções/exclusões ("indels") ou substituições sobre o número total de leituras de sequência, incluindo tipo selvagem.

### ***Análise da proteína transtirretina secretada ("TTR") por Western Blot***

[00220] Os níveis secretados de proteína TTR nos meios foram determinados usando métodos de western blotting. As células HepG2 foram transfectadas como descrito anteriormente com guias selecionados da Tabela 1. As mudanças de mídia foram realizadas a cada 3 dias após a transfecção. Seis dias após a transfecção, o meio foi removido e as células foram lavadas uma vez com meio que não continha soro fetal bovino (FBS). Meios sem soro foram adicionados às células e incubados a 37°C. Após 4 horas, o meio foi removido e centrifugado para peletizar quaisquer detritos; o número de células para cada poço foi estimado com base nos valores obtidos de um ensaio CTG nas células restantes e na comparação com a média da placa. Após centrifugação, o meio foi transferido para uma nova placa e armazenado a -20°C. Foi realizada uma precipitação com acetona do meio para precipitar qualquer proteína que havia sido secretada no meio. Foram adicionados quatro volumes de acetona gelada a um volume de meio. A solução foi bem misturada e mantida a -20°C por 90 min. A mistura acetona:meio foi centrifugada a 15.000 xg e a 4°C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o pelete retido foi seco ao ar para eliminar qualquer acetona residual. O pelete foi ressuspense em 15 µl de tampão RIPA (Boston Bio Products, Cat. BP-115) mais uma mistura inibidora de protease adicionada recentemente, consistindo em um coquetel inibidor de protease completo (Sigma, Cat. 11697498001) e 1 mM de DTT. Os lisados foram misturados com tampão Laemmli e desnaturados a 95°C por 10 minutos. Western blots foram realizados usando o sistema NuPage em 12% de géis Bis-Tris (ThermoFisher) de acordo com o protocolo do fabricante, seguido de transferência úmida para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio-Rad, Cat. 1620115). As manchas foram bloqueadas usando 5% de leite seco em TBS por 30 minutos em um balancim de laboratório à temperatura ambiente. As manchas foram lavadas com TBST e sondadas com anticorpo

monoclonal  $\alpha$ -TTR de coelho (Abcam, Cat. Ab75815) a 1:1000 em TBST. A antitripsina alfa-1 foi usada como controle de carregamento (Sigma, Cat. HPA001292) a 1:1000 em TBST e incubada simultaneamente com o anticorpo primário TTR. As manchas foram vedadas em um saco e mantidas durante a noite a 4°C em um balancim de laboratório. Após a incubação, as manchas foram lavadas 3 vezes por 5 min cada em TBST e sondadas com anticorpos secundários ao Coelho (ThermoFisher, Cat. PISA535571) a 1:25.000 em TBST por 30 min à temperatura ambiente. Após a incubação, as manchas foram lavadas 3 vezes por 5 min cada em TBST e 2 vezes com PBS. As manchas foram visualizadas e analisadas usando um sistema Licor Odyssey.

#### ***Análise de TTR intracelular por Western Blot***

[00221] A linhagem celular de carcinoma hepatocelular, HUH7, foi transfectada como descrito anteriormente com guias selecionados da Tabela 1. Seis dias após a transfecção, a mídia foi removida e as células foram lisadas com 50  $\mu$ L/poço de tampão RIPA (Boston Bio Products, Cat. BP-115) mais mistura inibidora de protease adicionada recentemente, consistindo em um coquetel inibidor de protease completo (Sigma, Cat. 11697498001), 1 mM DTT e 250 U/ml de Benzonase (EMD Millipore, Cat. 71206-3). As células foram mantidas em gelo durante 30 minutos, altura em que foi adicionado NaCl (concentração final de 1 M). Os lisados celulares foram cuidadosamente misturados e mantidos em gelo por 30 minutos. Os extratos celulares inteiros ("WCE") foram transferidos para uma placa de PCR e centrifugados para peletizar os detritos. Um teste de Bradford (Bio-Rad, Cat. 500-0001) foi usado para avaliar o conteúdo de proteínas dos lisados. O procedimento de teste de Bradford foi concluído de acordo com o protocolo do fabricante. Os extratos foram armazenados a menos 20°C antes do uso. Western blots foram realizadas para avaliar os níveis

intracelulares de proteína TTR. Os lisados foram misturados com tampão Laemmli e desnaturados a 95°C durante 10 minutos. Western blots foram realizadas usando o sistema NuPage em 12% de géis Bis-Tris (ThermoFisher) de acordo com o protocolo do fabricante, seguido de transferência úmida para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio-Rad, Cat. 1620115). Após a transferência, as membranas foram enxaguadas abundantemente com água e coradas com a solução Ponceau S (Boston Bio Products, Cat. ST-180) para confirmar a transferência completa e uniforme. As manchas foram bloqueadas usando 5% de leite seco em TBS por 30 minutos em um balancim de laboratório à temperatura ambiente. As manchas foram lavadas com TBST e sondadas com anticorpo monoclonal α-TTR de coelho (Abcam, Cat. Ab75815) a 1:1000 em TBST. A β-actina foi usada como controle de carregamento (ThermoFisher, Cat. AM4302) a 1:2500 em TBST e incubada simultaneamente com o anticorpo primário de TTR. As manchas foram vedadas em um saco e mantidas durante a noite a 4°C em um balancim de laboratório. Após a incubação, as manchas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos cada em TBST e sondadas com anticorpos secundários para camundongo e coelho (ThermoFisher, Cat. PI35518 e PISA535571) a 1:25.000 cada um em TBST por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as manchas foram lavadas 3 vezes por 5 min cada em TBST e 2 vezes com PBS. As manchas foram visualizadas e analisadas usando um sistema Licor Odyssey.

## **Exemplo 2. Triagem de sequências de dgRNA**

### **Triagem cruzada de dgRNAs de TTR em vários tipos de células**

[00222] Guias no formato dgRNA direcionado o TTR humano e as sequências correspondentes ao cynomologus foram distribuídos às linhagens celulares HEK293\_Cas9, HUH7 e HepG2, bem como hepatócitos primários humanos e hepatócitos primários de macaco

cynomolgus, conforme descrito no Exemplo 1. Determinou-se a edição percentual para crRNAs compreendendo cada sequência guia em cada tipo de célula e as sequências guia foram classificadas com base na maior % de edição. Os dados de triagem para as sequências guia na Tabela 1 em todas as cinco linhagens celulares estão listados abaixo (Tabela 4 a 11).

[00223] A Tabela 4 mostra a média e o desvio padrão para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) dos crRNAs de *TTR* na linhagem celular de adenocarcinoma de rim humano, HEK293\_Cas9, que expressam constitutivamente a proteína Spy Cas9.

**Tabela 4: Dados de edição de TTR nas células Hek\_Cas9 transfectadas com dgRNAs**

ID GUIA	% de edição média	% de edição desvio padrão	% de inserto média	% de inserto desvio padrão	% de deleção desvio padrão	% de deleção desvio padrão
CR003335	26,59	4,73	4,73	0,65	21,87	4,09
CR003336	29,09	4,57	3,31	0,24	25,78	4,32
CR003337	42,72	1,72	5,24	1,62	37,48	0,70
CR003338	52,42	3,28	4,76	0,03	47,66	3,30
CR003339	56,37	4,13	49,39	3,23	6,98	0,91
CR003340	42,38	8,43	27,88	4,31	14,50	4,13
CR003341	20,04	5,26	6,73	1,86	13,31	3,41
CR003342	36,57	5,80	1,19	0,22	35,38	5,59
CR003343	24,36	1,51	4,82	0,43	19,53	1,39
CR003344	33,87	2,93	4,32	0,58	29,54	2,37
CR003345	35,02	7,05	19,00	3,58	16,01	3,48
CR003346	48,33	5,81	33,03	3,12	15,30	2,72
CR003347	21,45	5,57	0,95	0,33	20,50	5,26
CR003348	35,53	5,81	22,32	3,79	13,21	2,03
CR003349	13,19	4,46	8,03	2,81	5,16	1,66
CR003350	22,31	4,25	5,54	0,74	16,77	3,51
CR003351	49,67	3,77	28,42	1,69	21,24	2,22
CR003352	27,90	7,55	4,91	1,35	22,99	6,26
CR003353	25,03	5,16	3,71	0,75	21,32	4,42
CR003354	18,46	2,02	2,56	0,21	15,90	1,89
CR003355	30,60	2,53	6,99	0,80	23,61	1,75

CR003356	32,21	4,71	10,03	1,39	22,19	3,36
CR003357	43,23	6,71	5,38	0,87	37,85	5,88
CR003358	5,44	0,86	1,29	0,16	4,14	0,84
CR003359	37,75	7,50	18,35	3,73	19,40	3,78
CR003360	22,68	3,16	2,70	0,56	19,98	2,60
CR003361	34,45	8,97	8,66	1,66	25,78	7,32
CR003362	9,90	2,66	1,48	0,33	8,41	2,33
CR003363	31,03	10,74	14,77	4,21	16,26	6,54
CR003364	35,65	7,90	19,17	4,24	16,48	3,76
CR003365	36,43	6,20	11,83	1,88	24,61	4,45
CR003366	47,36	6,59	10,10	1,28	37,26	5,32
CR003367	47,11	15,43	28,44	9,11	18,67	6,33
CR003368	40,35	10,13	3,73	0,96	36,61	9,17
CR003369	33,10	7,26	9,06	1,12	24,04	6,16
CR003370	34,22	5,69	4,49	0,67	29,73	5,06
CR003371	25,60	8,33	3,84	1,41	21,76	6,92
CR003372	15,24	7,92	3,25	1,61	11,99	6,31
CR003373	13,55	2,40	1,31	0,21	12,25	2,19
CR003374	10,91	0,88	0,81	0,10	10,10	0,81
CR003375	11,63	3,18	0,78	0,17	10,85	3,05
CR003376	28,16	4,49	1,35	0,18	26,81	4,52
CR003377	24,70	4,44	2,71	0,54	21,99	3,91
CR003378	20,97	2,67	4,49	0,49	16,48	2,18
CR003379	26,32	2,91	5,34	0,61	20,98	2,30
CR003380	47,64	5,74	3,64	0,24	44,00	5,52
CR003381	22,04	5,74	3,82	1,26	18,23	4,64
CR003382	29,95	3,13	4,46	0,45	25,49	2,73
CR003383	40,47	0,64	25,12	0,45	15,35	0,66
CR003384	17,45	1,32	1,45	0,23	16,00	1,42
CR003385	26,19	5,62	7,36	1,57	18,82	4,06
CR003386	33,12	10,65	2,94	0,63	30,18	10,03
CR003387	24,68	5,93	7,75	1,99	16,92	3,94
CR003388	19,23	4,41	1,41	0,39	17,82	4,07
CR003389	34,18	5,09	10,30	2,12	23,87	3,02
CR003390	28,02	3,77	4,31	0,25	23,71	3,61
CR003391	44,81	4,67	0,61	0,07	44,19	4,63
CR003392	21,67	7,52	0,85	0,26	20,82	7,27

[00224] A Tabela 5 mostra a média e o desvio padrão para % de

Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) dos crRNAs de *TTR* testados cotransfectados com o mRNA de Spy Cas9 (SEQ ID NO: 2) na linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano, HUH7.

**Tabela 5: Dados de edição de TTR em células HUH7 transfectadas com mRNA e dgRNAs de Spy Cas9**

ID GUIA	% de edição média	% de edição desvio padrão	% de inserto média	% de inserto desvio padrão	% de deleção desvio padrão	% de deleção desvio padrão
CR003335	31,95	4,50	4,62	0,83	27,57	4,08
CR003336	30,05	4,25	4,14	1,07	26,56	3,55
CR003337	55,72	3,12	8,34	0,93	48,95	2,24
CR003338	75,64	2,03	10,22	1,42	67,06	2,79
CR003339	79,97	4,73	60,55	3,94	20,13	1,02
CR003340	46,93	7,12	33,33	6,01	14,23	1,65
CR003341	20,58	5,98	7,78	1,64	13,20	4,44
CR003342	45,14	7,16	1,23	0,91	44,66	7,68
CR003343	76,13	7,04	9,58	3,49	66,97	6,10
CR003344	64,02	3,33	10,76	1,35	54,40	2,71
CR003345	72,43	2,17	41,33	0,96	32,18	1,37
CR003346	18,07	1,02	13,17	1,39	6,97	3,06
CR003347	32,16	5,50	1,64	0,42	30,79	5,11
CR003348	57,14	10,98	36,08	6,97	22,71	4,42
CR003349	14,14	4,99	9,73	3,26	4,82	1,91
CR003350	52,91	7,61	13,43	2,00	41,64	6,03
CR003351	63,51	4,61	36,87	2,49	27,49	2,14
CR003352	39,68	9,53	7,62	7,42	32,79	7,37
CR003353	69,18	4,59	7,73	2,46	62,87	3,13
CR003354	12,27	3,38	1,25	0,40	11,46	3,23
CR003355	38,83	5,31	9,40	1,81	30,31	3,56
CR003356	49,63	5,55	18,98	2,67	31,31	3,04
CR003357	36,31	5,72	6,37	1,17	30,82	4,68

CR003358	36,50	6,17	10,53	1,56	26,60	4,49
CR003359	66,75	5,84	21,73	2,30	45,97	3,93
CR003360	58,62	8,73	5,01	0,60	55,13	8,19
CR003361	28,68	6,52	6,84	1,26	22,44	5,31
CR003362	26,43	0,83	3,43	0,32	23,76	0,85
CR003363	41,01	7,16	17,83	3,32	23,78	3,97
CR003364	47,13	10,61	24,68	5,15	23,03	5,74
CR003365	60,68	5,25	17,77	1,57	43,82	3,73
CR003366	69,98	8,84	20,77	3,10	50,32	5,69
CR003367	66,29	4,48	33,62	4,14	33,48	0,51
CR003368	31,57	11,73	3,08	0,92	29,69	11,32
CR003369	24,19	6,89	7,12	2,27	17,38	4,76
CR003370	39,16	11,59	4,83	1,79	35,55	10,35
CR003371	40,47	7,68	6,07	0,89	35,65	7,01
CR003372	21,52	6,02	4,89	1,66	17,25	4,58
CR003373	27,29	4,45	3,31	0,66	25,12	4,12
CR003374	3,10	0,68	0,45	0,24	2,87	0,54
CR003375	2,38	0,22	0,26	0,14	2,25	0,12
CR003376	19,42	5,60	1,37	0,45	18,55	5,28
CR003377	34,93	5,47	5,59	0,88	29,89	4,71
CR003378	40,73	4,63	9,73	1,85	32,27	2,91
CR003379	19,18	5,17	3,38	0,77	16,48	4,32
CR003380	31,76	5,81	3,29	0,57	29,29	5,42
CR003381	99,70	0,17	1,92	0,20	99,70	0,17
CR003382	34,47	5,71	0,14	0,16	34,47	5,71
CR003383	42,89	10,14	2,14	0,56	41,19	9,67
CR003384	17,03	1,95	0,84	0,30	16,29	1,84
CR003386	69,40	19,41	0,53	0,23	69,34	19,32
CR003387	25,64	3,69	0,23	0,07	25,55	3,62
CR003388	59,48	4,29	3,88	0,68	56,45	4,45
CR003389	62,32	1,97	13,19	1,18	50,90	1,02
CR003390	18,97	4,82	3,31	0,91	16,49	3,98

CR003391	61,31	13,21	2,10	0,51	59,70	12,76
CR003392	28,37	8,58	1,93	0,73	26,98	7,94

[00225] A Tabela 6 mostra a média e o desvio padrão para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para a TTR testada e os crRNAs de controle cotransfectados com o mRNA de Spy Cas9 (SEQ ID NO: 2) na linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano, HepG2.

**Tabela 6: Dados de edição de TTR em células HepG2 transfectadas com mRNA e dgRNAs de Spy Cas9**

ID GUIA	% de edição média	% de edição desvio padrão	% de inserto média	% de inserto desvio padrão	% de deleção desvio padrão	% de deleção desvio padrão
CR001261 (controle)	49,16	7,45	16,46	3,46	32,71	4,06
CR001262 (controle)	63,33	5,66	59,88	4,92	3,45	0,86
CR001263 (controle)	39,19	6,98	37,59	8,01	1,60	1,92
CR001264 (controle)	57,09	12,14	47,47	9,25	9,61	2,89
CR003335	37,19	2,12	32,96	1,67	4,23	0,59
CR003336	31,31	5,47	30,48	5,10	0,83	0,75
CR003337	61,93	2,68	59,28	2,11	2,65	1,39
CR003338	68,00	6,09	65,40	6,78	2,60	1,17
CR003339	68,21	7,67	12,37	1,47	55,84	6,31
CR003340	37,76	6,01	6,12	1,95	31,65	4,07
CR003341	15,60	5,49	9,94	3,38	5,66	2,13
CR003342	11,06	6,71	10,78	6,69	0,28	0,03
CR003343	45,41	15,20	40,05	10,79	5,36	5,20
CR003344	33,43	6,11	29,81	5,09	3,62	1,13
CR003345	10,58	9,25	6,12	5,38	4,45	3,87
CR003346	0,13	0,05	0,07	0,02	0,05	0,03
CR003347	22,57	10,94	21,08	11,19	1,49	0,90
CR003348	38,44	10,45	17,04	5,04	21,40	5,89

CR003349	8,36	2,19	4,46	1,75	3,91	0,76
CR003350	29,60	5,17	25,16	4,56	4,44	0,67
CR003351	57,54	5,67	31,98	2,63	25,57	3,08
CR003352	44,28	8,71	39,51	7,10	4,77	1,79
CR003353	60,40	11,37	56,71	9,95	3,68	1,45
CR003354	5,36	3,94	4,84	3,41	0,53	0,71
CR003355	15,80	5,38	12,36	4,23	3,44	1,16
CR003356	9,39	1,82	5,67	1,03	3,72	0,92
CR003357	45,83	10,66	42,37	8,47	3,46	2,28
CR003358	35,93	7,34	28,66	7,76	7,27	1,77
CR003359	64,44	14,90	48,79	14,32	15,65	1,94
CR003360	41,31	12,23	38,94	10,60	2,38	1,78
CR003361	14,05	4,79	11,47	4,35	2,58	0,43
CR003362	17,44	4,34	16,50	4,86	0,94	0,52
CR003363	42,65	9,90	28,58	6,95	14,07	3,01
CR003364	51,88	7,67	31,03	2,67	20,85	5,03
CR003365	46,88	15,78	35,77	13,49	11,11	2,30
CR003366	54,69	9,10	46,20	8,98	8,49	1,11
CR003367	45,55	8,19	24,28	6,57	21,27	1,62
CR003368	51,55	8,60	48,34	9,87	3,22	1,36
CR003369	22,62	4,01	17,11	4,47	5,51	2,52
CR003370	28,51	6,94	24,88	6,17	3,62	1,45
CR003371	15,91	4,17	14,07	4,02	1,84	0,22
CR003372	14,57	2,47	12,14	2,08	2,42	0,40
CR003373	17,69	8,41	15,92	6,44	1,77	1,97
CR003374	5,43	0,53	5,12	0,62	0,31	0,36
CR003375	2,06	0,04	1,96	0,06	0,10	0,03
CR003376	14,41	3,01	14,16	2,93	0,24	0,10
CR003377	16,30	2,85	15,29	2,59	1,02	0,59
CR003378	8,16	3,83	6,82	3,43	1,34	0,61
CR003379	19,74	4,24	17,70	4,30	2,04	0,33
CR003380	17,08	2,48	14,78	1,18	2,30	1,36
CR003381	6,81	3,48	6,18	3,82	0,63	0,44
CR003382	1,73	0,14	1,58	0,12	0,15	0,03
CR003383	6,35	1,67	6,19	1,68	0,16	0,04

CR003384	3,37	0,88	3,12	0,94	0,25	0,09
CR003385	53,94	9,41	46,32	10,66	7,62	1,29
CR003386	2,71	0,76	2,15	0,77	0,56	0,53
CR003387	1,39	0,15	1,27	0,17	0,12	0,02
CR003388	9,33	4,47	7,76	4,56	1,56	0,10
CR003389	31,84	6,09	27,27	5,96	4,57	1,21
CR003390	24,88	4,96	22,44	3,41	2,44	2,25
CR003391	48,78	14,41	48,28	14,44	0,50	0,52
CR003392	14,64	5,25	14,32	4,95	0,33	0,36
CR005298	42,65	10,94	21,29	8,16	21,36	2,87
CR005299	38,61	5,57	36,32	3,99	2,30	2,11
CR005300	64,34	9,55	53,20	6,59	11,15	3,33
CR005301	37,04	5,32	33,39	3,85	3,65	1,89
CR005302	33,21	2,19	30,93	2,43	2,29	0,24
CR005303	21,63	6,05	20,55	5,80	1,08	0,25
CR005304	62,82	3,28	8,07	1,22	54,75	4,27
CR005305	13,51	3,58	12,30	3,49	1,21	0,84
CR005306	24,07	5,24	21,20	5,03	2,87	1,10
CR005307	22,03	3,86	7,70	1,35	14,33	4,15

[00226] A Tabela 7 mostra a média e o desvio padrão para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para os dgRNAs de *TTR* testados eletroporados com a proteína Spy Cas9 (RNP) em hepatócitos primários humanos.

**Tabela 7: Dados de edição de TTR em hepatócitos primários humanos eletroporados com a proteína Spy Cas9 carregada com dgRNAs**

ID GUIA	% de edição média	% de edição desvio padrão	% de inserto média	% de inserto desvio padrão	% de deleção desvio padrão	% de deleção desvio padrão
CR003335	72,20	4,53	69,70	4,36	2,50	0,30
CR003336	39,17	3,04	38,43	3,20	0,70	0,17
CR003337	54,27	2,70	53,23	3,05	1,30	0,26
CR003338	83,03	4,84	80,87	4,63	2,13	0,25
CR003339	43,00	2,66	8,93	1,86	34,07	1,72

CR003340	12,03	1,55	5,60	1,32	6,50	0,53
CR003341	11,43	0,71	7,03	0,50	4,40	1,21
CR003342	32,77	3,63	31,87	3,28	0,90	0,35
CR003343	77,10	2,21	75,63	2,01	1,50	0,36
CR003344	39,40	3,86	33,30	2,52	6,10	1,31
CR003345	48,07	6,24	34,53	2,95	13,57	3,74
CR003346	35,67	1,80	20,83	1,65	14,83	1,66
CR003347	82,30	5,93	81,97	5,98	0,43	0,15
CR003348	28,53	1,79	11,30	2,46	17,27	0,86
CR003349	4,10	0,17	2,33	0,46	1,87	0,25
CR003350	28,13	3,50	22,40	2,41	5,73	1,22
CR003351	51,77	5,11	30,83	3,32	20,97	2,43
CR003352	29,83	4,18	25,63	3,67	4,30	0,56
CR003353	84,83	4,68	82,23	4,05	2,63	0,74
CR003354	2,50	0,36	2,43	0,32	0,03	0,06
CR003355	12,53	1,54	10,60	2,36	1,97	1,17
CR003356	9,97	2,68	7,80	2,01	2,23	0,85
CR003357	36,23	4,02	35,47	4,11	0,77	0,61
CR003358	5,70	1,42	4,93	1,36	0,80	0,26
CR003359	63,77	7,07	56,33	5,81	7,50	1,35
CR003360	32,23	3,09	31,67	2,97	0,63	0,31
CR003361	4,10	0,36	3,73	0,42	0,37	0,06
CR003362	7,03	1,30	6,87	1,20	0,20	0,20
CR003363	9,43	8,22	7,80	6,86	1,63	1,44
CR003364	23,30	5,20	16,93	4,96	6,53	0,55
CR003365	42,37	3,88	35,57	1,88	6,83	2,00
CR003366	34,70	3,26	31,63	2,98	3,10	1,15
CR003367	39,20	5,31	22,93	4,14	16,37	1,46
CR003368	28,47	3,29	27,63	2,90	0,80	0,66
CR003369	3,67	1,16	3,30	1,06	0,40	0,20
CR003370	15,27	1,75	14,43	1,72	0,90	0,20
CR003371	16,20	2,13	14,47	2,37	1,87	0,81
CR003372	12,17	2,69	10,47	2,63	1,77	0,12
CR003373	0,87	0,21	0,83	0,25	0,07	0,12
CR003374	0,80	0,17	0,70	0,26	0,10	0,10
CR003375	1,33	1,10	1,27	1,08	0,07	0,06
CR003376	1,90	1,06	1,87	1,00	0,03	0,06
CR003377	10,23	1,53	10,13	1,51	0,10	0,10
CR003378	4,60	1,92	3,87	1,19	0,73	0,67

CR003379	6,57	1,00	6,30	0,70	0,27	0,31
CR003380	5,37	2,57	5,27	2,54	0,10	0,10
CR003381	6,20	2,74	5,83	2,61	0,50	0,10
CR003382	8,40	2,07	8,10	1,87	0,43	0,21
CR003383	8,57	0,75	3,37	0,67	5,27	0,46
CR003384	1,87	0,67	1,73	0,57	0,23	0,12
CR003385	40,87	6,86	38,43	6,41	2,53	0,45
CR003386	4,90	1,20	4,47	1,14	0,47	0,25
CR003387	1,87	0,25	1,70	0,26	0,20	0,10
CR003388	5,70	0,40	5,47	0,40	0,27	0,12
CR003389	27,67	2,76	27,20	2,88	0,50	0,36
CR003390	15,97	3,86	15,80	3,99	0,23	0,15
CR003391	29,77	3,85	29,57	3,85	0,27	0,06
CR003392	4,13	1,21	4,00	1,15	0,17	0,06
CR005298	39,90	2,92	22,37	3,04	17,57	0,42
CR005299	8,65	0,78	8,30	0,99	0,35	0,21
CR005300	57,47	1,69	53,47	1,86	4,10	0,92
CR005301	25,37	1,65	24,00	2,26	1,60	0,82
CR005302	61,10	5,20	60,10	4,77	1,00	0,46
CR005303	53,57	8,52	53,07	8,36	0,53	0,47
CR005304	67,00	5,80	5,53	1,37	61,63	6,98
CR005305	3,83	0,78	3,53	0,61	0,40	0,17
CR005306	9,43	1,63	8,07	2,17	1,37	0,72
CR005307	8,17	1,20	5,20	0,87	3,00	0,82

[00227] A Tabela 8 mostra a média e o desvio padrão para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para a TTR testada e os dgRNAs de controle transfetados com a proteína Spy Cas9 (RNP) em hepatócitos primários humanos.

**Tabela 8: Dados de edição de TTR em hepatócitos primários humanos transfetados com Spy Cas9 carregado com dgRNAs**

ID GUIA	% de edição média	% de edição desvio padrão	% de inserto média	% de inserto desvio padrão	% de deleção desvio padrão	% de deleção desvio padrão
CR001261	32,51	1,00	12,50	0,47	20,01	0,59
CR001262	50,09	1,48	45,25	1,69	4,83	0,31
CR001263	15,25	2,41	14,83	2,37	0,42	0,10

CR001264	45,30	3,48	23,87	2,09	21,43	1,68
CR003335	51,14	4,27	49,51	4,04	1,63	0,25
CR003336	30,70	2,41	30,11	2,48	0,58	0,11
CR003337	49,43	4,75	47,54	4,49	1,88	0,47
CR003338	61,34	3,55	59,13	3,44	2,22	0,11
CR003339	45,06	9,83	8,85	1,65	36,21	8,34
CR003340	10,44	2,44	5,94	1,34	4,50	1,16
CR003341	19,66	3,67	14,64	3,31	5,02	0,37
CR003342	20,66	2,55	19,85	2,54	0,81	0,15
CR003343	43,25	4,47	41,61	4,26	1,63	0,33
CR003344	35,45	13,12	30,97	11,72	4,48	1,51
CR003345	28,90	6,33	21,00	5,23	7,91	1,81
CR003346	4,11	1,36	2,27	0,53	1,84	0,85
CR003347	66,35	4,48	66,11	4,51	0,24	0,08
CR003348	23,18	2,16	13,74	1,17	9,44	0,99
CR003349	10,83	1,57	9,00	1,41	1,83	0,32
CR003350	24,84	2,74	19,77	1,91	5,07	0,89
CR003351	40,28	1,31	23,92	0,70	16,36	0,78
CR003352	30,48	1,93	27,27	2,31	3,21	0,38
CR003353	61,54	4,13	59,38	4,04	2,16	0,11
CR003354	10,31	1,47	10,07	1,50	0,23	0,11
CR003355	19,11	0,92	17,69	0,79	1,42	0,44
CR003356	7,53	1,78	6,24	1,51	1,29	0,32
CR003357	49,35	2,53	48,45	2,54	0,90	0,13
CR003358	31,62	5,97	25,95	5,03	5,67	1,04
CR003359	59,47	6,05	50,96	5,69	8,51	0,54
CR003360	31,47	4,12	30,27	4,21	1,19	0,22
CR003361	13,08	1,48	12,52	1,45	0,56	0,18
CR003362	11,65	1,24	11,10	1,06	0,56	0,36
CR003363	27,65	2,84	21,47	2,39	6,18	0,61
CR003364	35,29	3,50	23,93	2,63	11,36	1,16
CR003365	47,78	3,67	40,24	3,12	7,54	0,72
CR003366	42,74	3,41	37,95	2,88	4,79	0,60
CR003367	31,19	4,60	16,06	2,66	15,13	1,94
CR003368	34,83	5,05	33,83	5,09	1,00	0,10
CR003369	12,98	0,26	11,67	0,21	1,31	0,11
CR003370	20,06	1,79	18,80	1,65	1,26	0,28
CR003371	18,80	2,73	17,23	2,34	1,57	0,43
CR003372	17,56	2,26	15,74	2,16	1,81	0,10

CR003373	3,64	0,29	3,44	0,30	0,19	0,07
CR003374	2,65	0,33	2,52	0,33	0,14	0,02
CR003375	5,04	0,66	4,93	0,66	0,11	0,01
CR003376	5,00	1,10	4,86	1,10	0,14	0,03
CR003377	12,77	2,00	12,45	1,84	0,31	0,18
CR003378	8,66	1,90	8,24	1,74	0,42	0,19
CR003379	16,86	2,62	16,51	2,62	0,34	0,08
CR003380	8,17	1,42	7,71	1,47	0,46	0,10
CR003381	7,15	0,73	6,88	0,67	0,27	0,07
CR003382	2,44	0,06	2,28	0,05	0,15	0,03
CR003383	4,76	0,40	4,52	0,42	0,24	0,09
CR003384	3,56	0,26	3,39	0,26	0,17	0,01
CR003385	41,15	6,06	38,15	5,59	3,00	0,48
CR003386	3,22	0,25	2,97	0,27	0,25	0,02
CR003387	1,79	0,11	1,68	0,09	0,11	0,04
CR003388	5,43	1,03	4,38	1,00	1,05	0,25
CR003389	19,87	4,39	19,19	4,52	0,68	0,24
CR003390	16,09	2,84	15,85	2,91	0,24	0,09
CR003391	34,72	8,29	34,46	8,35	0,26	0,06
CR003392	10,07	1,06	9,93	1,02	0,14	0,04
CR005298	32,07	1,02	21,12	1,02	10,95	0,15
CR005299	19,37	0,61	18,79	0,51	0,58	0,13
CR005300	57,23	6,24	53,62	5,44	3,61	0,87
CR005301	31,37	3,02	29,53	2,88	1,84	0,15
CR005302	48,29	5,22	47,32	5,32	0,97	0,14
CR005303	36,45	4,83	36,06	4,72	0,39	0,12
CR005304	49,45	6,85	4,32	0,31	45,13	6,74
CR005305	7,07	1,43	6,73	1,30	0,34	0,17
CR005306	18,81	1,82	16,24	1,57	2,57	0,35
CR005307	18,73	1,68	10,18	0,92	8,55	0,88

[00228] A Tabela 9 mostra a média e o desvio padrão para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para a *TTR* testada e os dgRNAs de controle cotransfectados com o mRNA de Spy Cas9 (SEQ ID NO: 2) em hepatócitos primários humanos.

**Tabela 9: Dados de edição de *TTR* em hepatócitos primários humanos transfectados com mRNA e dgRNAs de Spy Cas9**

<b>ID GUIA</b>	<b>% de edição média</b>	<b>% de edição desvio padrão</b>	<b>% de inserto média</b>	<b>% de inserto desvio padrão</b>	<b>% de deleção desvio padrão</b>	<b>% de deleção desvio padrão</b>
CR001261	32,33	4,95	5,83	1,63	26,47	3,30
CR001262	41,50	4,71	34,43	3,31	7,13	1,42
CR001263	10,23	3,61	9,40	3,20	0,90	0,44
CR001264	42,80	0,50	11,90	1,32	30,90	1,80
CR003335	36,43	2,98	33,03	2,31	3,40	0,70
CR003336	16,93	3,78	16,20	3,41	0,80	0,44
CR003337	19,30	1,57	18,10	1,44	1,23	0,15
CR003338	36,30	9,55	33,73	9,27	2,73	0,49
CR003339	36,43	1,21	2,27	0,15	34,23	1,31
CR003340	24,97	2,78	1,83	0,23	23,17	2,66
CR003341	15,83	1,38	6,80	0,53	9,07	0,81
CR003342	22,10	1,27	20,60	0,57	1,50	0,71
CR003343	55,03	0,38	52,40	0,53	2,60	0,44
CR003344	31,50	1,30	22,40	1,31	9,20	0,10
CR003345	50,65	2,90	32,30	1,56	18,45	1,20
CR003346	19,97	1,94	5,63	0,55	14,33	1,72
CR003347	41,47	3,59	41,33	3,63	0,17	0,06
CR003348	18,00	0,87	2,30	0,66	15,80	0,61
CR003349	2,57	0,81	0,90	0,35	1,70	0,46
CR003350	26,63	4,25	16,33	2,45	10,33	1,75
CR003351	26,50	1,61	10,20	0,92	16,37	0,97
CR003352	16,80	5,03	11,73	3,86	5,07	1,14
CR003353	53,73	6,01	49,50	5,82	4,43	0,75
CR003354	2,97	0,95	2,87	0,85	0,13	0,12
CR003355	12,07	2,61	10,47	2,08	1,63	0,59
CR003356	7,27	0,72	4,70	0,53	2,67	0,21
CR003357	25,93	4,55	25,30	4,22	0,63	0,35
CR003358	3,90	0,79	2,73	0,45	1,17	0,51
CR003359	32,93	4,34	25,67	3,25	7,33	1,24
CR003360	14,90	4,85	14,13	4,66	0,90	0,52
CR003361	3,53	0,60	2,73	0,55	0,87	0,15
CR003362	6,60	1,47	6,17	1,45	0,47	0,21
CR003363	16,70	1,08	11,80	0,79	4,93	0,60
CR003364	15,63	2,45	6,73	0,81	8,93	1,70
CR003365	26,90	3,05	20,23	2,02	6,67	1,16
CR003366	24,53	1,26	20,47	1,45	4,07	0,23

CR003367	37,33	1,40	14,03	0,40	23,37	1,25
CR003368	11,10	1,91	10,53	1,90	0,60	0,10
CR003369	1,60	0,46	0,90	0,20	0,70	0,36
CR003370	2,83	0,57	2,33	0,40	0,50	0,17
CR003371	3,40	0,80	2,67	0,75	0,73	0,15
CR003372	1,77	0,75	1,13	0,57	0,63	0,23
CR003373	1,40	0,36	1,00	0,35	0,37	0,12
CR003374	0,27	0,21	0,27	0,21	0,03	0,06
CR003375	1,27	0,64	1,23	0,58	0,03	0,06
CR003376	2,83	0,81	2,73	0,81	0,13	0,06
CR003377	17,53	6,35	16,97	6,11	0,57	0,25
CR003378	9,80	1,37	8,50	1,21	1,37	0,15
CR003379	13,20	1,18	12,00	1,05	1,27	0,15
CR003380	2,93	0,58	2,47	0,57	0,47	0,15
CR003381	4,07	1,21	3,33	0,96	0,73	0,25
CR003382	0,97	0,25	0,97	0,25	0,00	0,00
CR003383	15,70	3,22	2,07	0,35	13,70	2,82
CR003384	1,70	0,62	1,50	0,56	0,20	0,10
CR003385	36,77	0,70	33,23	0,74	3,60	0,26
CR003386	8,27	1,63	8,20	1,57	0,13	0,06
CR003387	7,87	1,58	7,80	1,64	0,03	0,06
CR003388	12,97	1,30	11,87	1,21	1,17	0,25
CR003389	44,27	1,72	41,47	1,59	2,83	0,15
CR003390	20,23	2,08	18,73	1,92	1,60	0,17
CR003391	15,47	5,87	15,20	5,72	0,30	0,10
CR003392	2,43	0,55	2,37	0,59	0,07	0,06
CR005298	15,70	2,79	4,13	0,87	11,60	2,00
CR005299	9,43	0,68	8,93	0,68	0,60	0,00
CR005300	31,53	3,44	27,60	2,77	3,97	0,76
CR005301	6,77	1,44	5,47	0,96	1,40	0,61
CR005302	34,80	7,17	33,67	7,01	1,13	0,21
CR005303	35,50	5,90	35,00	5,81	0,50	0,10
CR005304	45,27	4,71	0,83	0,15	44,47	4,57
CR005305	7,53	1,06	5,93	1,10	1,60	0,10
CR005306	9,97	0,38	7,13	0,23	2,87	0,12
CR005307	12,90	2,43	3,67	0,61	9,30	1,80

[00229] A Tabela 10 mostra a média e o desvio padrão para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para os dgRNAs de

TTR testadas eletroporadas com a proteína Spy Cas9 (RNP) em hepatócitos primários cyno.

**Tabela 10: Dados de edição de TTR em hepatócitos primários cyno eletroporados com a proteína Spy Cas9 e dgRNAs**

ID GUIA	% de edição média	% de edição desvio padrão	% de inserto média	% de inserto desvio padrão	% de deleção desvio padrão	% de deleção desvio padrão
CR003336	8,18	1,93	8,10	1,94	0,07	0,01
CR003337	24,94	5,80	24,10	4,71	0,84	1,10
CR003338	44,94	9,99	44,89	9,97	0,05	0,01
CR003339	8,95	0,89	4,93	0,64	4,02	0,25
CR003340	12,53	2,22	7,72	0,13	4,80	2,09
CR003341	8,43	10,53	7,66	9,91	0,77	0,63
CR003344	35,72	4,67	33,81	5,29	1,91	0,61
CR003345	52,92	3,26	30,74	0,78	22,19	2,48
CR003346	1,91	0,86	1,82	0,82	0,09	0,04
CR003347	72,41	0,38	72,15	0,73	0,25	0,34
CR003352	1,25	0,20	1,16	0,21	0,09	0,01
CR003353	4,75	0,43	4,67	0,47	0,08	0,04
CR003358	20,47	0,30	19,01	0,51	1,46	0,21
CR003359	46,17	1,14	40,66	2,00	5,51	0,86
CR003360	29,47	0,63	29,05	1,00	0,42	0,37
CR003361	4,53	0,14	4,46	0,18	0,08	0,04
CR003362	4,59	0,80	4,36	0,77	0,22	0,03
CR003363	15,64	1,92	13,24	2,65	2,39	0,73
CR003364	19,62	2,54	14,27	2,72	5,35	0,17
CR003365	10,31	1,81	9,33	1,80	0,97	0,01
CR003366	18,52	0,71	17,62	0,33	0,90	0,39
CR003368	18,56	3,89	18,30	3,77	0,26	0,11
CR003369	1,53	0,25	1,28	0,40	0,25	0,15
CR003370	2,52	0,64	2,40	0,63	0,12	0,01
CR003371	1,83	0,38	1,69	0,41	0,14	0,03
CR003372	2,15	0,30	1,83	0,33	0,32	0,04

CR003382	10,86	2,04	8,54	1,93	2,33	0,11
CR003383	8,86	2,30	4,31	0,69	4,55	1,61
CR003384	3,75	0,35	2,50	0,37	1,25	0,02
CR003385	30,96	1,61	26,84	2,20	4,12	0,59
CR003386	5,54	1,42	3,51	1,26	2,03	0,15
CR003387	4,72	0,03	4,55	0,08	0,17	0,11
CR003388	6,81	0,17	6,59	0,28	0,22	0,11
CR003389	18,83	4,99	18,05	4,92	0,78	0,07
CR003390	16,87	3,88	16,49	3,48	0,39	0,39
CR003391	36,44	1,09	35,73	1,37	0,71	0,28
CR003392	7,02	0,97	6,63	0,59	0,38	0,37
CR005299	13,48	2,96	13,23	2,74	0,26	0,22
CR005301	46,76	1,75	46,34	2,19	0,42	0,44
CR005302	1,34	0,19	1,26	0,19	0,08	0,00
CR005303	59,28	1,05	58,72	1,06	0,56	0,00
CR005305	11,28	0,39	11,13	0,39	0,15	0,00
CR005307	4,56	0,71	2,01	0,49	2,55	0,21

[00230] A Tabela 11 mostra a média e o desvio padrão para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para os dgRNAs de *TTRs* específicos de cyno testados eletroporados com a proteína Spy Cas9 (RNP) em hepatócitos primários.

**Tabela 11: Dados de edição da TTR em hepatócitos primários citopatológicos eletroporados com a proteína Spy Cas9 e dgRNAs específicos de cyno**

ID GUIA	% de edição média	% de edição desvio padrão	% de inserto média	% de inserto desvio padrão	% de deleção desvio padrão	% de deleção desvio padrão
CR000689	24,41	1,67	18,11	2,41	6,30	0,93
CR005364	27,70	0,74	0,58	0,29	27,11	0,60
CR005365	64,94	2,03	0,10	0,04	64,85	2,05
CR005366	77,00	1,17	0,33	0,27	76,67	0,99
CR005367	50,79	0,53	0,53	0,25	50,26	0,36

CR005368	27,60	2,07	0,33	0,45	27,27	2,32
CR005369	42,01	0,33	8,09	0,55	33,92	0,31
CR005370	63,52	3,21	0,59	0,33	62,93	2,88
CR005371	8,42	0,69	0,31	0,12	8,10	0,57
CR005372	17,98	1,39	0,83	0,77	17,16	0,71

### Exemplo 3. Triagem de sequências de sgRNA

#### *Triagem cruzada de sgRNAs de TTR em vários tipos de células*

[00231] Guias no formato sgRNA modificado direcionado à TTR humana e/ou cyno foram distribuídos a hepatócitos primários humanos e primários cyno, conforme descrito no Exemplo 1. Determinou-se a edição percentual para os crRNAs que compreendem cada sequência guia em cada tipo de célula e as sequências guia foram em seguida, classificadas a ordem com base na maior % de edição. Os dados de triagem para as sequências guia na Tabela 2 nas duas linhagens celulares estão listados abaixo (Tabela 12 a 15).

[00232] A Tabela 12 mostra a média e o desvio padrão para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para os sgRNAs de TTR testados transfectados com proteína Spy Cas9 (RNP) em hepatócitos primários humanos.

**Tabela 12: Dados de edição de TTR em hepatócitos primários humanos transfectados com proteína Spy Cas9 e sgRNAs**

ID GUIA	% de edição média	% de edição desvio padrão	% de inserto média	% de inserto desvio padrão	% de deleção desvio padrão	% de deleção desvio padrão
G000480	81,80	1,98	77,15	2,19	4,70	0,28
G000481	46,90	1,71	27,77	3,88	19,43	4,76
G000482	66,67	2,35	56,57	4,14	10,10	1,85
G000483	47,90	6,56	19,57	3,37	28,50	3,25
G000484	62,97	0,90	29,23	0,21	33,83	0,95
G000485	56,07	3,37	53,07	2,84	3,13	0,60
G000486	69,73	6,86	9,83	1,93	59,93	5,63
G000487	67,30	2,75	65,27	3,41	2,07	1,06

G000488	61,27	1,95	26,30	1,55	35,00	1,30
G000489	60,17	2,75	51,07	3,18	9,43	0,45
G000490	55,90	7,88	46,13	7,55	9,80	0,69
G000491	74,30	1,55	70,27	2,37	4,33	0,72
G000492	60,97	5,81	57,90	4,64	3,13	1,35
G000493	41,40	3,08	38,90	3,29	2,67	0,35
G000494	62,23	3,30	61,47	3,25	0,77	0,31
G000495	50,80	1,85	45,80	1,25	5,37	0,64
G000496	72,33	1,63	44,73	2,14	27,67	1,46
G000497	59,67	1,40	51,10	1,14	8,73	0,71
G000498	72,80	3,75	60,17	3,12	12,70	0,72
G000499	66,40	3,55	65,23	3,72	1,17	0,38
G000500	65,53	1,21	62,00	1,11	3,83	0,40
G000501	60,93	1,91	55,13	1,43	6,00	0,56

[00233] A Tabela 13 mostra a média e o desvio padrão em 12,5 nM para % de Edição,% de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para os sgRNAs de *TTR* testados cotransfectados com mRNA de Spy Cas9 (SEQ ID NO: 2) em hepatócitos primários humanos.

**Tabela 13: Dados de edição de TTR em hepatócitos primários humanos transfectados com mRNA e sgRNAs de Spy Cas9**

ID GUIA	% de edição média	% de edição desvio padrão	% de inserto média	% de inserto desvio padrão	% de deleção desvio padrão	% de deleção desvio padrão
G000480	73,28	0,61	59,85	0,13	13,47	0,51
G000481	34,30	5,26	14,62	2,59	19,77	2,72
G000482	40,93	3,95	27,70	2,92	13,25	0,97
G000483	27,82	2,93	4,05	0,51	23,85	2,43
G000484	43,37	6,79	13,98	2,61	29,48	4,15
G000485	30,82	5,76	28,87	5,50	1,97	0,28
G000486	59,13	5,62	2,82	0,86	56,37	4,92
G000487	49,57	0,99	47,38	0,89	2,27	0,24
G000488	49,40	5,05	11,98	1,40	37,48	3,68
G000489	24,25	2,82	14,17	2,01	10,28	1,38
G000490	24,72	2,35	19,38	2,04	5,38	0,41
G000491	45,93	1,22	42,42	1,06	3,60	0,33
G000492	34,65	2,21	32,45	2,01	2,22	0,25

G000493	11,55	1,35	10,65	1,58	0,97	0,30
G000494	26,22	4,03	25,17	3,89	1,07	0,15
G000495	47,77	1,88	43,40	1,91	4,45	0,17
G000496	63,30	2,60	11,08	2,10	52,25	0,67
G000497	40,33	3,32	34,48	2,71	5,85	0,61
G000498	60,02	5,42	45,20	4,34	14,90	1,08
G000499	39,30	6,04	38,58	5,86	0,77	0,12
G000500	35,50	0,61	32,47	0,49	3,10	0,18
G000501	40,32	1,50	33,82	2,04	6,62	0,55
G000567	27,28	7,59	17,35	4,72	10,02	2,94
G000568	43,75	5,83	43,00	5,81	0,80	0,18
G000570	68,42	3,64	68,08	3,61	0,35	0,00
G000571	20,47	3,41	14,47	2,72	6,13	0,78
G000572	55,42	8,13	41,62	6,48	13,85	1,60

[00234] A Tabela 14 mostra a média e o desvio padrão para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para os sgRNAs de *TTR* testados eletroporados com a proteína Spy Cas9 (RNP) em hepatocitocinos primários. Observe que as guias G000480 e G000488 têm uma incompatibilidade com cyno, o que pode comprometer sua eficiência de edição em células cyno.

**Tabela 14: Dados de edição de *TTR* em hepatócitos primários cyno eletroporados com a proteína Spy Cas9 e sgRNAs**

ID GUIA	% de edição média	% de edição desvio padrão	% de inserto média	% de inserto desvio padrão	% de deleção desvio padrão	% de deleção desvio padrão
G000480	10,20	0,56	9,83	0,81	0,37	0,25
G000481	69,13	8,62	33,73	2,67	35,50	11,23
G000482	75,17	2,34	55,23	2,00	20,03	0,85
G000485	22,93	0,95	22,00	0,82	1,07	0,21
G000486	79,90	0,79	11,90	0,85	68,07	0,35
G000488	9,63	0,50	5,37	0,38	4,27	0,35
G000489	67,53	1,15	53,53	1,56	14,17	0,64
G000490	61,67	0,72	54,47	1,10	7,27	1,23
G000491	66,20	1,11	64,37	0,47	1,90	0,70
G000493	50,13	0,74	48,07	1,69	2,10	0,98

G000494	81,53	0,71	79,57	0,49	2,07	0,67
G000498	91,37	1,48	68,50	1,64	22,87	1,50
G000499	83,40	0,36	82,00	0,20	1,43	0,55
G000500	45,20	3,66	42,60	3,80	2,63	0,25

[00235] A Tabela 15 mostra a média e o desvio padrão para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para os sgRNAs de TTR específicos para cyno testados eletroporados com a proteína Spy Cas9 (RNP) em hepatócitos primários cyno.

**Tabela 15: Dados de edição de TTR em hepatócitos primários cyno eletroporados com a proteína Spy Cas9 e sgRNAs específicos de cyno (por exemplo, aqueles com um gRNA humano análogo, ver Tabela 3)**

ID GUIA	% de edição média	% de edição desvio padrão	% de inserto média	% de inserto desvio padrão	% de deleção desvio padrão	% de deleção desvio padrão
G000502	95,10	0,96	13,97	1,69	81,27	2,60
G000503	58,53	2,40	52,07	1,68	6,50	2,46
G000504	77,17	0,96	69,73	1,29	7,53	0,57
G000505	95,53	1,06	95,50	1,01	0,10	0,10
G000506	89,43	1,36	86,90	1,64	3,07	0,42
G000507	71,17	3,22	67,03	2,39	4,60	1,65
G000508	45,63	3,01	41,57	2,95	4,17	0,91
G000509	93,03	0,81	43,60	1,30	49,73	1,76
G000510	90,80	0,53	89,13	0,40	1,77	0,12
G000511	62,77	1,63	60,87	1,55	2,00	0,35

#### **Exemplo 4. Triagem de formulações de nanopartículas lipídicas (LNP) contendo mRNA e sgRNA de Spy Ca9**

[00236] Triagem cruzada de sgRNAs de TTR formulados por LNP com mRNA de Spy Cas9 em hepatócitos primários humanos e hepatócitos primários cyno.

[00237] As formulações de nanopartículas lipídicas de sgRNAs modificados direcionadas à TTR humana e as sequências de sgRNA correspondentes de cyno foram testadas em hepatócitos primários humanos e hepatócitos primários cyno em uma curva de resposta à dose. Hepatócitos humanos e cyno primários como descrito no Exemplo 1 foram plaqueados. Ambas as linhagens celulares foram incubadas a 37°C, CO<sub>2</sub> a 5% durante 24 horas antes do tratamento com LNPs. As LNPs usadas nas experiências detalhadas nas Tabelas 16-19 foram preparadas usando o procedimento Nanoassemblr™, cada um contendo o sgRNA especificado e o mRNA de Cas9 (SEQ ID NO: 2), cada um com lipídeo. As LNPs continham lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG em uma razão molar de 45:44:9:2, respectivamente, e tinham uma razão N:P de 4,5. As LNPs foram incubadas em meio de manutenção de hepatócitos contendo soro cyno a 6% a 37°C por 5 minutos. Após a incubação, as LNPs foram adicionadas aos principais hepatócitos humanos ou cyno em uma curva de resposta à dose de 8 pontos 2 vezes a partir de 100 ng de mRNA. As células foram lisadas 72 horas após o tratamento para análise NGS, conforme descrito no Exemplo 1. Determinou-se a edição percentual para os crRNAs compreendendo cada sequência guia em cada tipo de célula e as sequências guia foram classificadas com base na maior % de edição com 12,5 ng de entrada de mRNA e concentração guia de 3,9 nM. Os dados da curva de resposta à dose para as sequências guia em ambas as linhagens celulares são mostrados nas Figs. 4 a 7. A % de edição na entrada de 12,5 ng de mRNA e a concentração guia de 3,9 nM estão listadas abaixo (Tabela 16 a 18).

[00238] A Tabela 16 mostra o desvio médio e padrão de 12,5 ng de mRNA de cas9 para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para os sgRNAs de TTR testados, formulados em nanopartículas lipídicas com mRNA de Spy Cas9 em hepatócitos primários humanos

como curvas de resposta à dose. G000570 exibiu uma curva de resposta à dose não característica em comparação com os outros sgRNAs que podem ser um artefato da experiência. Os dados são mostrados graficamente na FIG.4.

**Tabela 16: Dados de edição de TTR em hepatócitos humanos primários tratados com mRNA de Spy Cas9 formulado com LNP (SEQ ID NO: 2) e sgRNAs**

<b>ID GUIA</b>	<b>12,5 de mRNA, sgRNA 3,9 nM, % de edição média</b>	<b>% de edição desvio padrão</b>
G000480	59,33	0,73
G000481	24,37	0,37
G000482	19,10	2,64
G000483	7,37	0,67
G000484	16,67	1,23
G000485	14,23	2,36
G000486	61,33	2,59
G000487	17,37	0,95
G000488	44,80	3,00
G000489	16,85	0,06
G000490	10,53	1,90
G000491	31,60	2,33
G000492	15,87	0,44
G000493	7,33	0,73
G000494	6,37	1,07
G000495	23,97	1,66
G000496	30,73	3,76
G000497	15,10	3,30
G000498	24,43	1,30
G000499	16,07	1,67
G000500	23,57	2,44
G000501	32,30	2,49
G000567	48,95	1,06
G000568	54,60	3,68
G000570	88,30	1,84
G000572	55,45	1,20

[00239] A Tabela 17 mostra a média e o desvio padrão em 12,5 ng de mRNA e concentração guia de 3,9 nM para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para os sgRNAs de *TTR* testados, formulados em nanopartículas lipídicas com mRNA de Spy Cas9 nos hepatócitos primários cyno como curvas de resposta à dose. Os dados são mostrados graficamente na FIG.5.

**Table 17: Dados de edição de TTR em hepatócitos primários cyno tratados com mRNA de Spy Cas9 formulados por LNP (SEQ ID NO:2) e sgRNAs**

<b>ID GUIA</b>	<b>12,5 de mRNA, sgRNA 3,9 nM, % de edição média</b>	<b>% de edição desvio padrão</b>
G000480	0,73	0,15
G000481	49,20	1,39
G000482	26,13	5,33
G000483	0,73	0,60
G000484	0,10	0,00
G000485	1,43	1,02
G000489	31,87	2,40
G000490	15,23	1,08
G000491	6,37	0,38
G000492	0,70	0,28
G000493	7,63	1,14
G000494	14,30	1,06
G000495	0,73	0,06
G000497	0,23	0,06
G000498	37,90	1,42
G000499	14,63	0,70
G000500	10,47	0,32
G000501	1,37	0,31
G000567	0,10	0,00
G000568	9,25	0,21
G000570	17,30	0,85
G000571	20,20	2,26
G000572	30,60	0,42

[00240] A Tabela 18 mostra a média e o desvio padrão em 12,5 ng de mRNA e concentração guia de 3,9 nM para % de Edição, % de Inserção (Ins) e % de Deleção (Del) para os sgRNAs de *TTR* cyno específicos testados, formulados em nanopartículas lipídicas com mRNA de Spy Cas9 em hepatócitos primários cyno como curvas de resposta à dose. Os dados são mostrados graficamente na FIG.6.

**Tabela 18: Dados de edição de TTR em hepatócitos primários cyno tratados com mRNA de Spy Cas9 formulados com LNP (SEQ ID NO: 2) e sgRNAs cyno correspondentes**

<b>ID GUIA</b>	<b>12,5 de mRNA, sgRNA 3,9 nM, % de edição média</b>	<b>% de edição desvio padrão</b>
G000502	80,70	0,14
G000506	60,13	0,70
G000509	74,47	7,28
G000510	61,87	2,54

***Triagem cruzada de sgRNAs de TTR formulados com LNP com mRNA de Spy Cas9 em hepatócitos humanos primários e cyno primários***

[00241] As formulações de nanopartículas lipídicas de sgRNAs modificados direcionadas à TTR humana e as sequências de sgRNA cyno correspondentes foram testadas em hepatócitos primários humanos e hepatócitos primários cyno em uma curva de resposta à dose. Os hepatócitos primários humanos e cyno foram semeados como descrito no Exemplo 1. Ambas as linhagens celulares foram incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas antes do tratamento com LNPs. As LNPs usadas nas experiências detalhadas nas Tabelas 20-22 foram preparadas usando o procedimento de fluxo cruzado descrito acima,

mas purificadas usando colunas PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) e concentradas usando unidades de filtro centrífugo Amicon (Millipore Sigma), cada uma contendo o sgRNA específico e mRNA de Cas9 (SEQ ID NO: 1). As LNPs continham lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG em uma razão molar de 50:38:9:3, respectivamente, e tinham uma razão de N:P de 6,0. As LNPs foram incubadas em meios de manutenção de hepatócitos contendo 6% de soro cyno a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 5 minutos. Após a incubação, as LNPs foram adicionadas aos hepatócitos primários humanos ou cyno em uma curva de resposta à dose de 8 pontos e três vezes a partir de 300 ng de mRNA. As células foram lisadas 72 horas após o tratamento para análise NGS como descrito no Exemplo 1. Determinou-se a edição percentual para os crRNAs compreendendo cada sequência guia em cada tipo de célula e as sequências guia foram então ordenadas com base nos valores de EC<sub>50</sub> e na porcentagem máxima de edição. Os dados da curva de resposta à dose para as sequências guia em ambas as linhagens celulares são mostrados nas Figs. 4 a 7. Os valores do EC<sub>50</sub> e a porcentagem máxima de edição estão listados abaixo (Tabela 19 a 22).

[00242] A Tabela 19 mostra a EC<sub>50</sub> e a edição máxima dos sgRNAs de *TTR* específicos humanos testados, formulados em nanopartículas lipídicas com mRNA de Spy Cas9 desprovido de U em hepatócitos primários humanos como curvas de resposta à dose. Os dados são mostrados graficamente na FIG.4.

**Tabela 19: Dados de edição de TTR em hepatócitos primários humanos tratados com mRNA de Spy Cas9 formulados com LNP e sgRNAs específicos de humano**

<b>ID GUIA</b>	<b>EC50</b>	<b>Edição máxima</b>
G000480	0,10	98,69
G000481	1,43	87,05

G000482	0,65	97,02
G000483	1,88	77,39
G000484	0,95	94,14
G000488	0,72	95,83
G000489	1,38	86,33
G000490	1,52	94,16
G000493	2,42	63,95
G000494	1,28	75,70
G000499	0,63	96,31
G000500	0,39	88,70
G000568	0,78	95,72
G000570	0,23	98,22
G000571	2,21	71,28
G000572	0,42	97,94

[00243] A Tabela 20 mostra o EC50 e a edição máxima dos sgRNAs de *TTR* específicos humanos testados, formulados em nanopartículas lipídicas com mRNA de Spy Cas9 desprovidos de U em mRNA de Spy Cas9 em hepatócitos primários cyno como curvas de resposta à dose. Os dados são mostrados graficamente na FIG. 16.

**Tabela 20: Dados de edição de TTR em hepatócitos primários cyno tratados com mRNA de Spy Cas9 formulados por LNP e sgRNAs específicos de humano**

ID GUIA	EC50	Edição máxima
G000480	5,28	20,32
G000481	0,93	95,07
G000482	0,89	97,47
G000483	4,40	56,52
G000484	3,47	0,22
G000488	11,56	21,63
G000489	1,79	89,21
G000490	3,09	90,76

G000493	4,97	61,15
G000494	2,77	60,84
G000499	2,00	74,94
G000500	4,42	58,04
G000567	1,76	97,06
G000568	1,87	87,93
G000570	2,00	96,73
G000571	1,55	97,03
G000572	0,79	100,31

[00244] A Tabela 21 mostra o EC50 e a edição máxima dos sgRNAs de *TTR* cyno correspondentes testados, formulados em nanopartículas lipídicas com mRNA de Spy Cas9 desprovido de U em hepatócitos primários humanos como curvas de resposta à dose. Os dados são mostrados graficamente na FIG.17.

**Tabela 21: Dados de edição de TTR em hepatócitos primários humanos tratados com mRNA de Spy Cas9 formulados com LNP e sgRNAs específicos de cyno**

ID GUIA	EC50	Edição Máxima
G000502	0,70	91,50
G000504	5,16	7,16
G000505	3,57	13,48
G000506	1,26	89,49

[00245] A Tabela 22 mostra o EC50 e a edição máxima dos sgRNAs de *TTR* cyno correspondentes testados, formulados em nanopartículas lipídicas com mRNA de Spy Cas9 desprovido de U em hepatócitos primários cyno como curvas de resposta à dose. Os dados são

mostrados graficamente na FIG. 18.

**Tabela 22: Dados de edição de TTR em hepatócitos primários cyno tratados com mRNA de Spy Cas9 formulados com LNP e sgRNAs específicos de cyno**

<b>ID GUIA</b>	<b>EC50</b>	<b>Edição Máxima</b>
G000502	0,26	100,05
G000503	2,26	83,41
G000504	1,42	98,04
G000505	1,10	99,97
G000506	0,66	99,18

### **Exemplo 5. Análise fora do alvo de dgRNAs e sgRNAs de TTR**

#### **Análise fora do alvo de guias TTR**

[00246] Um ensaio baseado em inserção de oligo (ver, por exemplo, Tsai *et al.*, Nature Biotechnology 33, 187-197; 2015) foi usado para determinar potenciais sítios genômicos fora do alvo clivados por Cas9 direcionando TTR. Quarenta e cinco dgRNAs da Tabela 1 (e duas guias de controle com perfis conhecidos fora do alvo) foram rastreados nas células HEK293\_Cas9. A linhagem celular de adenocarcinoma de rim embrionário humano HEK293 que expressa constitutivamente Spy Cas9 ("HEK293\_Cas9") foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 500 µg/ml de G418. As células foram plaqueadas a uma densidade de 30.000 células/poço em uma placa de 96 poços 24 horas antes da transfecção. As células foram transfectadas com Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, Cat. 13778150) de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram transfectadas com um lipoplex contendo crRNA individual (15 nM), trRNA (15 nM) e oligo doador com (10 nM) Lipofectamine RNAiMAX (0,3 µL/poço) e OptiMem. As células foram lisadas 24 horas após a transfecção e o DNA

genômico foi extraído usando o kit Quick gDNA 96 Extraction da Zymo (catálogo # D3012), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O gDNA foi quantificado usando o kit dsDNA de alta sensibilidade Qubit (Life Technologies). As bibliotecas foram preparadas pelo método descrito anteriormente em Tsai *et al*, 2015, com pequenas modificações. O sequenciamento foi realizado no MiSeq e HiSeq 2500 da Illumina. O ensaio identificou sítios potencialmente fora do alvo para alguns dos crRNAs representados na FIG.2.

[00247] A Tabela 23 mostra o número de sítios de integração fora do alvo detectados nas células HekCas9 transfectadas com dgRNAs de TTR, juntamente com uma sequência de doadores de oligo DNA de fita dupla.

**Tabela 23: Número de sítios de integração fora do alvo detectados para dgRNAs de TTR por meio de um ensaio baseado em inserção de oligo**

ID GUIA	# Sítios
CR003335	0
CR003336	2
CR003337	10
CR003338	2
CR003339	3
CR003340	0
CR003342	0
CR003343	2
CR003344	0
CR003345	0
CR003346	0
CR003347	1
CR003348	3
CR003351	1

CR003352	2
CR003353	2
CR003355	1
CR003356	4
CR003357	3
CR003359	6
CR003360	0
CR003363	4
CR003365	3
CR003366	1
CR003367	1
CR003368	2
CR003369	2
CR003377	0
CR003380	0
CR003382	34
CR003383	1
CR003385	3
CR003386	1
CR003387	6
CR003388	2
CR003389	2
CR003390	1
CR003391	0
CR003392	0
CR005298	0
CR005300	0
CR005301	0
CR005302	1

CR005303	1
CR005304	0

[00248] Além disso, um subconjunto dos guias foi avaliado quanto ao potencial fora do alvo como sgRNAs modificados nas células Hek\_Cas9 através do método de inserção baseado em oligo descrito acima. Os resultados fora do alvo foram representados na FIG.4.

[00249] A Tabela 24 mostra o número de sítios de integração fora do alvo detectados nas células HekCas9 transfectadas com sgRNAs de TTR, juntamente com uma sequência de doadores de oligo DNA de fita dupla.

**Tabela 24: Número de sítios de integração fora do alvo detectados para sgRNAs de TTR por meio de um método de detecção de inserção**

<b>IF GUIA</b>	<b># Sítios</b>
G000480	11
G000481	3
G000482	13
G000483	5
G000484	7
G000485	22
G000486	12
G000487	14
G000488	0
G000489	19
G000490	12
G000491	28
G000492	97
G000493	7
G000494	4

G000495	13
G000496	1
G000497	26
G000498	82
G000499	4
G000500	46
G000501	4
G000567	9
G000568	937
G000570	19
G000571	16
G000572	15

#### **Exemplo 6. Sequenciamento direcionado para validar potenciais sítios fora do alvo**

[00250] As células HEK293\_Cas9 usadas no Exemplo 5 para detectar potenciais fora dos alvos superexpressam constitutivamente Cas9, levando a um número maior de potenciais "acertos" fora do alvo, em comparação com um paradigma de distribuição transitória em vários tipos de células. Além disso, ao distribuir sgRNAs (ao contrário de dgRNAs), o número de potenciais acertos fora do alvo pode ser ainda mais inflado, pois as moléculas de sgRNA são mais estáveis que os dgRNAs (especialmente quando modificados quimicamente). Por conseguinte, potenciais sítios fora do alvo identificados por um método de inserção de oligo, conforme usado no Exemplo 5, podem ser validados usando o sequenciamento direcionado dos potenciais sítios fora do alvo identificados.

[00251] Em uma abordagem, os hepatócitos primários são tratados com LNPs compreendendo mRNA de Cas9 e um sgRNA de interesse (por exemplo, um sgRNA com potenciais sítios fora do alvo para

avaliação). Os hepatócitos primários são então lisados e iniciadores que flanqueiam os potenciais sítios fora do alvo são usados para gerar um amplicon para a análise NGS. A identificação de indels em um determinado nível pode validar um potencial sítio fora do alvo, enquanto a falta de indels encontrados no potencial sítio fora do alvo pode indicar um falso positivo no ensaio de células HEK293\_Cas9.

### **Exemplo 7. Análise Fenotípica**

#### ***Análise de Western blot da TTR secretada***

[00252] A linhagem celular de carcinoma hepatocelular, HepG2, foi transfectada como descrito no Exemplo 1 com guias selecionados da Tabela 1 em triplicado. Dois dias após a transfecção, uma réplica foi colhida para DNA genômico e análise por sequenciamento NGS para eficiência de edição. Cinco dias após a transfecção, o meio sem soro foi substituído em um replicado. Após 4 horas, o meio foi colhido para análise da TTR secretada por WB, como descrito anteriormente. Os dados para % de edição para cada guia e redução de TTR extracelular são fornecidos na FIG.7.

#### ***Análise de Western blot de TTR intracelular***

[00253] A linhagem celular de carcinoma hepatocelular, HUH7, foi transfectada como descrito no Exemplo 1 com crRNA compreendendo as guias da Tabela 1. Os conjuntos de células transfectadas foram retidos em cultura de tecidos e passados para análises adicionais. Sete dias após a transfecção, as células foram colhidas e os extratos de células inteiras (WCEs) foram preparados e submetidos à análise por Western Blot, como descrito anteriormente.

[00254] Os WCEs foram analisados por Western Blot para redução da proteína *TTR*. A proteína *TTR* de comprimento total tem um peso molecular predito de ~ 16 kD. Uma banda com esse peso molecular foi observada nas faixas de controle no Western Blot.

[00255] A redução percentual da proteína *TTR* foi calculada usando

o software Licor Odyssey Image Studio Ver 5.2. GAPDH foi usada como controle de carregamento e sondada simultaneamente com *TTR*. Uma razão foi calculada para os valores da densitometria para GAPDH dentro de cada amostra em comparação com a região total que abrange a banda *TTR*. A redução percentual da proteína *TTR* foi determinada depois que as razões foram normalizadas para controlar as faixas. Os resultados são mostrados na FIG.8.

**Exemplo 8. Distribuição de LNP a camundongos *TTR* humanizados e camundongos com *TTR* wt (murino).**

[00256] Os camundongos humanizados em relação ao gene *TTR* foram doseados com formulações LNP 701-704 contendo os guias indicados na Tabela 25 (5 camundongos por formulação). Esses camundongos *TTR* humanizados foram projetados de modo que uma região do locus *TTR* murino endógeno fosse excluída e substituída por uma sequência ortóloga de *TTR* humana, de modo que o locus codificasse uma proteína *TTR* humana. Para comparação, 6 camundongos com *TTR* murino foram dosados com LNP700, contendo um guia (G000282) direcionando *TTR* murino. As LNPs com os números de formulação 1-5 da Tabela 25 foram preparadas usando o procedimento Nanoassemblr™ como descrito acima, enquanto as LNPs com os números de formulação 6-16 foram preparadas usando o procedimento de fluxo cruzado descrito acima, mas purificadas usando as colunas PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) e concentradas usando as unidades de filtro centrífugo Amicon (Millipore Sigma). Como controles negativos, os camundongos do genótipo correspondente foram doseados apenas com veículo (tampão Tris-solução salina-sacarose (TSS)). O fundo dos camundongos *TTR* humanizados administrados com LNPs com Números de Formulação 2-5 na Tabela 25 foi de 50% 129S6/SvEvTac 50% de C57BL/6NTac; o fundo dos camundongos *TTR* humanizados administrados com LNPs com

Números de Formulação 6-16 na Tabela 25, bem como os camundongos com *TTR* murino (administrados com LNP700, Número de Formulação 1) foi de 75% C57BL/6NTac 25% 129S6/SvEvTac.

**Tabela 25. Formulações de LNP para dosagem de camundongos *TTR* humanizados.**

Número de Formulação	LNP	Guia	Concentração de RNA (mg/ml)	Razão N:P	Razões molares (lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG, respectivamente)
1	LNP700	G000282	0,53	4,5	45:44:9:2
2	LNP701	G000481	0,46	4,5	45:44:9:2
3	LNP702	G000489	0,61	4,5	45:44:9:2
4	LNP703	G000494	0,57	4,5	45:44:9:2
5	LNP704	G000499	0,59	4,5	45:44:9:2
6	LNP1148	G000481	0,73	4,5	45:44:9:2
7	LNP1152	G000499	0,45	6,0	50:38:9:3
8	LNP1153	G000482	0,53	6,0	50:38:9:3
9	LNP1155	G000571	0,70	6,0	50:38:9:3
10	LNP1156	G000572	0,58	6,0	50:38:9:3
11	LNP1157	G000480	0,84	6,0	50:38:9:3
12	LNP1159	G000488	0,79	6,0	50:38:9:3
13	LNP1160	G000493	0,71	6,0	50:38:9:3
14	LNP1161	G000500	0,66	6,0	50:38:9:3
15	LNP1162	G000567	0,69	6,0	50:38:9:3
16	LNP1163	G000570	0,66	6,0	50:38:9:3

[00257] LNPs com números de Formulação 1-5 continham mRNA de Cas9 da SEQ ID NO: 2 e LNPs com Números de Formulação 6-16 continham mRNA de Cas9 da SEQ ID NO: 1, todos em uma razão de 1:1 em peso para o guia. Os LNPs continham lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG nas razões molares citadas na Tabela 25, respectivamente. A dosagem com LNPs com Números de Formulação

1-5 foi de 2 mg/kg (teor total de RNA) e a dosagem com LNPs com Números de Formulação 6-16 foi de 1 mg/kg (teor total de RNA). Os resultados da edição do fígado foram determinados usando iniciadores projetados para amplificar a região de interesse para a análise NGS. Os resultados da edição do fígado para os Números de Formulação 1-5 são mostrados na FIG.9 e indicam a edição da sequência *TTR* humana com cada um dos quatro guias testados em um nível > 35% de edição (valores médios) com G000494 e G000499 fornecendo valores próximos a 60%. Os resultados da edição do fígado para os números de formulação 6-8, 10-13 e 15-16 são mostrados na FIG.13 e na Tabela 26, que mostram a edição eficiente da sequência *TTR* humana com cada uma das formulações testadas. Foi observada edição superior a 38% para todas as formulações, com várias formulações fornecendo valores de edição superiores a 60%. As formulações 9 e 14 não são mostradas devido ao projeto do amplicon de PCR e um baixo número resultante de leituras de sequenciamento.

[00258] O nível de *TTR* humana no soro foi medido nos camundongos desde os números de formulação 6-8, 10-13 e 15-16. Ver FIG. 14B. A FIG. 14A é uma repetição da FIG. 13 fornecida para fins de comparação. Foi detectado um Knockdown no *TTR* sérico humano para cada formulação testada, que se correlacionou com a quantidade de edição detectada no fígado (ver FIG.14A vs 14B, Tabela 26).

**Tabela 26**

ID GUIA	% de Edição	TTR sérica (%TSS)
TSS (veículo)	0,06	100
G481	61,28	10,52
G499	65,66	8,39
G482	70,86	4,65
G572	73,52	2,11
G480	77,34	3,48
G488	59,125	27,78

G493	38,55	49,73
G567	47,525	44,24
G570	45,5	41,73
G571	33,88	11,39
G500	44,44	34,28

[00259] Em outro conjunto de experiências, camundongos TTR humanizados foram doseados com formulações de LNP em uma variedade de doses com os guias G000480, G000488, G000489 e G000502. As formulações continham mRNA de Cas9 (SEQ ID NO: 1) numa razão de 1:1 em peso para o guia. As LNPs continham lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG em uma razão molar de 50:38:9:3, respectivamente, e com uma razão N:P de 6. A dosagem foi de 1, 0,3, 0,1 ou 0,03 mg/kg (n = 5/grupo). As LNPs foram preparadas usando o procedimento de fluxo cruzado descrito acima e purificadas e concentradas usando colunas PD-10 e unidades de filtro centrífugo Amicon, respectivamente. Os resultados da edição do fígado foram determinados usando iniciadores projetados para amplificar a região de interesse para a análise NGS e os níveis séricos de TTR humana foram medidos como descrito acima. Os resultados para a edição do fígado são mostrados na FIG.26A e os níveis séricos de TTR humana na FIG.26B-C. A resposta à dose para os níveis séricos de edição e TTR foi evidente.

[00260] Em outro conjunto de experiências, camundongos TTR humanizados foram doseados com formulações de LNP em uma variedade de doses com os guias G000481, G000482, G000486 e G000499. As formulações continham mRNA de Cas9 (SEQ ID NO: 1) numa razão de 1:1 em peso para o guia. As LNPs continham lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG em uma razão molar de 50:38:9:3, respectivamente, e tinham uma razão de N:P de 6. A dosagem foi de 1, 0,3 ou 0,1 mg/kg. (n = 5/grupo). As LNPs foram preparadas usando o

procedimento de fluxo cruzado descrito acima e purificadas e concentradas usando colunas PD-10 e unidades de filtro centrífugo Amicon, respectivamente. Os resultados da edição do fígado foram determinados usando iniciadores projetados para amplificar a região de interesse para a análise NGS e os níveis séricos de TTR humana foram medidos como descrito acima. Os resultados para a edição do fígado são mostrados na FIG.27A e os níveis séricos de TTR humana na FIG.27B-C. A resposta à dose para os níveis séricos de edição e TTR foi evidente.

[00261] Em outro conjunto de experiências, camundongos TTR humanizados foram doseados com formulações de LNP em uma variedade de doses com os guias G000480, G000481, G000486, G000499 e G000502. As formulações continham mRNA de Cas9 (SEQ ID NO: 1) na razão de 1:2 em peso para o guia. As LNPs continham lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG em uma razão molar de 50:38:9:3, respectivamente, e tinham uma razão de N:P de 6. A dosagem foi de 1, 0,3 ou 0,1 mg/kg. (n = 5/grupo). As LNPs foram preparadas usando o procedimento de fluxo cruzado descrito acima e purificadas e concentradas usando colunas PD-10 e unidades de filtro centrífugo Amicon, respectivamente. Os resultados da edição do fígado foram determinados usando iniciadores projetados para amplificar a região de interesse para a análise NGS e os níveis séricos de TTR humana foram medidos como descrito acima. Os resultados para a edição do fígado são mostrados na FIG.28A e os níveis séricos de TTR humano na FIG.28B-C. A resposta à dose para os níveis séricos de edição e TTR foi evidente.

[00262] Em experimentos separados usando camundongos CD-1 do tipo selvagem, uma formulação de LNP compreendendo o guia G000502, que é homólogo cruzado entre camundongo e cyno, foi testada em um estudo de resposta à dose. A formulação continha

mRNA de Cas9 (SEQ ID NO: 1) numa razão de 1:1 em peso para o guia. A LNP continha lipídeos A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG em uma razão molar de 45:44:9:2, respectivamente, e com uma razão N:P de 6. A dosagem foi de 1, 0,3, 0,1, 0,03 ou 0,01 mg/kg (n = 5/grupo). Os resultados da edição do fígado foram determinados usando iniciadores projetados para amplificar a região de interesse para a análise NGS. Os resultados para a edição do fígado são mostrados na FIG.15A e os níveis séricos de TTR de camundongo na FIG.15B. A resposta à dose para os níveis séricos de edição e TTR foi evidente.

### **Exemplo 9. Distribuição de LNP a camundongos em doses múltiplas**

[00263] Camundongos (fêmeas do Charles River Laboratory, com idade entre 6 e 7 semanas) foram doseados com uma formulação LNP705, preparada usando procedimentos de fluxo cruzado e TFF, conforme descrito acima, contendo G000282 ("G282") e mRNA Cas9 (SEQ ID NO: 2) numa razão de 1:1 em peso e uma concentração total de RNA de 0,5 mg/ml. A LNP tinha uma razão N:P de 4,5 e continha lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG em uma razão molar de 45:44:9:2, respectivamente. Os grupos foram administrados uma vez por semana até uma, duas, três ou quatro semanas (QWx1-4) ou uma vez por mês até dois ou três meses (QMx2-3). As dosagens foram de 0,5 mg/kg ou 1 mg/kg (teor total de RNA). Os grupos de controle receberam uma dose única no dia 1 de 0,5, 1 ou 2 mg/kg. Cada grupo continha 5 camundongos. A TTR sérica foi analisada por ELISA e, na necrópsia, fígado, baço e músculo foram coletados para análise de edição de NGS. Os grupos são mostrados na Tabela 27. X = sacrifício e necrópsia. MPK = mg/kg.

### **Tabela 27. Grupos de Estudo**

Grupo	Duração/ Regime de Dose	Dose (MPK)	Dose total (MPK) dada	Dose	Dose	Dose	Dose	NX	Do se	NX
				Dia 1	Dia 8	Dia 15	Dia 22	Dia 28	Dia 43	Dia 49
1	Dose múltipla de 4 semanas / QWx4	0 (TSS controle)	0	X	X	X	X	X		
2	Dose múltipla de 2 meses / QMx3	1	3	X			X		X	X
3		0,5	1,5	X			X		X	X
4	Dose múltipla de 1 mês / QMx2	1	2	X			X	X		
5		0,5	1	X			X	X		
6	Dose múltipla de 4 semanas /QWx4	1	4	X	X	X	X	X		
7		0,5	2	X	X	X	X	X		
8	Dose múltipla de 3 semanas / QWx3	1	3		X	X	X	X		
9		0,5	1,5		X	X	X	X		
10	Dose múltipla de 2 semanas / QWx2	1	2			X	X	X		
11		0,5	1			X	X	X		
12	Dose única/QW x1	1	1				X	X		
13		0,5	0,5				X	X		
14		2	2				Dia 26	Dia 32		

[00264] A Tabela 28 e as FIGS. 10A-11B mostram resultados séricos do nível de TTR (% KD = % de knockdown). A Tabela 29 e as FIGS. 12A-C mostram resultados de edição do fígado.

**Tabela 28. Resultados da TTR sérica.**

Regime de tempo	Dose	TTR sérica (µg/mL)	TTR sérica (% KD)
QWx4	TSS	1190,7	-
QMx3	0,5	245,01	79,42
QMx2	0,5	776,73	34,77
QWx4	0,5	347,43	70,82
QWx3	0,5	405,70	65,93
QWx2	0,5	432,25	63,70
QWx1	0,5	804,06	32,47
QMx3	1	91,95	92,28
QMx2	1	176,81	85,15
QWx4	1	119,52	89,96
QWx3	1	167,15	85,96
QWx2	1	130,98	89,00
QWx1	1	573,02	51,88
QWx1	2	219,07	81,60

**Tabela 29. Resultados da edição do fígado.**

Regime de tempo	Dose	Edição de fígado (%)
QWx4	TSS	0,38
QMx3	0,5	48,18
QMx2	0,5	36,66
QWx4	0,5	56,03
QWx3	0,5	51,35
QWx2	0,5	34,77
QWx1	0,5	24,16
QMx3	1	63,40
QMx2	1	57,37
QWx4	1	62,89
QWx3	1	59,22

QWx2	1	60,12
QWx1	1	35,16
QWx1	2	60,57

[00265] Os resultados mostram que é possível criar uma dose e um efeito cumulativos com várias administrações ao longo do tempo, inclusive em intervalos semanais ou mensais, para alcançar níveis crescentes de edição e % KD de TTR.

**Exemplo 10. Carga de RNA: taxas variáveis de mRNA e gRNA:**

[00266] Este estudo avaliou a eficácia in vivo em camundongos de diferentes razões de gRNA para mRNA. Os mRNAs de Cas9 capeados CleanCap™ com a ORF da SEQ ID NO: 4, HSD 5' UTR, albumina humana 3' UTR, uma sequência de Kozak e uma cauda de poli-A foram produzidos por síntese de IVT, conforme indicado no Exemplo 1 com N1-metilpseudouridina trifosfato no lugar de trifosfato de uridina.

[00267] As formulações de LNP preparadas a partir do mRNA descrito e G282 (SEQ ID NO: 124) como descrito no Exemplo 1 com lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG em uma razão molar 50:38:9:3 e com um Razão N:P de 6. As razões mRNA de gRNA:Cas9 das formulações foram mostradas nas FIG. 19A e 19B.

[00268] Para caracterização in vivo, as LNPs foram administrados a camundongos com 0,1 mg de RNA total (mg de RNA guia + mg de mRNA) por kg (n = 5 por grupo). Aos 7-9 dias após a dose, os animais foram sacrificados, o sangue e o fígado foram coletados e a TTR sérica e a edição do fígado foram medidas como descrito no Exemplo 1. Os resultados da TTR sérica e da edição do fígado são mostrados nas FIG. 19A e 19B. Camundongos de controle negativo foram dosados com veículo TSS.

Além disso, os LNPs acima foram administrados a camundongos com uma dose constante de mRNA de 0,05 mg de mRNA por kg (n = 5 por grupo), variando a dose de gRNA de 0,06 mg por kg a 0,4 mg por kg.

Aos 7-9 dias após a dose, os animais foram sacrificados, o sangue e o fígado foram colhidos e a TTR sérica e a edição do fígado foram medidas. Os resultados de TTR sérico e de edição de fígado são mostrados nas FIG.19C e FIG.19D. Camundongos de controle negativo foram dosados com veículo TSS.

### **Exemplo 11. Análise fora do alvo de sgRNAs de TTR em hepatócitos humanos primários**

[00269] A análise fora do alvo dos sgRNAs direcionados à TTR foi realizada em hepatócitos humanos primários (PHH), como descrito no Exemplo 5, com as seguintes modificações. Os PHH foram plaqueados a uma densidade de 33.000 células por poço em placas de 96 poços revestidas com colágeno, como descrito no Exemplo 1. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células foram lavadas com meio e transfectadas usando Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, Cat. 13778150) como descrito no Exemplo 1. As células foram transfectadas com um lipoplex contendo 100 ng de mRNA de Cas9, imediatamente seguido pela adição de outro lipoplex contendo 25 nM do sgRNA e 12,5 nM do doador oligo (0,3 µL/poço). As células foram lisadas 48 horas após a transfecção e o gDNA foi extraído e analisado como descrito mais detalhadamente no Exemplo 5. Os dados estão representados graficamente na FIG.20.

[00270] A Tabela 30 mostra o número de sítios de integração fora do alvo detectados no PHH e se compara ao número de sítios que foram detectados nas células HekCas9 usadas no Exemplo 5. Menos sites foram detectados no PHH para cada guia testado em comparação à linhagem celular HekCas9, sem sítios únicos detectados apenas no PHH.

### **Tabela 30. Número de sítios de integração fora do alvo detectados para sgRNAs de TTR em PHH por meio de um ensaio baseado em inserção de oligo**

<b>ID GUIA</b>	<b># Sítios em PHH</b>	<b># Sítios em células HekCas9 (Exemplo 5)</b>
G000480	2	11
G000481	0	3
G000482	2	13
G000483	0	5
G000484	0	7
G000485	3	22
G000486	0	12
G000487	0	14
G000488	0	0
G000489	2	19
G000490	0	12
G000491	7	28
G000492	5	97
G000493	1	7
G000494	0	4
G000495	1	13
G000496	0	1
G000497	3	26
G000498	19	82
G000499	1	4
G000500	12	46
G000501	0	4
G000567	0	9
G000568	11	936
G000570	1	19
G000571	1	16
G000572	2	15

[00271] Após a identificação de potenciais sítios fora do alvo no PHH por meio do ensaio de inserção de oligo, certos sítios potenciais foram

posteriormente avaliados pelo sequenciamento de amplicons direcionados, por exemplo, conforme descrito no Exemplo 6. Além dos sítios potenciais fora do alvo identificados pela estratégia de inserção de oligo, foram incluídos na análise outros potenciais sítios fora do alvo identificados pela *predição in silico*.

[00272] Para esse fim, os PHH foram tratados com LNPs compreendendo 100 ng de mRNA de Cas9 (SEQ ID NO: 1) e o gRNA de interesse a 14,68 nM (na razão de 1:1 em peso), conforme descrito no Exemplo 4. As LNPs foram preparadas usando o procedimento de fluxo cruzado descrito acima e purificadas e concentradas usando colunas PD-10 e unidades de filtro centrífugo Amicon, respectivamente. As LNPs foram formuladas com uma razão N:P de 6,0 e continham lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG em uma razão molar de 50:38:9:2, respectivamente. Após o tratamento com LNP, o DNA genômico isolado foi analisado por NGS (por exemplo, como descrito nos Exemplos 1 e 6) para determinar se indels poderiam ser detectados no potencial sítio fora do alvo, o que seria indicativo de um evento de clivagem mediado por Cas9. As Tabelas 31 e 32 mostram os sítios potencialmente fora do alvo que foram avaliados para os gRNAs G000480 e G000486, respectivamente.

[00273] Como mostrado nas FIG.21A-B e 22A-B e Tabela 33 abaixo, os índices foram detectados em níveis baixos para apenas dois dos potenciais sítios fora do alvo identificados pelo ensaio de inserção de oligo para G000480 e apenas um para G000486. Não foram detectados indels em nenhum dos sítios preditos *in silico* para nenhum dos guias. Além disso, os indels foram detectados apenas nesses sítios usando uma dose quase saturada de LNP, já que as taxas de indel observadas nos sítios de destino para G000480 e G000486 foram de ~ 97% e ~ 91%, respectivamente (ver a Tabela 33). As coordenadas genômicas desses sítios também são relatadas nas Tabelas 31 e 32, e cada uma

corresponde a sequências que não codificam nenhuma proteína.

[00274] Foi então realizado um ensaio de resposta à dose, a fim de determinar a dose mais alta de LNP na qual nenhum alvo externo foi detectado. Os PHH foram tratados com LNPs compreendendo G000480 ou G000486 como descrito no Exemplo 4. As doses variaram em 11 pontos em relação à concentração de gRNA (0,001 nM, 0,002 nM, 0,007 nM, 0,02 nM, 0,06 nM, 0,19 nM, 0,57 nM, 1,72 nM, 5,17 nM, 15,51 nM e 46,55 nM). Como representado pela linha vertical tracejada nas FIG.21A-B e 22A-B, as concentrações mais altas (com relação à concentração de gRNA) nas quais os potenciais sítios fora do alvo não eram mais detectados para G000480 e G000486 eram de 0,57 nM e 15,51 nM, respectivamente, o que resultou em taxas de indel no alvo de 84,60% e 89,50%, respectivamente.

**Tabela 31. Potenciais sítios fora do alvo identificados por detecção de inserção e predição in silico para G000480 avaliados por sequenciamento de amplicons direcionado**

ID GUIA	ID de sítio fora do alvo (OT)	Ensaio utilizado	Coordenadas cromossômicas (hg38)	Fita
G000480	INS-OT.1	Detecção de inserção	chr7:94767406-94767426	+
G000480	INS-OT.2	Detecção de inserção	chr2:192658562-192658582	+
G000480	INS-OT.3	Detecção de inserção	chr7:4834390-4834410	+
G000480	INS-OT.4	Detecção de inserção	chr20:9216118-9216138	-
G000480	INS-OT.5	Detecção de inserção	chr10:12547071-12547091	+
G000480	INS-OT.6	Detecção de inserção	chr6:168377978-168377998	-
G000480	INS-OT.7	Detecção de inserção	chr12:114144669-114144689	-
G000480	INS-OT.8	Detecção de inserção	chr10:7376755-7376775	+
G000480	INS-OT.9	Detecção de inserção	chr2:52950299-52950319	+

G000480	INS-OT.10	Detecção de inserção	chr8:56579165-56579185	-
G000480	INS-OT.11	Detecção de inserção	chr1:189992255-189992275	+
G000480	PRED-OT.1	Predição <i>in silico</i>	chr10:12547071-12547091	+
G000480	PRE-DOT.2	Predição <i>in silico</i>	chrX:119702782-119702802	+
G000480	PRED-OT.3	Predição <i>in silico</i>	chr1:116544586-116544606	+
G000480	PRED-OT.4	Predição <i>in silico</i>	chr6:88282884-88282904	+
G000480	PRED-OT.6	Predição <i>in silico</i>	chr5:121891868-121891888	+
G000480	PRED-OT.7	Predição <i>in silico</i>	chr3:52544945-52544965	+
G000480	PRED-OT.8	Predição <i>in silico</i>	chr15:36949639-36949659	+
G000480	PRED-OT.9	Predição <i>in silico</i>	chr5:33866486-33866506	+
G000480	PRED-OT.10	Predição <i>in silico</i>	chr5:159755754-159755774	+
G000480	PRED-OT.11	Predição <i>in silico</i>	chr5:31349859-31349879	+
G000480	PRED-OT.12	Predição <i>in silico</i>	chr11:79485652-79485672	+
G000480	PRED-OT.13	Predição <i>in silico</i>	chr15:29448864-29448884	+
G000480	PRED-OT.14	Predição <i>in silico</i>	chr5:171153565-171153585	+
G000480	PRED-OT.15	Predição <i>in silico</i>	chr9:84855273-84855293	+
G000480	PRED-OT.16	Predição <i>in silico</i>	chr6:159953060-159953080	+
G000480	PRED-OT.17	Predição <i>in silico</i>	chr16:51849024-51849044	+
G000480	PRED-OT.18	Predição <i>in silico</i>	chr3:24108809-24108829	+
G000480	PRED-OT.19	Predição <i>in silico</i>	chr18:41118310-41118330	+
G000480	PRED-OT.20	Predição <i>in silico</i>	chr10:108975241-108975261	+
G000480	PREDO-T.21	Predição <i>in silico</i>	chr1:44683633-44683653	+
G000480	PRED-OT.22	Predição <i>in silico</i>	chr2:196214849-196214869	+

G000480	PRED-OT.23	Predição <i>in silico</i>	chr9:117353544-117353564	+
G000480	PRED-OT.24	Predição <i>in silico</i>	chr1:55583322-55583342	+
G000480	PRED-OT.25	Predição <i>in silico</i>	chr12:28246827-28246847	+
G000480	PRED-OT.26	Predição <i>in silico</i>	chr4:54545361-54545381	+
G000480	PRED-OT.27	Predição <i>in silico</i>	chr13:22364836-22364856	+
G000480	PRED-OT.28	Predição <i>in silico</i>	chr13:80816049-80816069	+
G000480	PRED-OT.29	Predição <i>in silico</i>	chr7:39078622-39078642	+
G000480	PRED-OT.30	Predição <i>in silico</i>	chr2:59944386-59944406	+

“INS-OT.N” refere-se a um ID de sítio não alvo detectado pela inserção de oligo, em que N é um número inteiro especificado acima; “PRED-OT.N refere-se a um ID de sítio fora do alvo predito via métodos *in silico*, em que N é um número inteiro especificado acima.

**Tabela 32. Potenciais locais fora do alvo identificados por detecção de inserção e predição *in silico* para G000486 avaliados por sequenciamento de amplicons direcionado**

ID GUIA	ID de sítio fora do alvo (OT)	Ensaio utilizado	Coordenadas cromossômicas (hg38)	Fita
G000486	INS-OT.1	Detecção de inserção	chr14:77332157-77332177	+
G000486	INS-OT.2	Detecção de inserção	chr14:54672059-54672079	-
G000486	INS-OT.3	Detecção de inserção	chr4:108513169-108513189	-
G000486	INS-OT.4	Detecção de inserção	chr5:91397023-91397043	-
G000486	INS-OT.5	Detecção de inserção	chr9:116626135-116626155	-
G000486	INS-OT.6	Detecção de inserção	chr6:73201226-73201246	+
G000486	INS-OT.7	Detecção de inserção	chr16:89368352-89368372	-
G000486	INS-OT.8	Detecção de inserção	chr7:56308371-56308391	-

G000486	INS-OT.9	Detecção de inserção	chr21:43605667-43605687	+
G000486	INS-OT.10	Detecção de inserção	chr5:26758030-26758050	+
G000486	INS-OT.11	Detecção de inserção	chr17:30656428-30656448	+
G000486	INS-OT.12	Detecção de inserção	chr8:130486452-130486472	+
G000486	PRED-OT.1	Predição <i>in silico</i>	chr11:44707064-44707084	+
G000486	PRED-OT.2	Predição <i>in silico</i>	chr5:50775396-50775416	+
G000486	PRED-OT.3	Predição <i>in silico</i>	chr4:141623949-141623969	+
G000486	PRED-OT.4	Predição <i>in silico</i>	chr1:223481186-223481206	+
G000486	PRED-OT.5	Predição <i>in silico</i>	chr6:39951487-39951507	+
G000486	PRED-OT.6	Predição <i>in silico</i>	chrY:5456047-5456067	+
G000486	PRED-OT.8	Predição <i>in silico</i>	chr6:129868719-129868739	+
G000486	PRED-OT.9	Predição <i>in silico</i>	chrX:80450312-80450332	+
G000486	PRED-OT.10	Predição <i>in silico</i>	chr7:27256771-27256791	+
G000486	PRED-OT.11	Predição <i>in silico</i>	chr3:181416528-181416548	+
G000486	PRED-OT.12	Predição <i>in silico</i>	chr7:146425020-146425040	+
G000486	PRED-OT.13	Predição <i>in silico</i>	chr3:16980977-16980997	+
G000486	PRED-OT.14	Predição <i>in silico</i>	chr7:118161002-118161022	+
G000486	PRED-OT.15	Predição <i>in silico</i>	chr6:102220539-102220559	+
G000486	PRED-OT.16	Predição <i>in silico</i>	chr12:127278991-127279011	+
G000486	PRED-OT.17	Predição <i>in silico</i>	chr2:67686631-67686651	+
G000486	PRED-OT.18	Predição <i>in silico</i>	chr1:114467665-114467685	+
G000486	PRED-OT.19	Predição <i>in silico</i>	chr3:194514436-194514456	+
G000486	PRED-OT.20	Predição <i>in silico</i>	chr14:31767581-31767601	+

G000486	PRED-OT.21	Predição <i>in silico</i>	<i>in</i>	chr16:28706209-28706229	+
G000486	PRED-OT.22	Predição <i>in silico</i>	<i>in</i>	chr8:110526279-110526299	+
G000486	PRED-OT.23	Predição <i>in silico</i>	<i>in</i>	chr19:2899814-2899834	+
G000486	PRED-OT.25	Predição <i>in silico</i>	<i>in</i>	chr3:130760261-130760281	+
G000486	PRED-OT.26	Predição <i>in silico</i>	<i>in</i>	chr11:2506046-2506066	+
G000486	PRED-OT.27	Predição <i>in silico</i>	<i>in</i>	chr2:153918318-153918338	+
G000486	PRED-OT.28	Predição <i>in silico</i>	<i>in</i>	chr14:40590226-40590246	+
G000486	PRED-OT.29	Predição <i>in silico</i>	<i>in</i>	chr18:806650-806670	+
G000486	PRED-OT.30	Predição <i>in silico</i>	<i>in</i>	chr2:117707480-117707500	+

"INS-OT.N" refere-se a um ID de sítio não alvo detectado pela inserção de oligo, em que N é um número inteiro especificado acima; "PRED-OT.N" refere-se a um ID de sítio fora do alvo predito via métodos *in silico*, em que N é um número inteiro especificado.

**Tabela 33. Sítios detectados fora do alvo em PHH tratados com LNP contendo 100 ng de mRNA e 31,03 nM de gRNA**

ID GUIA	ID de sítio fora do alvo (OT)	Tipo de sítio	Frequência Indel (usando LNP com 100 ng de mRNA de Cas9 e 14,68 nM de gRNA)	Frequência indel desvio padrão
G000480	n/a	No alvo	97,33%	1,10%
G000480	INS-OT.2	Fora do alvo	1,43%	0,40%
G000480	INS-OT.4	Fora do alvo	0,97%	0,25%
G000486	n/a	No alvo	91,33%	1,97%
G000486	INS-OT.4	Fora do alvo	0,47%	0,06%

**Exemplo 12. Distribuição de LNP ao modelo de camundongo humanizado de ATTR**

[00275] Um modelo de camundongo transgênico humanizado bem estabelecido de amiloidose ATTR hereditária que expressa a forma mutante patogênica V30M da proteína TTR humana foi usado neste exemplo. Este modelo de camundongo recapitula o fenótipo de deposição de TTR nos tecidos observados em pacientes com ATTR, inclusive no sistema nervoso periférico e no trato gastrointestinal (GI) (Ver Santos *et al.*, *Neurobiol Aging*. 2010 Feb;31(2):280-9).

[00276] Os camundongos (com idade aproximada de 4-5 meses) foram doseados com formulações de LNP preparadas usando os procedimentos de fluxo cruzado e TFF, conforme descrito no Exemplo 1. As LNPs foram formuladas com uma razão N:P de 6,0 e continham lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG em uma razão molar de 50:38:9:2, respectivamente. As LNPs continham mRNA de Cas9 (SEQ ID NO: 1) e G000481 ("G481") ou um guia de controle sem segmentação G000395 ("G395"; SEQ ID NO: 273), na razão de 1:1 de gRNA:mRNA por peso.

[00277] Os camundongos foram injetados através da veia lateral da cauda, como descrito no Exemplo 1, com uma dose única de 1 mg/kg (de teor total de RNA) de LNP com um grupo n = 10 /. 8 semanas após o tratamento, os camundongos foram sacrificados para coleta de amostras. Os níveis de proteína TTR humana foram medidos no soro e no líquido cefalorraquidiano (CSF) por ELISA como descrito anteriormente por Butler *et al.*, *Amyloid*. 2016 Jun; 23 (2): 109-18. O tecido do fígado foi analisado quanto aos níveis de edição, como descrito no Exemplo 1. Outros tecidos (estômago, cólon, nervo ciático, gânglio da raiz dorsal (DRG)) foram coletados e processados para imuno-histoquímica semiquantitativa, como descrito anteriormente por Gonçalves *et al.*, *Amyloid*. 2014 Sep; 21(3):175–184. A análise estatística dos dados de imuno-histoquímica foi realizada pelo teste de Mann Whitney com valor de  $p < 0,0001$ .

[00278] Como mostrado na FIG.23A-B, foi observada edição robusta (49,4%) de TTR em fígados de camundongos humanizados após a dose única de LNP compreendendo G481, sem edição detectada no grupo controle. A análise dos eventos de edição demonstrou que 96,8% dos eventos foram inserções, com as deleções restantes.

[00279] Como mostrado na FIG.24A-B, os níveis de proteína TTR diminuíram no plasma, mas não no CSF dos camundongos tratados, com uma queda superior a 99% dos níveis plasmáticos de TTR observados ( $p < 0,001$ ).

[00280] O knockdown quase completo de TTR observado no plasma de animais tratados correlacionou-se com a depuração da deposição de amiloide da proteína TTR nos tecidos testados. Como mostrado na FIG.25, camundongos de controle exibiram coloração amiloide em tecidos que se assemelham à fisiopatologia observada em sujeitos humanos com ATTR. A diminuição do TTR circulante editando o locus HuTTR V30M resultou em uma diminuição dramática da deposição de amiloide nos tecidos. Foi observada redução de aproximadamente 85% ou melhor na coloração de TTR nos tecidos tratados 8 semanas após o tratamento (FIG.25).

### **Exemplo 13. Knockdown de mRNA de TTR em hepatócitos humanos primários (PHH)**

[00281] Em um experimento, PHH foram cultivadas e tratadas com LNPs compreendendo mRNA de Cas9 (SEQ ID NO: 1) e um gRNA de interesse (Ver FIG.29, Tabela 34), como descrito no Exemplo 4. As LNPs foram preparadas usando o procedimento de fluxo cruzado descrito acima e purificado e concentrado usando colunas PD-10 e unidades de filtro centrífugo Amicon, respectivamente. As LNPs foram formuladas com uma razão N:P de 6,0 e continham lipídeo A, colesterol, DSPC e PEG2k-DMG em uma razão molar de 50:38:9:2,

respectivamente. As LNPs compreendiam uma razão de gRNA:mRNA de 1:2, e as células foram tratadas na dose de 300 ng (com relação à quantidade de carga de mRNA distribuída).

[00282] Noventa e seis (96) horas após o tratamento com LNP (com triplicados biológicos para cada condição), o mRNA foi purificado a partir de células PHH usando o kit mRNA DIRECT da Dynabeads (ThermoFisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. A transcrição reversa (RT) foi realizada com a transcriptase reversa Maxima (ThermoFisher Scientific) e um iniciador poli-dT. O cDNA resultante foi purificado com Ampure XP Beads (Agencourt). Para PCR quantitativo, 2% do cDNA purificado foi amplificado com Taqman Fast Advanced Mastermix e 3 conjuntos de sondas Taqman, TTR (ID do ensaio: Hs00174914\_m1), GAPDH (ID do ensaio: Hs02786624\_g1) e PPIB (ID do ensaio: Hs00168719\_m1). Os ensaios foram realizados no sistema de PCR em tempo real QuantStudio 7 Flex, de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies). A expressão relativa do mRNA de TTR foi calculada normalizando para os controles endógenos (GAPDH e PPIB) individualmente, e depois a média.

[00283] Como mostrado na FIG.29 e reproduzido numericamente na Tabela 34 abaixo, cada uma das formulações de LNP testadas resultou em knockdown do mRNA de TTR, em comparação com o controle negativo (não tratado). Os grupos na FIG.29 e na Tabela 34 são identificados pelo gRNA ID usado em cada preparação de LNP. A expressão relativa do mRNA de TTR é representada na FIG.29, enquanto a porcentagem de knockdown do mRNA de TTR é fornecida na Tabela 34.

**Tabela 34.**

<b>ID GUIA</b>	<b>% média de Knckdown</b>	<b>Desvio padrão</b>
G000480	95,19	1,68
G000481	91,39	2,39
G000482	82,31	4,51

G000483	68,78	13,45
G000484	75,22	9,05
G000488	92,77	3,76
G000489	91,85	2,77
G000490	78,34	5,76
G000493	87,53	4,54
G000494	91,15	3,63
G000499	91,38	1,71
G000500	92,90	3,15
G000567	90,89	5,39
G000568	53,44	20,20
G000570	93,38	2,66
G000571	96,17	2,07
G000572	55,92	24,53

[00284] Em um experimento separado, o knockdown de mRNA de TTR foi avaliado após o tratamento com LNPs compreendendo G000480, G000486 e G000502. As LNPs foram formuladas e o PHH foi cultivado e tratado com as LNPs, cada um como descrito na experiência acima neste Exemplo, com a exceção de que as células foram tratadas com uma dose de 100 ng (com relação à quantidade de carga de mRNA distribuída).

[00285] Noventa e seis (96) horas após o tratamento com LNP (tratamento único para cada condição), o mRNA foi purificado das células PHH usando o kit Dynabeads mRNA DIRECT (ThermoFisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. A transcrição reversa (RT) foi realizada com o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (ThermoFisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Para PCR quantitativa, 2% do cDNA foi amplificado com Taqman Fast Advanced Mastermix e 3 conjuntos de sondas Taqman, TTR (ID do ensaio: Hs00174914\_m1), GAPDH (ID do ensaio: Hs02786624\_g1) e PPIB (ID do ensaio: Hs00168719\_m1). Os ensaios foram realizados no sistema de PCR em tempo real QuantStudio 7 Flex,

de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies). A expressão relativa do mRNA de TTR foi calculada normalizando para os controles endógenos (GAPDH e PPIB) individualmente, e depois a média.

[00286] Como mostrado na FIG.30 e reproduzido numericamente na Tabela 35 abaixo, cada uma das formulações de LNP testadas resultou em knockdown do mRNA de TTR, em comparação com o controle negativo (não tratado). Os grupos na FIG.30 e na Tabela 35 são identificados pelo gRNA ID usado em cada preparação de LNP. A expressão relativa de mRNA de TTR é representada na FIG.30, enquanto a porcentagem de knockdown de mRNA de TTR é fornecida na Tabela 35.

**Tabela 35.**

<b>ID GUIA</b>	<b>% média de Knckdown</b>	<b>Desvio padrão</b>
G000480	95,61	0,92
G000486	97,36	0,63
G000502	90,94	2,63

### **Tabela de Sequências**

[00287] A tabela de sequência a seguir fornece uma lista de sequências aqui divulgadas. Entende-se que, se uma sequência de DNA (compreendendo Ts) for referenciada em relação a um RNA, Ts deverá ser substituído por Us (que pode ser modificado ou não, dependendo do contexto) e vice-versa.

Descrição	Sequência	SEQ ID No.
<p>Transcrito Cas9 com 5' UTR de HSD, ORF correspondence à SEQ ID NO: 204, sequência Kozal, e 3' UTR de ALB</p>	<pre>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT GCAGGCCTTATTCCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACT GGACATCGGAACAAACAGCGTCCGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAA GGTCCCGAGCAAGAAGTTC AAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCAT CAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGA AGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAA CAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGA CGACAGCTTCTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTCGAAGAAGACAA GAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATA CCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAAGGCTGGTCGACAG CACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGAT CAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAG CGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACAGCTGTT CGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCTTGAG CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC GGGAGAAAAGAAGACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG ACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCT</pre>	1

GCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACA  
 GATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCCTGGCAGCAAAGAACCCTGAGCGA  
 CGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGC  
 ACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCT  
 GACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGA  
 AATCTTCTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGG  
 AGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGAAAAGAT  
 GGACGGAACAGAGAAGACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG  
 AAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGG  
 AGAAGTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAA  
 GGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTAGAAATCCCCTACTA  
 CGTCGGACCCTGGCAAGAGGAAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAA  
 GAGCGAAGAAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAAGAAGTTCGACAAGGG  
 AGCAAGCGCACAGAGCTTTCATCGAAAAGATGACAAACTTCGACAAGAACCT  
 GCCGAAACGAAAAGGTCTGCGGAAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTAC  
 AGTCTACAACGAACTGACAAAAGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAA  
 GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTT  
 CAAGACAAAACAGAAAAGGTACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAA  
 GAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCAAGATCAGCGGAGTCAAGACAGATT  
 CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCAAGGACAA  
 GGACTTCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCT  
 GACACTGACACTGTTTGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAAGACTGAAGAC  
 ATACGCACACCTGTTTCGACGACAGGTTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAA  
 ATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGA  
 CAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCTGAAGAGCGACGGATTTCG  
 AAACAGAAAATTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGA  
 AGACATCCAGAAGGCACAGGTACGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACA  
 CATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAAATCCTGCAGAC  
 AGTCAAGGTTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGA  
 AAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAAGACAACACAGAAGGGACA  
 GAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACT  
 GGGAAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCCGTTCGAAAACACACAGCTGCAGAA  
 CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTGCA  
 CCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGT  
 CCCGACAGACTTCTGAAAGGACGACAGCATCGACAACAAGTCTGACAAG  
 AAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCT  
 CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCAC  
 ACAGAGAAAATTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGACTGAGCGA  
 ACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTTCGAAAACAAGACAGAT  
 CACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGA  
 CGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGTTCATCACACTGAAGAGCAA  
 GCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCACAAGGTTCAGAGAAAT  
 CAACAATACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTTCGCGGAAC  
 AGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGCTTACGGAGA  
 CTACAAGGTCTACGACGTGAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAAT  
 CGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTT  
 CAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAAGAGACCCTGAT  
 CGAAAACAACGGAGAAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTT  
 CGCAACAGTCAGAAAAGTCTGAGCATGCCGACAGTCAACATCGTCAAGAA  
 GACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAG  
 AAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTA  
 CGGAGGATTCGACAGCCCCGACAGTCCGATACAGCGTCTGGTTCGTCGAAA  
 GGTGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGG  
 AATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCAGATCGACTTCT  
 GGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC  
 GAAGTACAGCCTGTTGAACTGGAAAACGGAAGAAAAGAGAAATGCTGGCAAG  
 CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGT  
 CAACTTCTGTACTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGGA  
 AGACAACGAACAGAAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCACAAAGCACTACTTGA  
 CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCACTCTGGCAGA  
 CGCAAACCTGGACAAGGTCTGAGCGCATAACAACAGCACAGAGACAAGCC

	<p>GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCT  GGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAG  ATACACAAGCACAAAGGAAGTCTTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCAT  CACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGG  AGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAA  AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAG  CTTATTTCATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTA  AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTCTCTGTGCTTCAATT  AATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Transcrito de  Cas9  compreendendo  Cas9 ORF  correspondente  à SEQ ID NO:  205 usando  códon com  expressão  geralmente alta  em humanos</p>	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGCTGTT  GCAGGCTTATTTCGGATCCATGCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTCGACGGGGA  TAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGAACTAATTCGGTGGGTTGGGC  AGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCGAAGAAGTTCAGGTCCTGGG  GAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTT  TGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCAGGAGGCG  ACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTC  GAACGAAATGGCAAAGGTTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATC  TTTCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAA  CATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCT  GCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCGGACCTCAGATTGATCTA  CTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCGCGGACACTTCCTGATCGAAGG  CGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAACTGGT  GCAGACCTACAACCAACTGTTTCGAAAGAAAACCAATCAATGCTAGCGGCGT  CGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTGCAAGTCGCGGCGCCTCGA  AAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAA  CTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGA  CCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGA  CTTGGACAATTTGCTGGCACAATTTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCTT  TGCCGCTAAGAACCCTTCGGACGCAATCTTGTGTCCGATATCCTGCGCGT  GAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTA  CGACGAGCATCACAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCA  ACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTA  CGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCAT  CAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAAGTCTGGTCAAGCT  GAACAGGGAGGATCTGCTCCGAAACAGAGAACCCTTTGACAACGGATCCAT  TCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGGCGGCCAGGA  GGACTTTTACCATTCTCAAGGACAACCGGAAAAGATCGAGAAAATTTCT  GACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGCAATTCGCG  CTTCCGCTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAAATTT  CGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGTTCATCGAACGAT  GACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCTTAAGCACAG  CCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAAGTACTAAAGTGAATA  CGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACAGAAGAA  AGCAATTGTGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCA  GCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTCGACTCAGTGGAAAT  CAGCGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCT  CCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGA  CATCCTGGAAGATATCGTCTGACCTTGACCTTTTCGAGGATCGCGAGAT  GATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCAT  GAAACAACCTCAAGCGCCGCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAA  GCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAACACTATCCTGGATTT  CCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGA  CGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAGCACAAGTGTCCGGACA  GGGAGACTCACTCCATGAACACATCGGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGAT  TAAGAAGGGAATTCGCAAACCTGTAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGT  CATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAA  CCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTCCCGGAAAGGATGAAGCGGAT  CGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGT  GGAAAACACGACGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAA  TGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGA</p>	2

	<p>TTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCTTTCTGAAGGATGACTCGAT  CGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGGAAAGTCAGATAA  TGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCT  CCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGC  CGAGCGCGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAAGGCTGGATTTCATCAAACGGCA  GCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGGACTC  CCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAA  GGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCGGACTTTCGGAAAGGACTTCA  GTTTTACAAAGTGAGAGAAAATCAACAACACTACCATCACGGCATGACGCATA  CCTCAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGA  ATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGCTTACGACGTGAGGAAGATGAT  AGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTA  CTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGA  AATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAAACGGCGGAAATCGT  GTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAAAGTGTCTCTATGCC  GCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGCGGATTTTCAA  GGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAA  AGACTGGGACCCGAAGAGTACGGAGGATTCGATTTCGGCGACTGTCCGATA  CTCCGTCTCGTGGTGGCCAAGTGGAGAAGGAAAGAGCAAAAAGCTCAA  ATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTTGA  GAAGAACCCGATTGATTTCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAA  GGATCTGATCATCAAACCTCCCCAAGTACTCACTGTTTCAAAGTGGAAAATGG  TCGGAAGCGCATGTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAGGAAATGAGCT  GGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCTCTATCTTGCTTCGCACTACGA  AAAACCTCAAAGGCTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGA  GCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTC  AAAGCGGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCTGTTCGGCCTA  CAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCA  CTTGTTCACCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCTTCAAGTACTTCGA  TACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGC  GACCCTGATCCACCAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCT  GTCGCAGCTGGGTGGCGATTGATAGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCT  CAGCCTACCATTGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTC  TCTCTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAACAT  AAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTGTGCTTCAATTAATAAAAA  ATGGAAGAACCTCGAG</p>	
<p>sequência de sgRNA modificada ("N" pode ser qualquer nucleotídeo natural ou não natural)</p>	<p>mN * mN * mN * NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm  UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA  mAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU * mU * mU * mU</p>	<p>3</p>
<p>30/30/39 sequência poli-A</p>	<p>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  AAAAAAAAAAAAACCAA  AAA</p>	<p>4</p>
<p>CR003335 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 1)</p>	<p>CUGCUCUCCUCUGCCUUGC</p>	<p>5</p>
<p>CR003336 gRNA</p>	<p>CCUCCUCUGCCUUGCUGGAC</p>	<p>6</p>

direcionado à TTR humana (Éxon 1)		
CR003337 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 1)	CCAGUCCAGCAAGGCAGAGG	7
CR003338 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 1)	AUACCAGUCCAGCAAGGCAG	8
CR003339 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 1)	ACACAAAUACCAGUCCAGCA	9
CR003340 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 1)	UGGACUGGUUUUGUGUCUG	10
CR0033341 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 1)	CUGGUUUUGUGUCUGAGGC	11
CR003342 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	CUUCUCUACACCCAGGGCAC	12
CR003343 gRNA	CAGAGGACACUUGGAUUCAC	13

direcionado à TTR humana (Éxon 2)		
CR003344 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	UUUGACCAUCAGAGGACACU	14
CR003345 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	UCUAGAACUUUGACCAUCAG	15
CR003346 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	AAAGUUCUAGAUGCUGUCCG	16
CR003347 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	CAUUGAUGGCAGGACUGCCU	17
CR003348 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	AGGCAGUCCUGCCAUCA AUG	18
CR003349 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	UGCACGGCCACAUUGAUGGC	19
CR003350 gRNA	CACAUGCACGGCCACAUUGA	20

direcionado à TTR humana (Éxon 2)		
CR003351 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	AGCCUUUCUGAACACAUGCA	21
CR003352 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	GAAAGGCUGCUGAUGACACC	22
CR003353 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	AAAGGCUGCUGAUGACACCU	23
CR003354 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	ACCUGGGAGCCAUUUGCCUC	24
CR003355 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	CCCAGAGGCAAUUGGCUCCC	25
CR003356 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	GCAACUUACCCAGAGGCAAA	26
CR003357 gRNA	UUCUUUGGCAACUUACCCAG	27

direcionado à TTR humana (Éxon 2)		
CR003358 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	AUGCAGCUCUCCAGACUCAC	28
CR003359 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	AGUGAGUCUGGAGAGCUGCA	29
CR003360 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	GUGAGUCUGGAGAGCUGCAU	30
CR003361 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	GCUGCAUGGGCUCACAACUG	31
CR003362 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	GCAUGGGCUCACAACUGAGG	32
CR003363 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	ACUGAGGAGGAAUUUGUAGA	33
CR003364 gRNA	CUGAGGAGGAAUUUGUAGAA	34

direcionado à TTR humana (Éxon 3)		
CR003365 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	UGUAGAAGGGAUUACAAAG	35
CR003366 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	AAAUAGACACCAAUCUUAC	36
CR003367 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	AGACACCAAUCUUACUGGA	37
CR003368 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	AAGUGCCUCCAGUAAGAUU	38
CR003369 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	CUCUGCAUGCUCUAUGGAAUG	39
CR003370 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	CCUCUGCAUGCUCUAUGGAAU	40
CR003371 gRNA	ACCUCUGCAUGCUCUAUGGAA	41

direcionado à TTR humana (Éxon 3)		
CR003372 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	UACUCACCUCUGCAUGCUC	42
CR003373 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	GUAUUCACAGCCAACGACUC	43
CR003374 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	GCGGCGGGGGCCGGAGUCGU	44
CR003375 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	AAUGGUGUAGCGGCGGGGGC	45
CR003376 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	CGGCAAUGGUGUAGCGGCGG	46
CR003377 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	GCGGCAAUGGUGUAGCGGCG	47
CR003378 gRNA	GGCGGCAAUGGUGUAGCGGC	48

direcionado à TTR humana (Éxon 4)		
CR003379 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	GGGCGGCAAUGGUGUAGCGG	49
CR003380 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	GCAGGGCGGCAAUGGUGUAG	50
CR003381 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	GGGGCUCAGCAGGGCGGCAA	51
CR003382 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	GGAGUAGGGGCUCAGCAGGG	52
CR003383 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	AUAGGAGUAGGGGCUCAGCA	53
CR003384 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	AAUAGGAGUAGGGGCUCAGC	54
CR003385 gRNA	CCCCUACUCCUAUUCCACCA	55

direcionado à TTR humana (Éxon 4)		
CR003386 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	CCGUGGUGGAAUAGGAGUAG	56
CR003387 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	GCCGUGGUGGAAUAGGAGUA	57
CR003388 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	GACGACAGCCGUGGUGGAAU	58
CR003389 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	AUUGGUGACGACAGCCGUGG	59
CR003390 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	GGGAUUGGUGACGACAGCCG	60
CR003391 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	GGCUGUCGUCACCAAUCCCA	61
CR003392 gRNA	AGUCCCUCAUUCUUGGGAU	62

direcionado à TTR humana (Éxon 4)		
CR005298 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 1)	UCCACUCAUUCUUGGCAGGA	63
CR005299 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	AGCCGUGGUGGAAUAGGAGU	64
CR005300 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 1)	UCACAGAAACACUCACCGUA	65
CR005301 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 1)	GUCACAGAAACACUCACCGU	66
CR005302 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	ACGUGUCUUCUCUACACCCA	67
CR005303 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 2)	UGAAUCCAAGUGUCCUCUGA	68
CR005304 gRNA	GGCCGUGCAUGUGUUCAGAA	69

direcionado à TTR humana (Éxon 2)		
CR005305 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	UAUAGGAAAACCAGUGAGUC	70
CR005306 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 3)	AAAUCUUACUGGAAGGCACU	71
CR005307 gRNA direcionado à TTR humana (Éxon 4)	UGUCUGUCUUCUCUCAUAGG	72
CR000689 gRNA direcionado à TTR Cyno	ACACAAAUACCAGUCCAGCG	73
CR005364 gRNA direcionado à TTR Cyno	AAAGGCUGCUGAUGAGACCU	74
CR005365 gRNA direcionado à TTR Cyno	CAUUGACAGCAGGACUGCCU	75
CR005366 gRNA direcionado à TTR Cyno	AUACCAGUCCAGCGAGGCAG	76
CR005367	CCAGUCCAGCGAGGCAGAGG	77

gRNA direcionado à TTR Cyno		
CR005368 gRNA direcionado à TTR Cyno	CCUCCUCUGCCUCGCUGGAC	78
CR005369 gRNA direcionado à TTR Cyno	AAAGUUCUAGAUGCCGUCCG	79
CR005370 gRNA direcionado à TTR Cyno	ACUUGUCUUCUCUAUACCCA	80
CR005371 gRNA direcionado à TTR Cyno	AAGUGACUCCAGUAAGAUU	81
CR005372 gRNA direcionado à TTR Cyno	AAAAGGCUGCUGAUGAGACC	82
	Não utilizado	83
	Não utilizado	84
	Não utilizado	85
	Não utilizado	86
G000480 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	87
G000481 sequência	mU*mC*mU*AGAACUUUGACCAUCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	88

modificada de sgRNA direcionada à TTR humana		
G000482 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mU*mG*mU*AGAAGGCAUUAACAAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	89
G000483 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mU*mC*mC*ACUCAUUCUUGGCAGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	90
G000484 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mA*mG*mA*CACCAAUUCUUGGCAGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	91
G000485 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mC*mC*mU*CCUCUGCCUUGCUGGACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	92
G000486 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	93
G000487 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mU*mU*mC*UUUGGCAACUUACCCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	94

sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana		
G000488 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCUGUCCGGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	95
G000489 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mU*mU*mU*GACCAUCAGAGGACACUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	96
G000490 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mA*mA*mA*UAGACACCAAUCUUACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	97
G000491 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mA*mU*mA*CCAGUCCAGCAAGGCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	98
G000492 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mC*mU*mU*CUCUACACCCAGGGCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	99

G000493 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mA*mA*mG*UGCCUCCAGUAAGAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	100
G000494 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mG*mU*mG*AGUCUGGAGAGCUGCAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	101
G000495 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mC*mA*mG*AGGACACUUGGAUUCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	102
G000496 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mG*mG*mC*CGUGCAUGUGUUCAGAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	103
G000497 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mC*mU*mG*CUCCUCCUCUGCCUUGCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	104
G000498 sequência modificada de sgRNA direcionada à	mA*mG*mU*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	105

TTR humana		
G000499 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mU*mG*mA*AUCCAAGUGUCCUCUGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	106
G000500 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mC*mC*mA*GUCCAGCAAGGCAGAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	107
G000501 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mU*mC*mA*CAGAAACACUCACCUGUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	108
G000567 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mG*mA*mA*AGGCUGCUGAUGACACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	109
G000568 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mG*mG*mC*UGUCGUCACCAUCCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	110
G000570 sequência modificada de sgRNA	mC*mA*mU*UGAUGGCAGGACUGCCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	111

direcionada à TTR humana		
G000571 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mG*mU*mC*ACAGAAACACUCACCGUGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	112
G000572 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR humana	mC*mC*mC*CUACUCCUAUUCACCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	113
G000502 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR Cyno	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	114
G000503 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR Cyno	mA*mA*mA*AGGUCGUGAUGAGACCGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	115
G000504 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR Cyno	mA*mA*mA*GGUCGUGAUGAGACCGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	116
G000505 sequência modificada de	mC*mA*mU*UGACAGCAGGACUGCCUGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	117

sgRNA direcionada à TTR Cyno		
G000506 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR Cyno	mA*mU*mA*CCAGUCCAGCGAGGCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	118
G000507 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR Cyno	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	119
G000508 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR Cyno	mC*mC*mU*CCUCGCCCUCGCUGGACGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	120
G000509 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR Cyno	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGUCCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	121
G000510 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR Cyno	mA*mC*mU*UGUCUUCUCUAUAGCCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	122
G000511 sequência	mA*mA*mG*UGACUUCAGUAAGAUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	123

modificada de sgRNA direcionada à TTR Cyno		
G000282 sequência modificada de sgRNA direcionada à TTR de camundongo	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	124
	Não utilizado	125 a 200
Sequência de codificação de DNA de Cas9 usando o análogo da timidina dos códon mínimos de uridina listados na Tabela 3, com códon de início e de parada	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAAACAGCGTCGGA TGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTCAAGGTC CTGGGAAACACAGACAGACAGCATCAAGAAGAACCCTGATCGGAGCACTG CTGTTGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCA AGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATC TTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAA GAAAGCTTCTGGTCAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTC GGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAGAAAAGTACCCGACAATCTAC CACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTG ATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTGATC GAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAAGCTGTTTCATCCAG CTGGTCCAGACATAAACCAGCTGTTGAAAGAAAACCCGATCAACGCAAGC GGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGA CTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTT GGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAAC TTCGACCTGGCAGAAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGAC GACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTG TTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTG AGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCCTGAGCGCAAGCATGATCAAG AGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGA CAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC GGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAG	201

<p> TTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTC  AAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAACATTCGACACCGGA  AGCATCCCAGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGA  CAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAG  ATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCCTGGCAAGAGGAAAC  AGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGG  AACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAA  AGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCCTGCCGAAG  CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAAGGTC  AAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAAGCCGGCATTCCCTGAGCGGAGAACAG  AAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAAACAGAAAAGGTCACAGTC  AAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTC  GAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAC  GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAAGAAAAC  GAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAGA  GAAATGATCGAAGAAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGCAAG  GTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGC  AGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAAGACAATCCTG  GACTTCTGAAGAGCGACGGATTTCGAAAACAGAAAACCTCATGCAGCTGATC  CACGACGACAGCCTGACATTCAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGC  GGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGAAAACCTGGCAGGAAGCCCG  GCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTC  AAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGA  GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGATGAAG  AGAATCGAAGAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACAC  CCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTG  CAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACCTGGACATCAACAGACTG  AGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGAC  AGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAAGAGC  GACAACGTCCCAGCGAAGAAGTCGTCAGAAGATGAAGAACTACTGGAGA  CAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAAGTTCGACAACCTGACA  AAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAG  AGACAGCTGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAGCAGCTCGCACAGATCCTG  GACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAA  GTCAAGGTCATCAGACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGAC  TTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGAC  GCATACCTGAACGCAAGTCTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAG  CTGGAAAAGCGAATTCGTCACGGAGACTACAAGGTCACGACGTCAGAAAG  ATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAAGGCAACAGCAAAGTACTTC  TTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAC  GGAGAAATCAGAAAAGAGACCCTGATCGAAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAA  ATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAAGGTCCTGAGC  ATGCCGAGGTCACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTC  AGCAAGGAAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGA  AAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTC  GCATACAGCGTCTGGTCTGCAAAAGGTCGAAAAGGAAAAGAGCAAGAAG  CTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAAGAGCAGC  TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTGGAAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTC  AAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAA  AACGGAAGAAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAGTGCAGAAGGGAAAC  GAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACTTGGCAAGCCAC  TACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTTC  GTCGAAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAAATCATCGAACAGATCAGCGAA  TTCAGCAAGAGAGTTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC  GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC  ATCCACCTGTTCACTGACAAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTAC  TTCGACACAACAATCGACAGAAAAGAGATACACAAGCACAAGGAAGTCCTG  GACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAATC  GACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA  AAGTCTAG </p>	
---	--

<p>Sequência de codificação de DNA de Cas9 usando códons com expressão geralmente alta em humanos</p>	<pre> ATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCOGTGGGT TGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTC CTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTG CTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCG AGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGTATCTGCAAGAGATC TTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAGCTTCTCCACCGCCTGGAA GAATCTTTCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGCGCATCCTATCTTT GGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTAC CATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTG ATCTACTTGGCCCTCGCCATATGATCAAATTCGCGGACACTTCCTGATC GAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAA CTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTGAAAGAAAACCAATCAATGCTAGC GGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCGGCTGTGGAAGTCGCGGCGC CTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTC GGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAAT TTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGAC GACGACTTGACAATTTGCTGGCACAAATTTGGCGATCAGTACGCGGATCTG TTCCTTGGCCGTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTTGTGTCCGATATCCTG CGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAG CGGTACGACGAGCATCACAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGA CAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAAT GGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAG TTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTC AAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACAACGGA TCCATTCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGGCGGCGC CAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGAAAAGATCGAGAAA ATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCACTGGCGCGCGCAAT TCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGG AATTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTTCATCGAA CGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAG CACAGCCTCCTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTG AAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACAG AAGAAAGCAATGTGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTC AAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTCGACTCAGTG GAAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCACAGCTTCGCTGGGAACCTATCAT GATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAAC GAGGACATCCTGGAAGATATCGTCTGACCTTGACCTTTTCGAGGATCGC GAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAG GTCATGAAACAACCAAGCGCCGCGGTACACTGGTTGGGGCCGCTCTCC CGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACCTATCCTG GATTTCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAATTGATC CACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAGCACAAGTGTCC GGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGTTTCGCCG CGGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTG AAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGA GAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAACCTCCCGGAAAGGATGAAG CGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGACGACAGATCCTGAAAGAGCAC CCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTG CAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTG TCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCTTTCTGAAGGATGAC TCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAAGTCA GATAATGTGCCATCGGAGGAGTCTGTAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGG CAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAAGTTGACAATCTCACT AAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTATCAAAA CGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTG GACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAA GTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCCGACTTTTCGGAAGGAC TTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGAC GCATACCTCAACGCTGTGGTCCGTACCGCCTGATCAAAAAGTACCTAAA CTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAG </pre>	202
---	--	-----

	<p>ATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAATACTTC  TTTTACTCAAACATCATGAACCTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAAT  GGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAA  ATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAAAGTGCTCTCT  ATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGGCGATT  TCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGC  AAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGATTCCGGCGACTGTC  GCATACTCCGTCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAG  CTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCG  TTCGAGAAGAACCCTGATTGATTTCCCTCGAGGGCAAGGGTTACAAGGAGGTG  AAGAAGGATCTGATCATCAAACCTCCCAAGTACTCACTGTTTCGAACTGGAA  AATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAAT  GAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCCTCGCAC  TACGAAAAACTCAAAGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTC  GTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAG  TTTTCAAAGCGCGTATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCTGTCG  GCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATT  ATCCACTTGTTTACCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCTTCAAGTAC  TTCGATACTACTATCGATCGAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTG  GACCGACCCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATC  GATCTGTGCGAGCTGGGTGGCGATGGCGGTGGATCTCCGAAAAAGAAGAGA  AAGGTGTAATGA</p>	
Sequência de aminoácidos de Cas9 com um sinal de localização nuclear (1xNLS) como os aminoácidos C-terminais	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGVAVITDEYKVPSPKPKVVLGNTDRHSIKKNLIGAL  LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEI FSNEMAKVDDSPFHRLE  ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL  IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFILVQTYNQLFEEENPINAS  GVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSGLTPNFKSN  FDLAEDAKLQLSKDYTDLNDLNAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL  RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRRQQLPEKYKEIFFDQSKN  GYAGYIDGGASQEEFYKFKPILEKMDGTEELLVKLNRDILLRQRTFONG  SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYVVGPLARGN  SRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGSASQSFIERMTNFDKNLNEKVLPK  HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTRKVTV  KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEEN  EDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS  RKLINGIRDKQSGKTIIDFLKSDGFANRNFQMLIHDDSLTFKEDIQKAQVS  GGGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIEMAR  ENQTTQKQKNSRERMKRIEIEGKELGSQLKEHPVENTQLQNEKLYLYYL  QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLLKDDSIDNKVLRSDKNRGS  DNVPSSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGLSELDAKGFIK  RQLVETRQITKHVAQIILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKD  FQFYKVIENNYHHADAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVIYDVRK  MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE  IVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIIVKKEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIAR  KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKVKSKKLSVKELLGITIMERS  FEKNPIDFLEAKYKEVKKDLIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN  ELALPSKYVNFYLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE  FSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAFKY  FDTTIDRKRYTSTKEVLDTLHQSIITGLYETRIDLSQLGGDGGSPKKR  KV</p>	203
ORF de mRNA de Cas9 usando códons mínimos de uridina, com códons de início e parada	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGA  UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCGAGCAAGAAGUUAAGGUC  CUGGGAAACACAGACAGACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG  CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA  AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAGAACAAGAAUCUACCUAGCAGGAAAU  UUCAGCAACGAAUUGGCAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAA  GAAAGCUUCUGGUCGAAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC  GGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC  CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG</p>	204

	<p>AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCUAGUUCAGAGGACACUUCUGAUC  GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUCCAG  CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC  GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA  CUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC  GGAAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAGAGCAAC  UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUCGAC  GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG  UUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUG  AGAGUCAACACAGAAAUCACAAGGCACCCGUGAGCGCAAGCAUGAUCAG  AGAUACGACGAAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA  CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC  GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG  UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUUGGACGGAAACAGAAGAUCUGCUGGUC  AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGGA  AGCAUCCCGCACAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA  CAGGAAGACUUCUACCCGUUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUUCGAAAAG  AUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCCGUGGCAAGAGGAAAC  AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAAGAGCGAAGAAAACAUCACACCCUGG  AAUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA  AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG  CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAAGGUC  AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAG  AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAACAGAAAGGUCACAGUC  AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGAAGAUUCGAAUGCUUCGACAGCGUC  GAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACUACCAC  GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAAC  GAAGACAUCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA  GAAUUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG  GUCUUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC  AGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAACUCCUG  GACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCUAGCAGCUGAUC  CACGACGACAGCCUGACAUCAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGC  GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCCUGGCAGGAAGCCCG  GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAAACUGGUC  AAGGUCAUGGGAAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA  GAAAACCCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAG  AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCUGAAGGAACAC  CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCGUACUACCUG  CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAAACAGACUG  AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCUGAAGGACGAC  AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAGAAGCGACAGAACAAGAGGAAAGGAGC  GACAAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA  CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA  AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAAGGCAGGAUUCUACAAG  AGACAGCUGGUCGAAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGACAGAUCCUG  GACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA  GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAAGGAC  UUCAGUUCUACAAGGUACAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGACACGAC  GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAGAAGUACCCGAAG  CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAAG  AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAGGCAACAGCAAAGUACUUC  UUCUACAGCAACAUCUAGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAAC  GGAGAAAUCAGAAAAGAGACCCGUGAUCGAAAACAACCGGAGAAAACAGGAGAA  AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC  AUGCCGACAGGUCAACUUCGUCUAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC  AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA  AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC  GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAGGUCGAAAAGGGAAGGAAAGCAAGAAG  CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAUCUAGGAAAGGAAAGCAGC  UUCGAAAAGAACCUGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAAGGAAGUC</p>	
--	--	--

	<p>AAGAAGGACCUGAUCUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA  AACGGAAGAAAGAGAAUUCUGGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC  GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCACUUCUCCUGUACCUUGGCAAGCCAC  UACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAACGAACGAGAAGCAGCUGUUC  GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAA  UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC  GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAU  AUCCACCUGUUCACACUGACAAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAGUAC  UUCGACACAACAUCGACAGAAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG  GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUC  GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA  AAGGUCUAG</p>	
<p>ORF de mRNA  de Cas9 usando  códons com  expressão  geralmente alta  em humanos,  com códons de  início e parada</p>	<p>AUGGAUAGAAGUACUCAUUCGGGCGUGGAUAUCGGAACUAAUUCGUGGGU  UGGGCAGUGAUCACGGAUGAAUACAAGUGCCGUCUCAAAGAAGUUCAGGUC  CUGGGGAACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAUUCUAUCGGAGCCUG  CUGUUGACUCCGGCGAAACCGCAGAGCGACCCGGUCUAAACGUACCGCG  AGGGCAGCUCACCCGGCGGAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAU  UUUUCGAACGAAUUGGCAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACCAGCCUGGAA  GAAUCUUUCUGGUGGAGGAGACAAGAGCAUGAACGGCAUCCUUAUCUUU  GGAAACAUCGUCGAGAGUGGGCUACCACGAAAAGUACCCGACCAUCUAC  CAUCUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUCAACUGACAAGGCCAGCCUAGAUUG  AUCUACUUGGCCUUCGCCCAGUAUGAUCAAAUUCGCGGACACUUCUGAUC  GAAGGCGAUCUGAACCCUGAUAACUCCGACGUGGAUAAGCUUUUCAUCAA  CUGGUGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAAGAAAACCCAAUCAUAGCUAGC  GGCGUCGAUGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGUCUGCAAGUCGCGGCGC  CUCGAAAACCGUAUCGCACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACUUUUC  GGCAACUUGAUCGCUCUCACUUGGGACUCACUCCAAUUUCAAGUCCAAU  UUUGACCUGGCCGAGGACGCGAAGCUGCAACUCUCAAGGACACCUACGAC  GACGACUUGGACAAUUUGCUGGCACAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUG  UCCUUGCCGUAAGAACC UUUCGGACGCAAUCUUGCUGUCCGAUUAUCCUG  CGCGUGAACACCGAAUAACCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUCGAUGAUUAAG  CGGUACGACGAGCAUACCCAGGAUCUCACGCUGUCUCAAAGCGCUCGUGAGA  CAGCAACUGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUUCUUCUCCGACCAGUCCAAAGAAU  GGUACGCAAGGUUACAUUGGAUGGAGCGCUAGCCAGGAAGAUUCUAUUAAG  UUCAUCAAGCCAAUCCUGGAAAAGAUUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGUC  AAGCUGAACAGGGAGGAUCUGCUCGGAAACAGAGAACCUUUGACAACGGA  UCCAUUCACCACCAGAUCCAUCUGGGUGAGCUGCACGCCAUUCUUGCGGCGC  CAGGAGGACUUUUAACCAUUCUCAAGGACAACCGGAAAAGAUUCGAGAAA  AUUCUGACGUUCCGCAUCCCGUAUUACGUGGGCCACUGGGCGCGGCAAU  UCGCGCUUCGCGUGGUAUGACUAGAAAUCAGAGGAAACCAUCACUCCUUGG  AAUUUCGAGGAAGUUGGGAUAAGGGAGCUCGCGCACAAAGCUUCAUCGAA  CGAAUGACCAACUUCGACAAGAAUUCUCCAAACGAGAAGGUGCUUCCUAAAG  CACAGCCUCCUUUACGAAUACUUCACUGUCUACAACGAACUGACUAAAGUG  AAUACGUUACUGAAGGAAUGAGGAAGCCGGCCUUUCUGUCCGGAGAACAG  AAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGCUGUUCAGACCAACCGCAAGGUGACCCGUC  AAGCAGCUUAAAAGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGUUUCGACUCAGUG  GAAAUCAGCGGGGUGGAGGACAGAUUCAACGCUUCGCUUGGGAACCUAUCAU  GAUCUCCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUCCUUGACAACGAGGAGAAC  GAGGACAUCCUGGAAGAUUCGUCUCCUGACCUUGACCCUUUUCGAGGAUCGC  GAGAUGAUCGAGGAGAGGCUUAAGACCUACGCUCUUCUUCGACGAUAAG  GUCAUGAAAACAUCUAAAGCGCCCGGUAACUUGGUUGGGCCCGCUCUCC  CGCAAGCUGAUAACGGUAUUCGCGAUAACAGAGCGGUAAAAACUAUCCUG  GAUUUCCUCAAUUCGGAUGGCUUCGCUAAUCGUAACUUCAGUCAAUUGAUC  CACGACGACAGCCUGACCUUUAAGGAGGACAUCAAAAGCACAAGUGUCC  GGACAGGGAGACUCACUCCAUGAACACAUCGCGAAUCUGGCCGGUUCGCGG  GCGAUUAAAGAGGGAAUUCUGCAAACUGUGAAGGUGGUCGACGAGCUGGUG  AAGGUCAUGGGACGGCACAAACCGGAGAAUAUCGUGAUUGAAAUGGCCCGA  GAAAACCAGACUACCCAGAAGGGCCAGAAAAACUCCCGGAAAGGAUGAAG  CGGAUCGAAAGAAGGAAUCAAGGAGCUGGCAGCCAGAUCCUGAAAGAGCAC  CCGGUGGAAAACAGCAGCUGCAGAACGAGAAGCUCUACCUGUACUUAUUG</p>	205

	<p>CAAAUUGGACGGGACAUGUACGUGGACCAAGAGCUGGACAUCAAUCCGUUG UCUGAUUACGACGUGGACCACAUCGUUCCACAGUCCUUCUGAAGGAUGAC UCGAUCGAUAACAAGGUGUUGACUCGACGACACAAGACAGAGGGGAAGUCA GAUAAUGUGCCAUCGCGAGGAGGUCGUGAAGAAGAUGAAGAAUACUGGCGG CAGCUCUGAAGCGAAGCUGAUUACCCAGAGAAAAGUUUGACAAUUCACAU AAAGCCGAGCGCGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUGGAUUCACAAA CGGCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCGCAGAUUCUUG GACUCCCGCAUGAACACUAAAUCGACGAGAACGAUAAGCUCUACCGGGAA GUGAAGGUGAUUACCCUGAAAAGCAAACUUGUGUCGGACUUCGGAAGGAC UUUCAGUUUACAAAGUGAGAGAAAUCAACAACUACCAUCACGCGCAUGAC GCAUACCUCAACGUCUGGUCGUAUCCGCCUGAUCAAAAAGUACCCUAAA CUUGAAUCGGAAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUUCUACGACGUGAGGAA AUGAUAGCCAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGAAAUAUCUUC UUUUACUCAAAUCAUGAACUUUUUCAAGACUGAAAUAACGUCUGGCCAAU GGAGAAAUCAGGAAGAGGCCACUGAUCGAAAACUAACGGAGAAAACGGCGAA AUCGUGUGGGACAAGGGCAGGGACUUCGCAACUGUUCGCAAAGUCUCUCU AUGCCGCAAGUCAUAUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACCGCGGGAUUU UCAAGGAAUUCGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAAGCGACAAGCUCAUUGCACGC AAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAUUCGCCGACUGUC GCAUACUCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAG CUCAAAUCGUCAAAGAGCUGCUGGGGAUUACCAUCAUGGAACGAUCCUCG UUCGAGAAGAACCAGAUUGAUUUCUCGAGGCGAAGGGUUACAAGGAGGUG AAGAAGGAUCUGAUCAUAAACUCCCAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAA AAUGUCGGAAGCGCAUGCUGGCUUCGGCCGAGAACUCCAAAAGGAAAU GAGCUGGCCUUGCCUAGCAAGUACGUAACUUCUCUAUCUUGCUUCGCAC UACGAAAACUCAAGGGUCACCGGAAGAUAAACGAACAGAAAGCAGCUUUUC GUGGAGCAGCACAAAGCAUUAUCUGGAUGAAAUCUACGAACAAUUCUCCGAG UUUUCAAAGCGCGUGAUCCUCGCGGACGCCAACUCCGACAAAGUCCUGUCG GCCUACAUAAGCAUAGAGAUAAAGCCGAUCAGAGAACAGGCCCGAGAACAUU AUCCACUUGUUCACCCUGACUAACUUGGGAGCCCCAGCCGCUUCAAGUAC UUCGAUACUACUUCGAUCGAAAAGAUACACGUCACCAAGGAAGUUCUG GACCGGACCCUGAUCCACCAAAGCAUCACUGGACUCUACGAAACUAGGAUC GAUCUGUCGACGUGGGUGGCGAUGGCGGUGGAUCUCCGAAAAGAGAGA AAGGUGUAAUGA</p>	
<p><b>Sequência de aminoácidos Cas9 nickase (D10A)</b></p>	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL LFDSETABATRLKRTARRRYTRRNRIICYLQEIFSNEMAKVDDSPFHRLE ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS GVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLGLTPNFKSN FDLAEDAQLQLSKDYYDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAIILSDIL RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRKQRTFDNG SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYVVGPLARGN SRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKASASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK HSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNKVTV KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKI IKDKDFLDNEEN EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS RKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVS QGQDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR ENQTTQKQKNSRERMKRIEIEGKELGSQLKEHPVENTQLQNEKLYLYYL QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGS DNVPSEEVVKMKNYRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK RQLVETRQITKHVAQIILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSILVSDFRKD FQFYKVIENNYHHHADAYLNAVVGTAIHKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE IVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIIVKKEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIAR KKDWDPKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGSKLLKSVKELLGITIMERS FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN ELALPSKYVNFYLAHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE FSKRVI LADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFYK FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKR KV FSKRVI LADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFYK FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKR KV</p>	206

<b>ORF de mRNA de nickase (D10A)</b>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAAACAAACAGCGUCGGA  UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAGGGUC  CUGGGAAACACAGACAGACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG  CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA  AGAAGAAGAUACACAAGAAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC  UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAA  GAAAGCUUCCUGGUCGAAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC  GGAAACAUUGUCGACGAAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC  CACCUGAGAAAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG  AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCUCCUGAUC  GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCUACUCCAG  CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC  GGAGUCGACGCAAAGGCCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA  CUGGAAAACUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC  GGAAACCUAGUCGACUGAGCCUGGGACUGACACCGAAACUUAAGAGCAAC  UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGAC  GACGACCUGGACAACCCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGACAGCCUG  UUCUUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUG  AGAGUCAACACAGAAAUCACAAGGCCACCCGUGAGCGCAAGCAUGAUCUACG  AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA  CAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUUCUUCUCCGACCAGAGCAAGAAC  GGAUACGACGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG  UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC  AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAAACGGA  AGCAUCCCGCACCCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAGA  CAGGAAGACUUCUACCCGUUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAG  AUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCCGUCGGCAAGAGGAAAC  AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCCGUGG  AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA  AGAAUGCAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG  CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAGGUC  AAGUACGUCACAGAAGGAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAG  AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAAGACAAACAGAAAAGGUCACAGUC  AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAGAAAGAUUCGAAUUCGACAGCGUC  GAAAUCAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUCCAC  GACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCUUGGACAACGAAGAAAAC  GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA  GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG  GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAUAACACAGGAUAGGGAAGACUGAGC  AGAAAGCUGAUCAAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG  GACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAAACUUAUGCAGCUGAUC  CACGACGACAGCCUGACAUCUAAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGC  GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUUGGCAGGAAGCCCG  GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC  AAGGUCUAGGGAAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA  GAAAACCCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAG  AGAAUCGAAGAAGGAUUCAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC  CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUUGUACUACCUG  CAGAACGGAAAGAGACAUUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG  AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGAC  AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC  GACAACGUCCCGAGCGAAGAAUGUCGUAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA  CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAAGUUCGACAACCCUGACA  AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCUACAAG  AGACAGCUGGUCGAAACAAAGACAGAUCAAAAGCACGUCGACAGAUCCUG  GACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA  GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAAGGAC</p>	207
--	--	-----

	UCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUAAGAAGUACCCGAAG CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC UUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC GGAGAAAUCAGAAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAA AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCUGAGC AUGCCGACGGUCAACAUCGUCUACAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUC AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAG CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAUACACAUAUGGAAAGAAAGCAGC UUCGAAAAGAACC CGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGACUGGAA AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAGCGCAGGAGAACUGCAGAAAGGAAAC GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUAACUUCUGUACCUGGCAAGCCAC UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAGAAGCAGCUGUUC GUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACGCAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC AUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUAAGUAC UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAUC GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA AAGGUCUAG	
<b>Sequência de aminoácidos dCas9 (D10A H840A)</b>	MDKKYSIGLAIGTNSVGVAVITDEYKVPSPKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL LFDSEGTAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLR ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS GVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGLNLIALLSLGTPNFKSN FDLAEDAKLQLSKDITYDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFPDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLNRDLLRQRTFDNG SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVYVPLARGN SRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK HSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKAIVDLLFKTNRKVTV KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEEN EDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS RKLINGIRDKQSGKTI LDPLKSDGFANRNFMLIHDLSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR ENQTTQKQKNSRERMKRIEIEGKELGSQLKEHPVENTQLQNEKLYLYL QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSDI DNKVLTRSDKNRGKS DNVPEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELKAGFIK RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSRLVSDFRKD FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKYPKLESEFVYGDYKIVYDVRK MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE IVWDKGRDFATVRKVLSPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR KKDWDPKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGSKLLKSVKELLGITIMERS FEKNPIDFLEAKGYKEVKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN ELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE FSKRVI LADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKY FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKPKR KV	208
<b>ORF de mRNA de dCas9 (D10A H840A)</b>	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGA UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCGAGCAAGAAGUUAAGGUC CUGGGAACACAGACAGACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAA	209

	<p> GAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC  GGAAACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUUCAC  CACCUGAGAAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG  AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCUGAUC  GAAGGAGACCUGAACC CGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCUACUCCAG  CUGGUCCAGACAUAACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC  GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA  CUGGAAAACCCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAACGGACUGUUC  GGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAGAGCAAC  UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGAC  GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG  UUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCAGCAGCUG  AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCCGUGAGCGCAAGCAUGAUCAG  AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA  CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC  GGAUACGCAGGAUACAUUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG  UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUUGGACGGAACAGAAACUGCUGGUC  AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGA  AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCAGCCAAUCCUGAGAAGA  CAGGAAGACUUCUACCCGUUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUUCGAAAAG  AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCUCUGGCAAGAGGAAAC  AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCUGG  AACUUCGAAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCUACGAA  AGAAUGACAACAUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCUUCGGAAG  CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAAACUGACAAGGUC  AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAG  AAGAAGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC  AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAGAAAGAUUCGAAUUCGACAGCGUC  GAAUUCAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGAAACAUACCAC  GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAAGAAAAC  GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAAGACAGA  GAAUUGAUCGAAAGAAAGACUGAAGACAUAACGACACCUGUUCGACGACAAG  GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC  AGAAAGCUGAUCACCGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAUCUCCUG  GACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCUAGCAGCUGAUC  CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGC  GGACAGGGAGACAGCCUGCAGCAACACAUCGCAAACUCCUGGACGGAAGCCG  GCAAUCAAGAAGGGAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC  AAGGUCUUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA  GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAG  AGAAUCGAAAGAAAGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC  CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUUGUACUACCUG  CAGAACGGAAGAGACAUUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCACAGAGCUG  AGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGAC  AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC  GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAAUCUACUGGAGA  CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCCUGACA  AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCUACAAG  AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGACAGAUCCUG  GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA  GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC  UUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC  GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAGAAAGUACCCGAAAG  CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAAG  AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAGGCAACAGCAAAGUACUUC  UUCUACGCAACAUCAGAAACUUCUUCAGACAGAAAUCACACUCCGCAAC  GGAGAAAUCAGAAAGAGACCCGUGAUCGAAAACAACGGAGAAAACAGGAGAA  AUCGUCUGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC  AUGCCGAGGUCAACUUCGUAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC  AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAAGAGAAAACAGCGACAGCUGAUCGCAAGA  AAGAAGGACUGGGACCCGAAAGAAUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC </p>	
--	---	--

	<p>GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAGGUCGAAAAGGGAAAAGAGCAAGAAG  CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAAGAGCAGC  UUCGAAAAGAACC CGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC  AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAAGUACAGCCUGUUCGAAACUGGAA  AACGGAAAGAAAGAAUGCUGGCAAGCCGAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC  GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCCAC  UACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC  GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA  UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCUGAGC  GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC  AUCCACCUGUUCACACUGACAAAACCUGGGAGCACCCGGCAGCAUUCAGUAC  UUCGACACAACAUCGACAGAAAAGAGAUACACAAGCACAAAAGGAAGCUG  GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUC  GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA  AAGGUCUAG</p>	
<p>Sequência de  codificação de  mRNA de Cas9  usando códons  mínimos de  uridina (sem  códons de início  ou de parada;  adequado para  inclusão na  sequência de  codificação de  proteínas de  fusão)</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCCGGAACAACAGCGUCGGAUGG  GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCUG  GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG  UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA  AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC  AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAA  AGCUUCUGGUCGAAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA  AACAUCCUGCAGCAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC  CUGAGAAAAGAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGAGCAUUC  UACCUGGCACUGGCACACAUGAUAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAA  GGAGACCUGAACCCCGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUCCAGCUG  GUCCAGACAUAACACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA  GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG  GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGACGGACUGUUCGGA  AACUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUAAGAGCAACUUC  GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC  GACCUGGACAACCUUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGACAGACCUGUUC  CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGA  GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCCGUGAGCGCAAGCAUGAUAAGAGA  UACGACGAACACCACAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG  CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAUUCUUCGACCAGAGCAAGAACCAGGAA  UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC  AUCAGCCGAUCCUGGAAAAGAUUGGACGGAAACAGAAGAACUGCUGGUCAG  CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAAGC  AUCCCGCACCCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAG  GAAGACUUCUACCCGUUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCAAGAAAGUUC  CUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCCGUGGCAAGAGGAAACAGC  AGAUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUAACACCCGUGGAAC  UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCCGACAGAGCUUCAUCGAAAGA  AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC  AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAAG  UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAG  AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAG  CAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGAAGAUCAAGUUCUUCGACAGCGUCCGAA  AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC  CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAA  GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA  AUGAUCGAAGAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC  AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA  AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC  UUCUGAAGAGCGACGGAAUUCGCAAACAGAAACUUAUGCAGCUGAUCCAC  GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCACGGGA  CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCGGCA  AUCAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAAG  GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA  AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAGAGA</p>	210

	<p>AUCGAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG  GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG  AACGGAAAGAGACAUUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC  GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC  AUCGACAACAAGGUCUGACAAAGAAGCGACAAGAACAGAGAAAAGAGCGAC  AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAGAAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG  CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAAG  GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA  CAGCUGGUCGAAAACAAGACAGAUCACAAAAGCAGCUGGCACAGAUCCUGGAC  AGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC  AAGGUCUACACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAAGGACUUC  CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCAGCAGCAGCGCA  UACCUGAACGACAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAGAAGUACCCGAAAGCUG  GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAAGU  AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC  UACAGCAAUCAUGAACUUCUACAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA  GAAAUCAGAAAGAGACCCGUGAUCGAAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAAAUC  GUCUGGACAAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCUGAGCAUG  CCGCAGGUAACAUCGUCAGAAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC  AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG  AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCGACAGUCGCA  UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAGCUG  AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC  GAAAAGAACCCGACUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGAAAGUCAAG  AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC  GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAACGAA  CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCACUUCUGUACCCUGGCAAGCCACUAC  GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCUGUUCGUC  GAACAGCACAAGCACUACCCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUC  AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCCUGGACAAAGGUCUUCAGCGCA  UACAACAAGCAAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAAGAAAGUACUUC  CACCUGUUCACACUGACAAAACCCUGGGAGCACCCGGCAGCAUUCAGUACUUC  GACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC  GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUCGAC  CUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAG  GUC</p>	
<p><b>Sequência de codificação de Cas9 nickase usando códons mínimos de uridina (sem códons de início ou de parada; adequado para inclusão na sequência de codificação de proteínas de fusão)</b></p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGG  GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAGGUCUCCUG  GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG  UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA  AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC  AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCACAGACUGGAAGAA  AGCUUCUGGUCGAAAGACAAAGAAGCACAAAGACACCCGAUCUUCGGA  AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC  CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC  UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAA  GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG  GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA  GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG  GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA  AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGACUGACACCGAACUUCAGAGCAACUUC  GACCUGGCAGAAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC  GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUC  CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGGAGA  GUCAACACAGAAAUCAAAAGGCACCCGUGAGCGCAAGCAUGAUCAGAGA  UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG  CAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGA  UACGCAGGAUACAUCGACGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAGUUCUACAAGUUC  AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGUAGGACGGAACAGAAGAUCGUGGUCUACG  CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC</p>	211

	<p>AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCAGCAGCAAUCCUGAGAAGACAG  GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAGAUCC  CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGCGACCGCUGGCAAGAGGAAAACAGC  AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAAGCGGAAGAAAACAAUCACACCCGUGGAAAC  UUCGAAAGAUUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCUUCGAAAAGA  AUGACAAAUCUGCACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC  AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAAGGUCAAG  UACGUCACAGAAGGAUGAGAAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAAG  AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAGACAACAGAAAAGGUCAACAGUCAAG  CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAGAAAGAUCCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA  AUCAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC  CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAA  GACAUCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA  AUGAUCCGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC  AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA  AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAUCUCCUGGAC  UUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAACAGAAAACUUCAGCAGGUGAUCGAA  GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCAGGAAGGCACAGGUCAGCGGA  CAGGGAGACAGCCUGCAGCAACACAUCGCAAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA  AUCAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCUAAAG  GUCUAGGGAAAGACACAAGCCGGAAAACUUCGUAUCGAAAUGGCAAGAGAA  AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAAGCAGCAGAGAAAAGAAUGAAGAGA  AUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG  GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG  AACGGAAAGACAUUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCACAGACUGAGC  GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC  AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC  AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG  CUGCUGAAGCGAAAAGCUGAUCACACAGAGAAAAGUUCGACAACCUGACA  GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCUACAAGAGA  CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC  AGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC  AAGGUCUACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAAGGACUUC  CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCA  UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAGAAGUACCCGAAAGCUG  GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAAGU  AUCGCAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC  UACAGCAAACAUCAUGAACUUCUUCAGACAGAAAUCACACUGGCAACCGGA  GAAAUCAGAAAAGAGCCGUGAUCGAAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAAAUC  GUCUGGACAAGGGAAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCUGAGCAUG  CCGCAGGUAACAUCGUAAGAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC  AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG  AAGGACUGGGACCCGAAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA  UACAGCGUCCUGGUCGUCGAAAGGUCGAAAAGGAAAGAGCAAGAAGCUG  AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAUCUUGGAAAAGAAAGCAGCUUC  GAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG  AAGGACCUGAUCUACAAGCUGCCGAAAGUACAGCCUGUUCGAAACUGGAAAAC  GGAAGAAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGAAAACGAA  CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUAACUUCUGUACCUGGCAAGCCACUAC  GAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC  GAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCUUGAACAGAUACAGGAAUUC  AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA  UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCUAC  CACCUGUUCACACUGACAACCCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCUAGUACUUC  GACACAACAUCGACAGAAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC  GCAACACUGAUCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUCGAC  CUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAG  GUC</p>	
<p>sequência de  codificação  dCas9 usando  códons  mínimos de</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAUCCGGAACAAACAGCGUCGGAU  GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAGGUCCUG  GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG</p>	<p>212</p>

<p><b>uridina (sem códon de partida ou parada; adequado para inclusão na sequência de codificação de proteínas de fusão)</b></p>	<p>UUCGACAGCGGAGAAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGAUACACAAGAAGAAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAA AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC CUGAGAAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAA GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUCCAGCUG GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG GAAAACUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGACGGACUGUUCGGA AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAGAGCAACUUC GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGACAGCCUGUUC CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGGAGA GUCAACACAGAAAUCAAAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAGAGA UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG CAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGA UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAGAAGACUGCUGGUAAG CUGAAGCAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAGC AUCCCGCACAGAUCCACCUGGGAGAACUGCAGCGCAAUCCUGAGAAGACAG GAAGACUUCUACCCGUUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUUCGAAAAGAU CUGACAUUCGAAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACG AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCCUGGAAAC UUCGAAAGAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAAGA AUGACAAAUUCGACAGAACCUGCCGAACGAAAAGUCCUGCCGAGACAC AGCCUGCUGUACGAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAGGUCUAG UACGUCACAGAAGGAUAGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAG AAGGCAUUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAACAGAAAGGUCACAGUCAAG CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAGAAAGAUUCGAAUGCUUCGACAGCGGAA AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA GACAUCCUGGAAGACAUUCGUCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA AAGCUGAUAACGGAUUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAUAUCCUGGAC UUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCUAGCAGCUGAUCCAC GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGCGGA CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA AUCAAGAAGGGAUUCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUAAG GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA AACAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAGAGA AUCGAAGAAGGAUUCAGGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACACCCG GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG AACGGAAGAGACAUUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC AACGUCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAAGUUCGACAACCUGACAAAAG GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCUACAAGAGA CAGCUGGUCGAAAACAAGACAGAUCAAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC AGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC AAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCA UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAGAAGUACCCGAAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAAGU AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC UACAGCAAACAUUGAACUUCUUCUACAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA GAAAUCAGAAAAGAGACCGCUGAUCGAAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAAAUC GUCUGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCUGAGCAUG</p>
--	--

	<p>CCGCAGGUCAACAUCGUCAGGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC  AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG  AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA  UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAAGAGCAAGAAGCUG  AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC  GAAAAGAACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGUAACAAGGAAGUCAAG  AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC  GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA  CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCACUCCUGUACCCUGGCAAGCCACUAC  GAAAAGCUGAAGGGGAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC  GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGGAAUUC  AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA  UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUAUC  CACCUGUUCACACUGACAAAACCUGGGAGCACCAGCAGCAUUAAGUACUUC  GACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC  GCAACACUGAUCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUCGAC  CUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAG  GUC</p>	
Sequência de aminoácidos de Cas9 (sem NLS)	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL  LFDSGETAEBATRLKRTARRRYTRRNRI CYLQEI PFSNEMAKVDDSPFHRLE  ESFLVEEDKKHERHP IFGNIVDEVAYHEKYPTI YHLRKKLVDSTDKADLRL  IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS  GVDAKAIL SARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLI ALSGLTPNFKSN  FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL  RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN  GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLNREDLLRKQRTFDNG  SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVGPLARGN  SRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDK GASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK  HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTY  KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIKDKDFLDNEEN  EDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS  RKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVS  GQGDLSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDLKVVMGRHKPENIVIEMAR  ENQTTQKGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL  QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSDNKVLT RSDKNRGS  DNVPSSEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS ELDKAGFIK  RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKD  FQFYKVIENNYHHHADAYLNAVVTALIKKYPKLESEFVYGDYKYVDVRK  MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE  IVWDKGRDFATVRKVLSPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR  KKDWDPKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGSKLLKSVKELLGITIMERSS  FEKNPIDFLEAKGYKEVKDLI IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN  ELALPSKYVNFYLLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE  FSKRVI LADANL DKVLSAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKY  FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD</p>	213
ORF de mRNA de Cas9 que codifica SEQ ID NO: 213 usando códons mínimos de uridina, com códons de início e parada	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCUGCGGA  UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCGAGCAAGAAGUUC AAGGUC  CUGGGAAACACAGACAGACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG  CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA  AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAUUC  UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAA  GAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC  GGAAACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCAC  CACCUGAGAAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAGGCAGACCUGAGACUG  AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCUGAUC  GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAG  CUGGUCCAGACAUAACACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC  GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA  CUGGAAAACCUGAUCGACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACCAGGACUGUUC  GGAAACCUGAUCGACUGAGCCUGGACUGACACCCGAACUUCAGAGCAAC</p>	214

	<p>UUCGACCUGGCAGAAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGAC  GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG  UUCUUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUG  AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCCGUGAGCGCAAGCAUGAUCAAG  AGAUACGACGAACACCACCAGGACCCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA  CAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC  GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG  UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAUCUGCUGGUC  AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGA  AGCAUCCCGCACCAGAUCACCUGGGAGAUCGACGCAAUCCUGAGAAGA  CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAG  AUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCUGGCAAGAGGAAAC  AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCUGGG  AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA  AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG  CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAGGUC  AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAAGCCGGCAUUCUGAGCCGGAGAACAG  AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAACAGAAAAGGUCACAGUC  AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGAAGAUCCGAAUGCUUCGACAGCGUC  GAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAACCAC  GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAGAAAAC  GAAGACAUCUGGAAGACAUCGUCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA  GAAUUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUCGCACACCUGUUCGACGACAAG  GUCUUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGAGCUGAGC  AGAAAGCUGAUCAACGGAUUCAGAGACAAGCAGAGCCGAAAAGACAUCUG  GACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAAUCUUAUGCAGCUGAUC  CACGACGACAGCCUGACAUCUUAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGC  GGACAGGGAGACAGCCUGCAGCAACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG  GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC  AAGGUCUAGGGAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUAUCGAAUUGGCAAGA  GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAG  AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACAC  CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG  CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCACAGACUG  AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCGCCGACAGCUCUCCUGAAGGACGAC  AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC  GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUAAGAAGAUAGAAGAACUACUGGAGA  CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAAGUUCGACAACCUGACA  AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCUUAAG  AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGACAGAUCCUG  GACAGCAGAAUGAACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA  GUCAAGGUCUACACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCGAAAGGAC  UUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCGCACAGCAGC  GCAUACCUGAACGCAUCGUCGGAACAGCACUGAUCAGAAGUACCCGAAG  CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG  AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAUUCGGAAGGCAACAGCAAAGUACUUC  UUCUACAGCAACAUCUAGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC  GGAGAAAUCAGAAAAGAGACCUGAUCGAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAA  AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCUGAGC  AUGCCCGCAGGUCACAUCGUCUAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC  AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA  AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC  GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAAGAGCAAGAAG  CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAUAUGGAAAGAAGCAGC  UUCGAAAAGAACCUGAUCGACUUCUGGAAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC  AAGAAGGACCUGAUCUACAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA  AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC  GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUAACUUCUGUACCUGGCAAGCCAC  UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGAAGACAACGAAACAGAAGCAGCUGUUC  GUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAA  UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC  GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC  AUCCACCUGUUCACACUGACAACACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAGUAC  UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG  GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUC  GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACUAG</p>	
--	--	--

<p>Sequência de codificação Cas9 que codifica SEQ ID NO: 213 usando códons mínimos de uridina (sem códons de início ou parada; adequado para inclusão na sequência de codificação de proteínas de fusão)</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCCGGAAACAACAGCGUCGGAUGG  GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCCGAGCAAGAAGUUCAGGUCCUG  GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUCUG  UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA  AGAAGAUACACAAGAAGAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUUCUUC  AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAA  AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA  AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCAGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC  CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC  UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAA  GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUUUCUACCAGCUG  GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA  GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG  GAAAACUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGACGGACUGUUCGGA  AACCGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAAUCUUAAGAGCAACUUC  GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC  GACCUGGACAACCUGUGGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGACGACCUUUC  CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGGAGA  GUCAACACAGAAAUCACAAGGCACCCGUGAGCGCAAGCAUGAUCAGAGAGA  UACGACGAACACCACAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG  CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACCGGA  UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC  AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAAGAACUGCUGGUCAG  CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAAGC  AUCCCGCACCAGAUCACCUGGGAGAACUGCAGCCAAUCCUGAGAAAGACAG  GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUUCGAAAAGAU  CUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCCUGGCAAGAGGAAAACAGC  AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAACAACACACCUGGGAAC  UUCGAAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAAGA  AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC  AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAG  UACGUCACAGAAGGAUAGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAG  AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAGACAACAGAAAGGUCACAGUCAAG  CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA  AUCAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAACAGCAG  CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAA  GACAUCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA  AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC  AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA  AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC  UUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAACAGAAAACUUCUAGCAGCUGAUCCAC  GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGCGGA  CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA  AUCAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAG  GUCAUGGGAAGACACAAGCCGAAAACAUCGUCUACGAAAUGGCAAGAGAA  AACAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA  AUCGAAGAAGGAAUCAAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG  GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUUACUACCUUCGAG  AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC  GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC  AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAAGAGCGAC  AACGUCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG  CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAAGUUCGACAACCUGACAAG  GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCUACAAGAGA  CAGCUGGUCGAAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC</p>	215
--	---	-----

	<p>AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC  AAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAAGGACUUC  CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCA  UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUAAGAAGUACCCGAAGCUG  GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAAGU  AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC  UACAGCAACAUCUAGAUCUUCUACAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA  GAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAAAUC  GUCUGGACAAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCUGAGCAUG  CCGCAGGUAACAUCGUAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC  AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG  AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCAGACUGCGCA  UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAAGAGCAAGAAGCUG  AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAAGAAGCAGCUUC  GAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG  AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC  GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA  CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACUCCUGGCAAGCCACUAC  GAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC  GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUC  AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA  UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAAACAGGCAGAAAACAUCAUC  CACCUGUUCACACUGACAAAACCCUGGGAGCACCCGGCAGCAUUAAGUACUUC  GACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC  GCAACACUGAUCACCACAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUCCGAC  CUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC</p>	
<p><b>Sequência de aminoácidos da Cas9 nickase (sem NLS)</b></p>	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL  LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL  ESFLVEEDKKHERHPIFGNIIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL  IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS  GVDAKAII SARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLGLTPNFKSN  FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL  RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN  GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRKQRTFDNG  SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVVGPLARGN  SRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGSASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK  HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV  KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEEN  EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS  RKLINGIRDKQSGKTLDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVS  GGGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR  ENQTTQKGQKNSRERMRKIEBEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL  QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSDNKVLTNRSDKNRGS  DNVPSSEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK  RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKD  PQFYKVIINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKYPKLESEFVYGDYKVIDVRK  MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE  IVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIIVKKEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIAR  KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGSKKLKSVKELLGITIMERS  FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN  ELALPSKYVNFYLLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE  FSKRVI LADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKY  FDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD</p>	216
<p><b>ORF de mRNA de Cas 9 nickase que codifica SEQ ID NO: 216 usando códons</b></p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGA  UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCGAGCAAGAAGUUCAGGUC  CUGGGAAACACAGACAGACAGCAUCAAGAAGAACUGAUCGGAGCACUG  CUGUUCGACAGCGGAGAAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA  AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC</p>	217

<p>mínimos de uridina, conforme listado na Tabela 3, com códons de início e parada</p>	<p>UUCAGCAACGAAAUGGCCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAA  GAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC  GGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC  CACCUGAGAAAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG  AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUCCUGAUC  GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUCCAG  CUGGUCCAGACAUAACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC  GGAGUCGACGCAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA  CUGGAAAACCUGAUCGACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC  GGAAACCUGAUCGACAGCCUGGGACUGACACCCGAACUUCAGAGCAAC  UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGAC  GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACAGUACGACAGACCUG  UUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUG  AGAGUCAACACAGAAAUCACAAGGCACCCGUGAGCGCAAGCAUGAUCUACG  AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA  CAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC  GGAUACGACGGAUACUUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAUAUUCUACGAG  UUCUACGAAAGCUGUCCUGGAAAAGAUUGGACGGAACAGAAAGAACUCCAG  AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGA  AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA  CAGGAAGACUUCUACCCGUCUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAG  AUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCCGUGGCAAGAGGAAAAC  AGCAGAUUCGCAUGGAGUACAAGAAAGAGCGAAGAAAACAUAUCACACCUGG  AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA  AGAAUGACAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG  CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAGGUC  AAGUACGUCACAGAAAGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAG  AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAAACAGAAAGGUCACAGUC  AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCUACAAGAAGAUCCGAAUCCUGCAGCGUC  GAAAUCAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAACCAC  GACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAAGAAAAC  GAAGACAUCUGGAAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAAGACAGA  GAAUUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGACACCCUGUUCGACGACAAG  GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC  AGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAUAUCCUG  GACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAACAGAAACUUCUAGCAGCUGAUC  CACGACGACAGCCUGACAUAUCAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGC  GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACAACAUCGCAACCCUGGCAGGAAGCCCG  GCAUUCAAAGAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGGAACUGGUC  AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUAUCGAAAUGGCAAGA  GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAGAAAGGAGC  AGAAUCGAAGAAGGAUACAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC  CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG  CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAACAGACUG  AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCGCCGACAGCUCUCCUGAAGGACGAC  AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC  GACAACGUCGCCGAGCGAAGAAGUCGUAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA  CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAAGUUCGACAACCUGACA  AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUAUCAAG  AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGACAGAUCCUG  GACAGCAGAAUGAACCAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA  GUCAAGGUAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC  UUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUAACAACUACCACCACGACACACGAC  GCAUACCUGAACGCAAGCUGCUGGAAACAGCACUGAUAAGAAGUACCCGAAG  CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG  AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAUCCGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC  UUCUACAGCAACAUCAUAGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAC  GGAGAAAUCAGAAAGAGACCUGAUCGAAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAA  AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCAGC  AUGCCGACAGGUAACAUCGUAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC  AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA</p>
--	---

	<p>AAGAAGGACUGGGACUCCGAAGAAGUACGGAGGAAUUCGACAGCCGACAGUC  GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAGGUCGAAAAGGGAAAAGGCAAGAAG  CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGUCUGGGAAUACAAUCAUGGAAAAGAAGCAGC  UUCGAAAAGAACCUGAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGAAUACAAGGAAGUC  AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAAACUGGAA  AACGGAAAGAAAGAGAAUGCUGGCCAAGCGCAGGAGAAACUGCAGAAGGGAAAC  GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUUGGCAAGCCAC  UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC  GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA  UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC  GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC  AUCCACCUGUUCACACUGACAACCCUGGGAGCACCGGCAGCAUUAAGUAC  UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG  GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUC  GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACUAG</p>	
<p><b>Sequência de codificação de Cas9 nickase que codifica SEQ ID NO: 216 usando códons mínimos de uridina, conforme listado na Tabela 3 (sem códons de início ou parada; adequado para inclusão na codificação de proteínas de fusão</b></p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCCGGAACAAAACAGCGUCGGAUGG  GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAGGUCCUG  GGAAACACAGACAGACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG  UUCGACAGCGGAGAAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA  AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC  AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAA  AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAAUCUUCGGA  AACAUCCUGGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC  CUGAGAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC  UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAA  GGAGACCUGAACCCTGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCUACUCCAGCUG  GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA  GUCGACGCAAAGGCCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG  GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGACGGACUGUUCGGA  AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACCCGAAUCUUAAGAGCAACUUC  GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC  GACCUGGACAACCUGCGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCUGUUC  CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGA  GUCAACACAGAAAUCAAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUAAGAGA  UACGACGAACACCACAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG  CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUUCUUCUCCGACAGAGCAAGAACGGA  UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC  AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAACAGAAAGCUGCUGGUCUAG  CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAAACGGAAGC  AUCCCGCACCCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCAGCCAAUCCUGAGAAGACAG  GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCAAGAAAGUUC  CUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC  AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAACACACCCUGGAAAC  UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA  AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC  AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAAACUGACAAAGGUCAAG  UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUCCUGAGCGGAGAACAGAAAG  AAGGCAUUCGUCGACCUGCUGUUCAAAGACAACAGAAAGGUCCAGUUCGAA  CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAGAAAGAUCAAGUUCGACAGCUGCUGGAA  AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC  CUGCUGAAGAUCAUAAAGGACAAGGACUUCUCCUGGACAACGAAAGAAAACGAA  GACAUCCUGGAAGACAUCCUGGACACUGACACUGUUCGAAAGACAGAGAA  AUGAUCAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC  AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA  AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAAGACAACUCCUGGAC  UUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCUAGCAGCUGAUCCAC  GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGCGGA  CAGGGAGACAGCCUGCAGCAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA  AUCAAAGAAAGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCUGGACGAACUGGUCAGAG  GUCAUGGGAAGACACAAGCCGAAAACAUCGUAUCGAAUUGGCAAGAGAA  AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA</p>	218

	<p>AUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAAACCCCG  GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG  AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC  GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC  AUCGACAACAAGGUCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC  AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG  CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAG  GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCUCAAGAGA  CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAAAAGCAGCUCGACAGAUCCUGGAC  AGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC  AAGGUCACACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAAGACUUC  CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGACACAGCACA  UACCUGAACGACAGUCGUCGGAACAGCAGAUCAAGAAGUACCCGAAAGCUG  GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAAGU  AUCGCAAGAGCGAACAGGAAAUCGAAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC  UACAGCAACAUGAUAUCUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA  GAAAUCAGAAAAGAGACCGCUGAUCGAAAACAACGGAGAAAACAGGAGAAA  GUCUGGGAACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCUUCAG  CCGCAGGUAACAUCGUCAGAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC  AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAGCUGAUCGCAAGAAAAG  AAGGACUGGGACCCGAAAGAUACGGAGGAUUCGACAGCCGACAGUCGCA  UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGAAAGAGCAAGAAGCUG  AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAUCACAUAUCGAAAAGAAGCAGCUUC  GAAAAGAACCCGACUUCGACUUCUGGAAAGCAAAGGUAACAAGGAAGUCAAG  AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC  GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAACAGAA  CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCACUUCUGUACUCCUGGCAAGCCACUAC  GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAACGACGUCUUCGUC  GAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACGCGAAUUC  AGCAAGAGAGUCAUCCUGGACAGCGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA  UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUAUC  CACCUGUUCACACUGACAAACCUGGAGCACCAGCAGAUUCAAGUACUUC  GACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAGGAAGUCCUGGAC  GCAACACUGAUCCACCAGAUCAACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUCGAC  CUGAGCCAGCUGGGAGAGAC</p>	
<p><b>Sequência de aminoácidos de dCas9 (sem NLS)</b></p>	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL  LFDSETAEATRLKRTARRRYTRRNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSPFHRLE  ESFLVEEDKKHERHP I FGNIVDEVA YHEKYPTI YHLRKKLVDSTDKADLR  IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS  GVDKAIL SARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLI ALSGLTPNFKSN  FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDIL  RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN  GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRQKRTFDNG  SIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDNREKIEKILTFRIPIYVGPLARGN  SRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDK GASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK  HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV  KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEEN  EDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS  RKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVS  QQGDSLHEHIANLAGSPA I KKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIEMAR  ENQTTQKGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL  QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGKS  DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELKAGFIK  RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKD  FQFYKVIENNYHHADAYLNAVVTALIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRK  MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE  IVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR  KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGSKKLKSVKELLGITIMERSS  FEKNPIDFLEAKGYKEVKDLI IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN  ELALPSKYVNFYLA SHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE  FSKRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFYK  FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD</p>	<p>219</p>

<p><b>ORF de mRNA de dCas9 que codifica SEQ ID NO: 219 usando códons mínimos de uridina, conforme listado na Tabela 3, com códons de início e parada</b></p>	<pre> AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGA UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUC AAGGUC CUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCU GAUCGGAGCACUG CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAAACAGCA AGAAGAAGAUACACAAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUUCUCCACAGACUGGAA GAAAGCUUCCUGGUCGAAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC GGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC CACCUAGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUUGAUC GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAG CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACAGCAAGC GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA CUGGAAAACCU GAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGACGGACUGUUC GGAAACCU GAUCGCACUGAGCCUGGACUGACACCGAACUUC AAGAGCAAC UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGAC GACGACCUGGACAACCUGCGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCUG UUCUUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUUCUGCUGAGCGACAUCUUG AGAGUCAACACAGAAAUCACAAGGCACCCGUGAGCGCAAAGCAUGAUCAAG AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAAAGGGA AGCAUCCCGCACAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA CAGGAAGACUUCUACCCGUUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUUCGAAAAG AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCCGUGG AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGUCCUGCCGGAAG CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACACGAAUCGACAAAGGUC AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAG AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUC AAGACAAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUC AAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUC GAAUUCAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUUGGACAACGAAAGAAAAC GAAGACAUCUUGGAAAGACAUCGUCUUGACACUGACACUGUUCGAAAGACAGA GAAUUGAUCGAAAGAAAGACUGAAGACAUCGCACACCUGUUCGACGACAAG GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC AGAAAGCUGAUC AACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACA AUCCUG GACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC AUUGCAGCUGAUC CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUC CAGAAGGCACAGGUCAGC GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAACAUCGCAAACCUUGGCAGGAAGCCCG GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA GAAAACAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG AGAAUCGAAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG AGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCGCCGACAGCUCUCCUGAAGGACGAC AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC GACAAAGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAU GAAGAACUACUGGAGA CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG AGACAGCUGGUCGAAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUG GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC UUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACAGC </pre>	220
--	---	-----

	<p>GCAUACCGAACCGCAGUCGUCGGAAACAGCACUGAUCAGAAGUACCCGAAG  CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG  AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC  UUCUACAGCAACAUCUAGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAAC  GGAGAAAUCAGAAAAGAGACCGCUGAUCGAAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAA  AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCUGAGC  AUGCCGCAGGUCACAUCGUCUACAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC  AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA  AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC  GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAGGUCGAAAAGGGAAAAGAGCAAGAAG  CUGAAGAGCGUCUACAAGGAACUGCUGGGAAUCACAUCUUGGAAAAGAGCAGC  UUCGAAAAGAACCCTGACUUCUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC  AAGAAGGACCUGAUCUACAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA  AACGGAAGAAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUCGAGAAGGGAAC  GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACUCCUGGCAAGCCAC  UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCUGUUC  GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCUUGAAGCAAGUACAGCGAA  UUCAGCAAGAGAGUCUUCUCCUGGCAGACGCAAACUCCUGGACAAGUCCUGAGC  GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC  AUCCACUGUUCACACUGACAACCCUGGGAGCACCCGGCAGCAUUCAGUAC  UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG  GACGCAACACUGAUCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUC  GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACUAG</p>	
<p><b>sequência de codificação dCas9 que codifica SEQ ID NO: 219 usando códons mínimos de uridina, conforme listado na Tabela 3 (sem códons de início ou parada; adequado para inclusão na sequência de codificação de proteínas de fusão)</b></p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCCGGACUGGCAUCCGGAACAAACAGCGUCGGAUGG  GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCUG  GGAAACACAGACAGACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG  UUCGACAGCGGAGAAAACAGCAGAAGCAAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAAGA  AGAAGAUACACAAGAAGAAAAGAACAGAAUCUGCUACCCUGCAGGAAUUCUUC  AGCAACGAAAUGGCCAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAAGAA  AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA  AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAUCUACCAC  CUGAGAAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC  UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAA  GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUCCAGCUG  GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCCGGA  GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG  GAAAACUUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA  AACCGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCUCAAAGGCAACUUC  GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUCAGCAGC  GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGACAGACCUGUUC  CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUCCUGAGA  GUCAACACAGAAAUCACAAGGCACCCGUGAGCGCAAGCAUGAUCAGAGAGA  UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUUGGUCAGACAG  CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUCCGACCAGAGCAAGAACCAGGA  UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCACAAGUUC  AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAGAAGAACUGCUGGUCAAG  CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAAGC  AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCAGCCAAUCCUGAGAAAGACAG  GAAGACUUCUACCCGUUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUUCGAAAAGAUUC  CUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCCGUGGCAAGAGGAAACAGC  AGAUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCCUGGAAAC  UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAAGA  AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAAGCAC  AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAGGUCUAAAG  UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUUGAGCGGAGAACAGAAAG  AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAAACAGAAAGGUCACAGUCAAG  CAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGAAGAUUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA  AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC  CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA  GACAUCUGGAAGACAUUCGUCUCCUGACACUGACACUGUUCGAAAGACAGAGAA  AUGAUCGAAGAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC</p>	221

	<p>AUGAAGCAGCUGAAGACAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA  AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC  UUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCUAGCAGCUGAUCCAC  GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGCGGA  CAGGGAGACAGCCUGCAGCAACACAUCGCAAACUCCUGGACGAAAGCCCGCA  AUCAAAGAAGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAG  GUCAUGGGAAAGACACAAGCCGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA  AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA  AUCGAGAAGGAAUCAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG  GUCGAAAACACACAGCUGCAGAAGCAAAGCUGUACCUUGUACUACCUGCAG  AACGGAAAGACAUUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC  GACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCUGAAGAGCCAGCAGC  AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC  AACGUCCCGAGCGAAGAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG  CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUAGCAAAG  GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUAUCAAGAGA  CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAAAAGCAGCUGCGCACAGAUCCUGGAC  AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAAGUC  AAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAAGGACUUC  CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGACACGACGCA  UACCUGAACCGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUAAGAAGUACCCGAAAGCUG  GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAAGUAG  AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAUCCGAAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC  UACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGGA  GAAAUCAGAAAAGACCCGCGUGAUCGAAACAACAGGAAACAGGAGAAAUC  GUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCUGAGCAUG  CCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC  AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG  AAGGACUGGGACCCGAAAGAUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA  UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAGCUG  AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAUACAAUCAUGGAAAGAAAGCAGCUUC  GAAAAGAACCAGUACGACUUCUGGAAAGCAAAGGGAUACAAGGAAAGUCAA  AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAAACUGGAAAAC  GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAACGAA  CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUUGGCAAGCCACUAC  GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAACGAGCUGUUCGUC  GAACAGCACAAGCACUACCUUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACGCGAAUUC  AGCAAGAGAGUACUCCUGGACAGCGCAAACCUUGGACAGGUCUAGCGCA  UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCUAC  CACCUGUUCACACUGACAAAACCUUGGAGCACCGGCAGCAUUAAGUACUUC  GACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC  GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUCGAC  CUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC</p>	
<p>Sequência de aminoácidos de Cas9 com dois sinais de localização nuclear (2xNLS) como aminoácidos C-terminais</p>	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGNVAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL  LFDSETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEI FSNEMAKVDDSFHRL  ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL  IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS  GVDKAIL SARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLGLTPNFKSN  FDLAEADAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAANKLSDAILSDIL  RVNTEITKAPLSAMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN  GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRQRTFDNG  SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVVGPLARGN  SRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGAQAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK  HSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV  KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRPNASLGTYHDLKI IKDKDFLDNEEN  EDILEDIVLTLTFEDREMIERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS  RKLINGIRDKQSGKTIIDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVS  GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILOTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR  ENQTTQKQKNSRERMKRIEIGIKELGSQLKEHPVENTQLQNEKLYLYL  QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGS  DNVPEEVVKKMKNYRQLLNAKLIQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK</p>	222

	<p>RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTRYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKD  FQFYKVBREINNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK  MIAKSEQEIGKATARYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE  IVWDKGRDFATVRKVLSPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR  KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGSKRLKSVKELLGITIMERS  FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN  ELALPSKYVNFYLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISE  FSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKY  FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGS GSPKKKR  KVDGSPKKKRKVDG</p>	
<p>ORF de mRNA  de Cas9 que  codifica SEQ ID  NO: 222 usando  códonos mínimos  de uridina, com  códonos de início  e parada</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCCGGAACAAACAGCGUCGGA  UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUC  CUGGGAACACAGACACAGCAUCAAGAAGAACUGAUCGGAGCACUG  CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAGACUGAAGAGAACAGCA  AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAUUC  UUCAGCAACGAAUUGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAA  GAAAGCUUCGUGGUCGAAAGAAGCAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC  GGAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCAGAAAAGUACCCGACAAUCUAC  CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG  AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUC  GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUCCAG  CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC  GGAGUCGACGCAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA  CUGGAAAACCGUAUCGACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC  GGAACCCUGAUCGCACUGAGCCUGGACUGACACCGAACUUCAGAGCAAC  UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGAC  GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGACAGCCUG  UUCUGGCAGCAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUG  AGAGUCAACACAGAAAUCACAAGGCACCCGUGAGCGCAAGCAUGAUAAG  AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA  CAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC  GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG  UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC  AAGCUGAAGCAGAGAAGACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAACCGGA  AGCAUCCCGCACAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA  CAGGAAGACUUCUACCCGUUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAG  AUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCCUGGCAAGAGGAAAC  AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAAGAGCGAAGAAAACAUCACACCGUGG  AACUUCGAAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA  AGAAUGACAACAUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCUGCCGAAAG  CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAAGGUC  AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAG  AAGAAGGCAAUUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAAACAGAAAAGGUCACAGUC  AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAAGAAGAUCCGAAUGCUUCGACAGCGUC  GAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC  GACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAAGAAAAC  GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCUGACACUGACACUGUUCGAAAGACAGA  GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGCACACCUGUUCGACGACAAG  GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC  AGAAAGCUGAUAACCGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG  GACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAACAGAAACUUCUUCGACGUGAUC  CACGACGACAGCCUGACAUAUCAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGC  GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAAACUGGCAGGAAGCCCG  GCAAUCAAGAAGGGAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC  AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA  GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAAGCAGAGAAAAGAAUGAAG  AGAAUCGAAGAAGGAUACAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC  CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUUACUACCCUG  CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCACAGACUG</p>	223

	<p>AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUCCUGAAGGACGAC  AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC  GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA  CAGCUGCUGAACCGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA  AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCUACAAG  AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGACGACAGAUCCUG  GACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA  GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC  UUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC  GCAUACCUGAACCGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAGAAGUACCCGGAAG  CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG  AUGAUCGCAAGAGCGAACAGGAAUUCGGAAGGCAACAGCAAAGUACUUC  UUCUACAGCAACAUCUAGAACUUCUACAAGACAGAAUCACACUGGCAAAC  GGAGAAUUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAAACAACGGAGAAACAGGAGAA  AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC  AUGCCCGCAGGUCAACUUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC  AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA  AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC  GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGAAAGCAAGAGGAAAG  CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAUCUUGGAAAGAAGCAGC  UUCGAAAAGAACCUGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC  AAGAAGGACCGUGAUCUACAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA  AACGGAAAGAAAGAAUUCGUGGCAAGCGCAGGAGAACUCGAGAAGGGAAAC  GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCUACUUCUGUACUCCUGGCAAGCCAC  UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC  GUCGAAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAACAGAUACAGCGAA  UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC  GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUUC  AUCCACCUGUUCACACUGACAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAGUAC  UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG  GACGCAACACUGAUCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUC  GACCUAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA  AAGGUCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUC  GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAG  AAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG</p>	
<p>Sequência de  codificação  Cas9 que  codifica SEQ ID  NO: 222 usando  códons mínimos  de uridina (sem  códons de  partida ou  parada;  adequado para  inclusão na  sequência de  codificação de  proteínas de  fusão)</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACUUCGGAACAACAGCGUCGGAUGG  GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCUG  GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG  UUCGACAGCGGAGAAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA  AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC  AGCAACGAAAUGGCAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAA  AGCUUCUGGUCGAAAGAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA  AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC  CUGAGAAAAGAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUAGAGACUGAUC  UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAA  GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUCCAGCUG  GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA  GUCGACGCAAAGGCAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUG  GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA  AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUAAGAGCAACUUC  GACCUGGCAGAAGACGCAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGACGAC  GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGACAGCUGUUC  CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAUCCUGCUGAGCGACAUCUCCUGAGA  GUCAACACAGAAUACAAGAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAGAGA  UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUUCUGAAGGCACUGGUCAGACAG  CAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUCCGACCAGCAAGAAGCGGA  UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC  AUCAGCCGAUCCUGGAAAAGUAGGACGGAACAGAAGAACUUCGUGUCAG  CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAAGC</p>	<p>224</p>

	<p> AUCUCCGACCCAGAUCCACUCCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAG  GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAGAUCC  CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCCGUGGCAAGAGGAAAACAGC  AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAAACAUCACACCCUGGGAAC  UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAAGA  AUGACAAACUUCGACAAGAACCCUGCCGAAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC  AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAAGGUCAAG  UACGUCACAGAAGGAUAGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAG  AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAAACAGAAAGGUCCACAGUCAAG  CAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGAAGAUCCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA  AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACUACACAGGAC  CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAAAGAAAAGGAAACGAA  GACAUCUGGAAGACAUCGUCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA  AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC  AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA  AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAAGACAAUCCUGGAC  UUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAACAGAAAACUUCGAGCUGAUCCAC  GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCAGAAAGGACAGGUCAGCGGA  CAGGGAGACAGCCUGCACGAAACACAUCGCAAAACCUGGCAGGAAGCCCGGA  AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAG  GUCAUGGGAAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCUACGAAAUGGCAAGAGAA  AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAGAGA  AUCGAAGAAGGAUUCAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG  GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACUGUACUACCCUGCAG  AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC  GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCUGAAGGACGACAGC  AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAAGAGCGAC  AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG  CUGCUGAACGCAAAAGCUGAUACACAGAGAAAAGUUCGACAACCUGACAAAAG  GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA  CAGCUGGUCGAAAACAAGACAGAUACACAAGCAGCUGCCACAGAUCCUGGAC  AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUACAGAGAAGUC  AAGGUCUACACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAAGGACUUC  CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGACACGACGCA  UACCUGAACCGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAAGCUG  GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAAGAU  AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC  UACAGCAAACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAACGGA  GAAAUCAGAAAGAGACCCGUGAUCGAAAACAACGGAGAAAACAGGAGAAAUC  GUCUGGGACAAGGGAAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCUGAGCAUG  CCGCAGGUAACAUCGUAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC  AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG  AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA  UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAAGAGCAAGAAGCUG  AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC  GAAAAGAACCAGAUCCGACUUCUGGAAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG  AAGGACCUGAUCAUACAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAAACUGGAAAAC  GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA  CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUAACUUCUGUACCCUGGCAAGCCACUAC  GAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCUGUUCGUC  GAACAGCACAGCACUACCCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUC  AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAAACCUGGACAAAGGUCCUGAGCGCA  UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAAACAGGCAGAAAACAUCUUC  CACCUGUUCACACUGACAAAACCUGGGAGCACCCGGCAGCAUUCAGUACUUC  GACACAACAUCGACAGAAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC  GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUCGAC  CUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAG  GUCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUC  GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAG  AAGAGAAAGGUCGACAGCGGA </p>	
--	--	--

<p><b>Sequência de aminoácidos de Cas9 nickase com dois sinais de localização nuclear como aminoácidos C-terminais</b></p>	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL  LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLE  ESFLVEEDKKHERHPIFGNI VDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL  IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS  GVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSN  FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDIL  RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN  GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRQRTFDNG  SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPIYVYVGLARGN  SRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGSASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK  HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV  KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEEN  EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS  RKLINGIRDKQSGKTLDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVS  GGGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILOTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR  ENQTTQKQKNSRERMKRIEIEGIEKLSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL  QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSDI DNKVLTRSDKNRGKS  DNVPSSEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELDKAGFIK  RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKD  FQFYKVBREINNYHHAHDAYLNAVVGTAALIKKYPKLESEFVYGDYKVVYDVRK  MIAKSEQIEGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE  IVWDKGRDFATVRKVLSPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR  KKDWDPKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGSKKLKSKVELLGITIMERSS  FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN  ELALPSKYVNFYLLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE  FSKRVILADANLDKVL SAYNKHRRDKPIREQAENI IHLFTLNLGAPAAFKY  FDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGS GSPKPKR  KVDGSPKPKR KVDG</p>	225
<p><b>ORF de mRNA de Cas 9 nickase que codifica SEQ ID NO: 25 usando códons mínimos de uridina, conforme listado na Tabela 3, com códons de início e parada</b></p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGA  UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUC  CUGGGAACACAGACAGACAGCAUCAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG  CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA  AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAUUC  UUCAGCAACGAAUUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAA  GAAAGCUUCUGGUCGAAAGACAAGAACAGCAGAAAGACACCCGAUCUUC  GGAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAUCUAC  CACCGAGAAAAGAACGUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACUGAGACUG  AUCUACCUGGCACUGGCACACAUAGUACAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUC  GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCUACCCAG  CUGGUCCAGACAUAACACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC  GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAAGACUGAGCAAAGAGCAGAAGA  CUGGAAAACCGUAUCGACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAACGGACUGUUC  GGAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCCGAACUUAAGAGCAAC  UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGAC  GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCUG  UUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUG  AGAGUCAACACAGAAUACACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUAAG  AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA  CAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC  GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG  UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUUGGACGGAACAGAAAGAACUGCUGGUC  AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGA  AGCAUCCCGCACCAGAUAACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA  CAGGAAGACUUCUACCCGUUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUUGAAAAG  AUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC  AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCCUGG  AACUUCGAAAGAAGUCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA  AGAAUGACAACAUCUGGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCUGCCGAAG  CACAGCCUGCUGUACGAAUACUACAGUCUACAACGAAACUGACAAGGUC</p>	226

	<p>AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUCCUGAGCGGAGAACAG  AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCACAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC  AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUC  GAAUUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC  GACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUCCUGGACACAGAAAGAAAC  GAAGACAUCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA  GAAUUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUCGACACACCUGUUCGACGACAAG  GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC  AGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG  GACUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCUAGCAGCUGAUC  CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGC  GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAAGGCCCG  GCAAUCAAGAAGGGAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC  AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA  GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG  AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC  CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG  CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG  AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUCCUGAAGGACGAC  AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC  GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAUCUACUGGAGA  CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA  AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG  AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCAGCUGCAGAGAUCCUG  GACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA  GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC  UUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC  GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAGAAAGUACCCGAAG  CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG  AUGAUCGCAAAGAGCGAAACAGGAAAUCGGAAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC  UUCUACAGCAACAUCAGAACUUCUUCUACAAGACAGAAAUCACACUGGCAAC  GGAGAAAUCAGAAAGAGACCCGUCGUAUCGAAAACAAACGGAGAAACAGGAGAA  AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC  AUGCCGCAGGUCAACUUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC  AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA  AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC  GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG  CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAUUCACAAUUAUGGAAAGCAAGCAGC  UUCGAAAAGAACCCTGAUCGACUUCUGGAAAGCAAAGGGAUACAAGAAAGUC  AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA  AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC  GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCCAC  UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCUGUUC  GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAA  UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAACCUGGACAAAGGUCCUGAGC  GCAUACACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC  AUCCACCUGUUCACACUGACAAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAGUAC  UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG  GACGCAACACUGAUCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUC  GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAAGCCCGAAGAAAGAGAGA  AAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG</p>	
<p><b>Sequência de codificação de Cas9 nickase que codifica SEQ ID NO: 25 usando códons mínimos de uridina (sem</b></p>	<p>SACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAUCCGGAAACAAACAGCGUCGGAUUG  SCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAGGUCUCUG  SGAAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG  UUCGACAGCGGAGAAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA  AGAAGAUACACAGAAGAAAGACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC  AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAA  AGCUUCUGGUCGAAAGAAGACAAGAAGCACGAAAAGACACCCGAAUCUUCGGA  AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCAGACAUCUACCC  CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC  UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAA</p>	<p>227</p>

<p><b>códons de início ou de parada; adequados para inclusão na sequência de codificação de proteínas de fusão)</b></p>	<p>GGAGACCGAACCCTGGACAAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG  GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA  GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG  GAAAACCGUAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA  AACCGUAUCGCACUGACCGGACUGACACCGAACUUCAGAGCAACUUC  GACCGGACAGAAAGCACAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC  GACCGGACAAACCGCUGGACACAGAUCCGGAGACCAGUACGACAGCUGUUC  CUGGACGCAAGAACCUGAGCGACGCAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGA  GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGA  UACGACGAACACCACCAGGACCGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG  CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCGAGCAAGAAGCGGA  UACGACGGAUACUACGCGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC  AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUAGGACGGAACAGAAAGAACUGCUGGUAAG  CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAAGC  AUCCCGCACAGAUCCACCGGGAGAACUGCAGCGCAUCCUGAGAAGACAG  GAAGACUUCUACCGUUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAGAU  CUGACAUCAGAAUCCGUAUCUACGUCGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC  AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAAGAGCGAAGAAAACAUCACACCGUGGAAC  UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAAGA  AUGACAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC  AGCCUGCUGUACGAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAAGGUCAG  UACGUCACAGAAGGAUGAGAAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAG  AAGGCAAUCGUCGACCGCUGCUGUUCAGACAACAGAAAGGUCACAGUCAAG  CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAGAAAGAUCCGAAUUCGUCGACGACGCGAA  AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAACACGAC  CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAA  GACAUCUGGAAGACAUCCUGCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA  AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC  AUGAAGCAGCUGAAGAGAAAGAUACACAGGAUUGGGGAAGACUGAGCAGA  AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAUCUCCUGGAC  UUCGUAAGAGCGACGGAUUCGCAACACAGAAACUUCUACGACGUAUCAC  GACGACAGCCUGACAUCGAAGGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGA  CAGGGAGACAGCCUGCAGCAACACAUCGCAAAACCGGACGGAAGCCCGGCA  AUCAAGAAAGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAG  GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUAUCGAAAUGGCAAGAGAA  AACAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAGAAUGAAGAGAA  AUCGAAGAAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUUCUGAAGGAACACCCG  GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCGUACUACCGCAG  AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC  GACUACGACGUCGACCAUCGUCGCCAGAGCUUCUGAAGGACGACAGC  AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC  AACGUCGCCGAGCGAAGAGUCGUAAGAAGAUAGAAGACUACUGGAGACAG  CUGCUGAACGCAAGCUGAUACACACAGAGAAAGUUCGACAACCGUACAAG  GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA  CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC  AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUACAGAGAAGUC  AAGGUCAUACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAAGGACUUC  CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACACCACGACACGACGCGCA  UACCGAAGCGCAGUCGCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAAGCUG  GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAAGAU  AUCGCAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC  UACAGCAACAUCAGAACUUCUUCUACAAGACAGAAAUCACACUGGCAACGGGA  GAAAUCAGAAAAGAGACCGCUGAUCCGAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAAAUC  GUCUGGACAAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCUGAGCAUG  CCGACGGUCAACAUCGUAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC  AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUUCGCAAGAAAG  AAGGACUGGACCCGAAAGAUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA  UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG  AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAUACAAUCAUGGAAAAGAAAGCAGCUC  GAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUCAAGGAAGUCAAG  AAGGACCGUAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC</p>
---	--

	<p>GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA  CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCCACUAC  GAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC  GAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUC  AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA  UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUC  CACCUGUUCACACUGACAAAACCUGGGAGCACCCGGCAGCAUUAAGUACUUC  GACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC  GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUCGAC  CUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC  GGAAGCCGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAG  AAGAGAAAGGUCGACAGCGGA</p>	
<p><b>Sequência de aminoácidos de dCas9 com dois sinais de localização nuclear como aminoácidos C-terminais</b></p>	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL  LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSPFHRLE  ESFLVEEDKKHERHPIFGNIIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL  IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEEENPINAS  GVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALLSLGLTPNFKSN  FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDIL  RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN  GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNG  SIHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVVGPLRGN  SRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKASASQSFIERMTNFDKNLNPNEKVLPK  HSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTRKVTV  KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEEN  EDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS  RKLINGIRDKQSGKTIIDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVS  GQDLSLHEHIANLAGSPAIKKGIHQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR  ENQTTQKQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL  QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSDINKVLTRSDKNRGKS  DNVPSSEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK  RQLVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVIITLKSCLVSDFRKD  FQFYKVIENNYHHAHDAYLNAVVGTA LIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK  MIAKSEQBIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE  IVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VVKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR  KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLSVKELLGITIMERSS  FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN  ELALPSKYVNFVLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE  FSKRVI LADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFYK  FDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGS GSPKRR  KVDGSPKRRKRVDSG</p>	228
<p><b>ORF de mRNA dCas9 que codifica SEQ ID NO: 228 usando códons mínimos de uridina, com códons de início e de parada</b></p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGA  UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUC AAGGUC  CUGGGAAACACAGACAGACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG  CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACUGAAGAGAACGCA  AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAUUC  UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAA  GAAAGCUUCCUGGUCGAAAGACAAGAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC  GGAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC  CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG  AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCUUGAUC  GAAGGAGACCUGAACC CGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCUACCG  CUGGUCCAGACAUAACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC  GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA  CUGGAAAACCUGAUCGACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAACGGACUGUUC  GGAACCUGAUCGACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUAAGAGCAAC  UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGAC  GACGACCUGGACAACCUGGACAGAUCCGAGACAGUACCGACACCUG  UUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUG  AGAGUCAACACAGAAAUCACAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUAAG</p>	229

	AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA CAGCAGCUGCCGAAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC GGAUACGCAGGAUACAUCGACCGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAAGUAGGACCGGAACAGAGAACUCGUCGGUC AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGA AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA CAGGAAGACUUCUACCCGUUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUUCGAAAAG AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGACCGCUGGCAAGAGGAAAC AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCUGGG AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA AGAAUGACAAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUC AAGUACGUCACAGAAGGAUUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAG AAGAAGGCAAUCCUGCACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAAGAAGAUUCGAAUGCUUCGACAGCGUC GAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAACAC GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAAGAAAC GAAGACAUCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA GAAUUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAAG GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC AGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAACUCCUG GACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCUAGCAGCUGAUC CACGACGACAGCCUGACAUCAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGC GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC AAGGUCAUGGGAAAGACACAAGCCGAAAACAUCGUCUUCGAAAUGGCAAGA GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUUGUACUACCUG CAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG AGCGACUACGACGUCGACGCAUCGUCGCCGAGAGCUUCUGAAGGAGCAGC AGCAUCGACAACAAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC GACAACGUCCCAGCGAAGAAGUCGUCUACAAGAAGAUAGAAGAAUCUACUGGGA CAGCUGCUGAAGCGAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCGACA AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG AGCAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAAAGCACGUCGACAGAUCCUG GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC UUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGACAGCAGC GCAUACCUGAAGCGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAGAAAGUACCCGAAAG CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC UUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAAGACAGAAAUCACACUGGCAAC GGAGAAAUCAGAAAGAGACCUGAUCGAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAA AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC AUGCCGACAGGUCACAUCGUCAGAAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC AGCAAGGAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCAAAUCAUGGAAAGAAGCAGC UUCGAAAAGAACCUGAUCGACUUCUUGGAAGCAAAGGGUAUCAAGGAAGUC AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCUACUUCUGUACCCUGGCAAGCCAC UACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCUGUUC GUCGAAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGACAGCGAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC GCAUCAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC AUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAGUAC UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAUC GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAG AAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG	
--	---	--

<p><b>sequência de codificação dCas9 que codifica SEQ ID NO: 228 usando códons mínimos de uridina (sem códons de início ou parada; adequado para inclusão na sequência de codificação de proteínas de fusão)</b></p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCUGGACUGGCAAUCCGGAACAAACAGCGUCGGAUUGG GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCAGCAAGAAGUUAAGGUCCUG GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA AGAAGAUAACACAAGAAGAAGAAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUUCUUC AGCAACGAAAUGGCAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAA AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCAGGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAA GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUUUAUCCAGCUG GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAACGGGA GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG GAAAACUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGACGGACUGUUCGGA AACCGAUCGACUGACCCUGGGACUGACACCGAACUUCAGAGCAACUUC GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC GACCUGGACAACCUGCGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGACAGACCUGUUC CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGAGCAGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGA GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCCGUGAGCGCAAGCAUGAUCAGAGA UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAUUCUUCUCCAGCAGAGCAAGAACGGA UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAUCUGGUCUAG CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAGC AUCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCAGCGCAAUCCUGAGAAGACAG GAAGACUUCUACCCGUUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUUGAAAAGAUUC CUGACAUUCAGAAUCCGUAUCUACGUCGGACCCGUGGCAAGAGGAAACAGC AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCCUGGAAAC UUCGAAAGUUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA AUGACAACUUCGACAGAAACCCUGCCGAAACGAAAAGGUCCUGCCGAAAGC AGCCUGCUGUACGAUUAUCUACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAG UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAG AAGGCAUUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAGGUCACAGUCAAG CAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGAAGAUUGAAUUCUUCGACAGCGUCGAA AUCAGCCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA GACAUCUGGAAAGACAUUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAAGACAGAGA AUGAUCGAAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAUCUCCUGGAC UUCUGAAGAGCGACGGAAUUCGCAAACAGAAAACUUCUAGCAGCUGAUCCAC GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGCGGA CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCGGCA AUCAAGAAGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUAAG GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA AACAGACAACACAGAAGGGACAGAAAGACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA AUCGAAGAAGGAAUCAAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACACCCG GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUUACUACCUGCAG AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCUGAAGGACGACAGC AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC AACGUCCCGAGCGAAGAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAG GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUAUCAAGAGA CAGCUGGUCGAAAACAAGACAGAUACAAGACAGUCGCACAGAUCCUGGAC AGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC AAGGUAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACAGCACAGCAGCA</p>	<p>230</p>
--	---	------------

	UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAAGU AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC UACAGCAACAUCGAACUUCUUCUACAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA GAAAUCAGAAAAGAGACCGCUGAUCGAAAACAACGGAGAAAACAGGAGAAAUC GUCUGGGACAAGGGAAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCUGAGCAUG CCGCAGGUCACAUCGUCACAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAAG AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCCGA UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC GAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAACGAA CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCACUUCUGUACCUGGCAAGCCACUAC GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC GAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUC AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCUUC CACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCCGGCAGCAUUCAGUACUUC GACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC GCAACACUGAUCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUCGAC CUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAAGCCGGAAGCCGAAGAAGAAGAGAAAAG GUCGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAAGGUCGACAGCGGA	
Promotor T7	TAATACGACTCACTATA	231
5' UTR de beta-globina humana	ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACC TCAAACAGACACC	232
3' UTR de beta-globina humana	GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTTT CTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTACTAACTGGGGGATA TTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATA AAAAACATTTATTTTCATTGC	233
5' UTR de alfa-globina humana	CATAAACCCCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTCTT CTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCACC	234
3' UTR de alfa-globina humana	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTG GGCCTCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCTGCACC CGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGG CGGC	235
5' UTR de beta-globina <i>Xenopus laevis</i>	AAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCC	236
3' UTR de beta-globina <i>Xenopus laevis</i>	ACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGC TACATAATACCAACTTACACTTTACAAAATGTTGTCC CCCAAATGTAGCCATTCGTATCTGCTCCTAATAAAA AGAAAGTTTCTTCACATTCT	237
Hormônio do Crescimento Bovino 5'UTR	CAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCAGCT	238

Hormônio do Crescimento Bovino 3'UTR	TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCC TTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCT TTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA	239
Hemoglobina alfa Mus musculus, cadeia adulta 1 (Hba-a1), 3'UTR	GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCC CTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTT GAATAAAGCCTGAGTAGGAAG	240
HSD17B4 5' UTR	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTC	241
RNA guia único G282 direcionado ao gene TTR de camundongo	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*mU	242
	Não Usado	243

<p>Transcrito de Cas9 com 5 'UTR de HSD, ORF correspondente à SEQ ID NO: 204 e 3' UTR de ALB</p>	<pre>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTGTT GCAGGCTTATTCCGGATCCATGGACAAGAAGTACAGCATCCGGACTGGACAT CGGAACAAACAGCGTCCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCC GAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAA GAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAAACAGCAGAAGCAA AAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAAGAACAGAAT CTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAG CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCCTGGTCAAGAAAGACAAGAAGCA CGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGA AAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAAGAGCTGGTCGACAGCACAGA CAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTT CAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCAGCT CGACAAGCTGTTTATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTGAAGA AAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAG ACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGA AAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGAC ACCGAATTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCT GAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGG AGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAAT CCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCCGCT GAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACT GCTGAAGGCACTGGTCAAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTT CTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAG CCAGGAAGAATTCTACAAGTTTATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGG AACAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAAGCA GAGAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAAT GCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAA CAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGG ACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAAGAGCGA AGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAG CGCACAGAGCTTTCATCGAAAGAATGACAACTTCGACAAGAAGCTCCCGAA CGAAAAGGTCTGCGGAAAGCACAGCCTGCTGTACGAATCTTCAAGTCTA CAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAAGCCGGC ATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGAC AAACGAAAAGGTCAAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGAT CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGC AAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTT CCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGCTCCTGACACT GACACTGTTTGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC ACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACAC AGGATGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCA GAGCGGAAAAGACAATCCTGGACTTCTGAAAGAGCGACGGATTTCGAAACAG AAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACAT CCAGAAGGCACAGGTGAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGC AAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAA GGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGAAAACAT CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA CAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAG CCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAA GCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTCGACCAGGA ACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCA GAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGA CAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCTCCGAGCGAAGAAGTCGTCAGAA GATGAAGAATACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAG AAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGACTGAGCGAACTGGA</pre>	244
--	---	-----

	<p>CAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAA  GCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAA  CGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGT  CAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAA  CTACCACCACGCACAGCAGCATACTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACT  GATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAA  GGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAA  GGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGAC  AGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAAC  AAACGGGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAAC  AGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCCGAGGTC AACATCGTCAAGAAGACAGA  AGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAG  CGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAGGACTGGGACCCGAAAGAGTACGGAGG  ATTCCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGA  AAAGGGAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCAC  AATCATGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCAGATCGACTTCTGGGAGC  AAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTA  CAGCCTGTTTCAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGG  AGAACTGCAGAAGGGAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTT  CCTGTACTTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAGCCCGGAAGACAA  CGAACAGAAGCAGCTGTTGTCGACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAAT  CATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTTCATCCTGGCAGACGCAAA  CCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAG  AGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTTACACTGACAAAACCTGGGAGC  ACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACAC  AAGCACAAAGGAAGTCTGGACGCAACTGATCCACCAGAGCATCACAGG  ACTGTACGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGG  AAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCAT  CTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATT  CATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAAC  ATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAA  AAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>ORF de Cas9  alternativa com  teor U de  19,36%</p>	<p>ATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAACATAATTCCTGGGT  TGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTC  CTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGCCCTG  CTGTTTACTCCGGCGAAACCCGAGAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCG  AGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATC  TTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTGGACGCACAGCTTCTTCCACCGCTGGAA  GAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTT  GGAAACATCGTGGACGAAAGTGGCGTACCAGAAAAGTACCCGACCATCTAC  CATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTG  ATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCGCGGACACTTCTGATC  GAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTGTTCAATCAA  CTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTTGAAGAAAACCCAAATCAATGCCAGC  GGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTGCAAGTCCGCGGCGC  CTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAGAAGAACCGGACTTTTC  GGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAAT  TTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGAC  GACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTTGGCGATCAGTACGGGATCTG  TTCTTCCCGCTAAGAACCCTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTG  CGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAG  CGGTACGACGAGCATCACAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGA  CAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATTTTCTTCGACCAGTCCAAGAAT  GGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAG  TTCATCAAGCCAATCTTGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTC  AAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGCAAACAGAGAACCCTTTGACAACGGA  AGCATCCACACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGGCGCGC  CAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGAAAAGATCGAGAAA  ATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCACTGGCGCGCGGCAAT  TCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAACCATCACTCCTTGG</p>	<p>245</p>

	<p>AATTTGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAATCCTTCATCGAA  CGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAG  CACAGCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTG  AAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGAGCGGAGAACAG  AAGAAAGCGATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTC  AAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTCGACTCAGTG  GAAATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCAT  GATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAAC  GAGGACATCCTGGAAGATATCGTCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGC  GAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTCGACGATAAG  GTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCTCTCC  CGCAAGCTGATCAACGGTATTTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACATCTCTG  GATTTCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCGATGATC  CACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAGAAAGCACAAGTGAGC  GGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCG  GCGATTAAAGAAGGGAATCCTGCAAACCTGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGT  AAGGTCATGGGACGGCACAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGA  GAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAGAATCCCGCGAAAGATGAAG  CGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGACGAGATCCTGAAAGAGCAC  CCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTG  CAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTG  TCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCTTTCTGAAGGATGAC  TCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGGAAGTCA  GATAATGTGCCATCGGAGGAGGTGCTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGG  CAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACT  AAAGCGAGCGCGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAAGGCTGGATTTCATCAA  CGGCAGCTGGTTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTG  GACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAA  GTGAAGGTGATTACCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCGGACTTTTCGGAAGGAC  TTTCAGTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGAC  GCATACCTCAACGCTGTGGTTCGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCTAAA  CTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAG  ATGATAGCCAAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAATACTTC  TTTTACTCAAACATCATGAACTTCTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAAT  GGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAA  ATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAAAGTGTCTCT  ATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGCGCGGATTT  TCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGC  AAGAAAGACTGGGACCCGAAAGTACGGAGGATTGATTTCGCCGACTGTC  GCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCAAGGTGGAGAAGGAAAGAGCAAGAAG  CTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCG  TTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCTGGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTG  AAGAAGGATCTGATCATCAAACCTGCCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAA  AATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAGAAAGGAAAT  GAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCAC  TACGAGAACTCAAAGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTC  GTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAATCTCCGAG  TTTTCAAAGCGCTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCTGTGCG  GCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATT  ATCCACTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCTTCAAGTAC  TTCGATACTACTATCGACCGAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTCTG  GACCGGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATC  GATCTGTCGACGCTGGTGGCGATGGTGGCGGTGGATCTACCCATACGAC  GTGCCGACTACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCCCAAGAAGAAACGGAAGGTG  TGATAG</p>	
<p>Transcrito Cas9  com 5' UTR de  HSD, ORF  correspondente  à SEQ ID NO:  245, sequência</p>	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT  GCAGGCCTTATTCGGATCTGCCACCATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCT  GGATATCGGAACTAATTCGTTGGGTGGGCGAGTATCACGGATGAATACAA  AGTGCCGTCGAAGAAGTTCAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCAT  CAAGAAGAATCTCATCGGAGCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGA</p>	<p>246</p>

de Kozak e 3' UTR de ALB	AGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAA TCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTGGA CGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAA GAAGCATGAACGGCATCTTATCTTTGGAAACATCGTGGACGAAGTGGCGTA CCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTC AACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGAT CAAATCCGCGGACACTTCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTC CGACGTGGATAAGCTGTTCACTGCTGTCAGACCTACAACCAACTGTT CGAAGAAAACCAATCAATGCCAGCGCGTTCGATGCCAAGGCCATCCTGTC CGCCCGGCTGTGCAAGTCCGCGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC GGGAGAGAAGAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGG ACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTGACCTGGCCGAGGACCGGAACT GCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACA AATTGGCGATCAGTACGGGATCTGTTCCCTGCCGCTAAGAACCTTTGGA CGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGC GCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCT CACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCGAAAAGTACAAGGA GATTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGACAGGTACATCGATGGAGG CGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAGAAT GGACGGAACCGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCG CAAACAGAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACACCAGATCCATCTGGG TGAGCTGCACGCCATCTTGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAA GGACAACCGGAAAAGATCGAGAAAATTTGACGTTCCGCATCCCGTATTA CGTGGGCCACTGGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATAGAAA ATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAAATTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGG AGCTTCGGCACAATCCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCT CCCAAACGAGAAGGTGCTTCTAAGCACAGCCTCCTTACGAATACTTCAC TGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAA GCCGGCTTTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAAGCGATTGTCGATCTGCTGTT CAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAA GAAGATCGAGTGTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGAGTGGAGGACAGATT CAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAA GGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCT GACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAAGC CTACGCTCATCTCTCGACGATAAGGTCATGAAACAACCAAGCGCCGCGG GTACTGTTGGGGCGCCTCTCCGCAAGCTGATCAACGGTATTTCGCGA TAAACAGAGCGGTAAACTATCCTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTCGC TAATCGTAACTTTCATGCAGTTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGA GGACATCCAGAAAGCACAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACA CATCGGAATCTGGCCGTTTCGCGCGGATTAAGAAGGGAATCCTGCAAAC TGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGACGGCACAACCGGA GAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAAGACTACCCAGAAGGGCCA GAAGAACTCCCGCGAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCT GGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAA CGAGAAGCTCTACCTGACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGA CCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGT TCCACAGTCTTTCTGAAGGATGACTCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCG CAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTGCT GAAGAAGATGAAGAATTAAGTGGCGGAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTAC CCAGAGAAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGACTCTCAGA GCTGGATAAGGCTGGATTTCATCAAACGGCAGCTGGTTCGAGACTCGGCAGAT TACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGA CGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAA ACTTGTGTCGGACTTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAAGTGAAGAAAT CAACAACTACCATCACCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCCGCAC CGCCCTGATCAAGAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGA CTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAAT CGGGAAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTACTCAAACATCATGAACTCTT CAAGACTGAAATACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGAT CGAAACTAACGGAGAACCGGGCAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTT CGCAACTGTTTCGCAAAGTGTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAA
-----------------------------	--

	<p>AACCGAAGTGC AAAACCGGCGGATTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAG  AAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTA  CGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTCGCATACTCCGTCTCGTGGTGGCCAA  GGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGTGGG  GATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCCCT  GGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAAGTCC  CAAGTACTCACTGTTGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTC  GGCCGGAGAACTCCAGAAAGGAAATGAGCTGGCCTGCCTAGCAAGTACGT  CAACTTCTCTATCTGTCTCGCACTACGAGAACTCAAAGGGTCACCGGA  AGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCATTATCTGGA  TGAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGA  CGCCAACTCGACAAAGTCTGTGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCC  GATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTGTTCAACCCTGACTAACCT  GGGAGCTCCAGCCGCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGACCGCAAAAAG  ATACACGTCCACCAAGGAAGTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCAT  CACTGGACTCTACGAACTAGGATCGATCTGTGCGAGCTGGGTGGCGATGG  TGGCGGTGGATCCTACCCATACGACGTGCCTGACTACGCTCCGGAGGTGG  TGGCCCCAAGAAGAAACGGAAGGTGTGATAGCTAGCCATCACATTTAAAAG  CATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTT  ATTCTCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAA  AACATAAATTTCTTTAATCATTTGCTCTTTTTCTGTGCTCAATTAAT  AAAAATGGAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Transcrito Cas9  com 5 'UTR de  HSD, ORF  correspondente  à SEQ ID NO:  245 e 3' UTR de  ALB</p>	<p>GGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGCTT  GCAGGCCCTTATTCGGATCTATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATAT  CGGAACATAATCCGTGGGTGGGACAGTATCACGGATGAATACAAAGTGCC  GTCCAAGAAGTTC AAGTCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAA  GAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCCGAGAAGCGAC  CCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCAT  CTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTGGACGACAG  CTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTCCCTGGTGGAGGAGGACAGAAGCA  TGAACGGCATCCTATCTTTGAAACATCGTGGACGAAGTGGCGTACCACGA  AAAGTACCCGACCATCACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAATGA  CAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAAT  CCGCGGACACTTCTGATCGAAGCGATCTGAACCTGATAACTCCGACGT  GGATAAGCTGTTCACTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTGGAAGA  AAACCCAAATCAATGCCAGCGGCGTGGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCG  GCTGTGGAAGTCCGCGGCGCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGA  GAAGAAGAACGGACTTTTCGGCAACTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCAC  TCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCAAGCTGCAACT  CTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTTGG  CGATCAGTACGCGGATCTGTTCCCTGCCGCTAAGAACCTTTCCGACGCAAT  CTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCT  TAGCCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCT  GCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATTTT  CTTCGACCAGTCCAAGAAATGGGTACGACGGGTACATCGATGGAGCGCCAG  CCAGGAAGAGTTCTATAAGTTTCATCAAGCCAATCCTGGAAGAAGATGGACGG  AACCGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGCAACA  GAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACACCAGATCCATCTGGGTGAGCT  GCACGCCATCTTGGCGGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAA  CCGGAAAAGATCGAGAAAATTTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGG  CCCCTGGCGCGCGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGA  GGAAACCATCACTCCTTGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTC  GGCACAATCCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCAAA  CGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTA  CAACGAAGTACTAAAGTGAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGC  CTTTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAAGCGATTGTGATCTGTGTTCAAGAC  CAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGAT  CGAGTGTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAACGC  TTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAGGACTT  CCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCTGACCTT</p>	<p>247</p>

	<p>GACCCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGGCTTAAGACCTACGC  TCATCTCTTCGACGATAAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCCGGTACAC  TGTTGGGGCCCGCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTTCGCGATAAACA  GAGCGGTA AAACTATCCTGGATTTCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCG  TAACCTCATGCAGTTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACAT  CCAGAAAGCACAAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGC  GAATCTGGCCGGTTCGCCGGGATTAAGAAGGGAATCCTGCAAACCTGTGAA  GGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAACCCGGAGAATAT  CGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAGAA  CTCCCGCAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAG  CCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACACGACGCTGCAGAACGAGAA  GCTCTACCTGTACTATTTGCAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGA  GCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACA  GTCCTTTCTGAAGGATGACTCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGA  CAAGAACAGAGGGAAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAA  GATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAG  AAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGGGACTCTCAGAGCTGGA  TAAGGCTGGATTTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAA  GCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAA  CGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGT  GTCGGACTTTCCGGAAGGACTTTCAGTTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAA  CTACCATCACGGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGCACC GGCCCT  GATCAAGAAGTACCCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAA  GGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAA  AGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACCTCTTCAAGAC  TGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGGCCACTGATCGAAAC  TAACGGAGAAACGGGGCAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAAC  TGTTGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGA  AGTCAAACCCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAG  CGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAGTACGGAGG  ATTTCGATTCCCGACTGTCCGATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGA  GAAGGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGTGGGGATTAC  CATCATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCCTGGAGGC  GAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACCTGCCAAGTA  CTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGG  AGAACTCCAGAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTT  CCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAGAAACTCAAAGGGTCCACCGGAAGATAA  CGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAGCATTATCTGGATGAAAT  CATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAA  CCTCGACAAAGTCTGTGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAG  AGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCCACCTGACTAACCTGGGAGC  TCCAGCCGCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGACCGCAAAAGATACAC  GTCCACCAAGGAAGTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGG  ACTCTACGAACTAGGATCGATCTGTGCGAGCTGGGTGGCGATGGTGGCGG  TGGATCCTACCCATACGACGTGCCTGACTACGCCCTCCGGAGGTGGTGGCCC  CAAGAAGAAACGGAAAGGTGTGATAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTC  AGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTTCAT  CTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATA  AATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTCAATTAATAAAAAA  TGGAAAGAACCTCGAG</p>	
	Não utilizado	248
<p>Transcrito Cas9  compreendendo  a sequência  Kozak com ORF  de Cas9 usando  códon com  expressão  geralmente alta</p>	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGTGCTT  GCAGGCCTTATTCCGGATCCGCCACCATGCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTGGA  CGGGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACATAATTCGGTGGG  TTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAAGAAAGTCAAGGT  CCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCT  GCTGTTTACTCCGGCGAAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGC  GAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGAT  CTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGA  AGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTT</p>	249

em humanos	<p>TGGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTA  CCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATT  GATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCGCGGGACACTTCTGAT  CGAAGGCGATCTGAACCTTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCA  ACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCTAG  CGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTGCAAGTCGCGGCG  CCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAGAACGGACTTTT  CGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAA  TTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGA  CGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAATTTGGCGATCAGTACGCGGATCT  GTTCTTGGCCGCTAAGAACCTTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATACCT  GCGCGTGAACACCGAAATAACCAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAA  GCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAG  ACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAA  TGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAA  GTTCAATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACCGAAGAAGTCTGGT  CAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACAACGG  ATCCATTCCCACCCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGGCGCG  CCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCCGGAAAAGATCGAGAA  AATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCACTGGCGCGCGGCAA  TTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTG  GAATTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAGCTTCATCGA  ACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAA  GCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAAGTACTAAAGT  GAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACA  GAAGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGT  CAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTCGACTCAGT  GGAAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCA  TGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACAGGAGAA  CGAGGACATCGTGAAGATATCGTCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCG  CGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAA  GGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCCGCGGTACACTGGTTGGGGCCGCTCTC  CCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAACATATCCT  GGATTTCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAATTGAT  CCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAGCACAAAGTGT  CGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGCTTCGCC  GGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGT  GAAGGTCATGGGACGGCACAACCCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCG  AGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTCCCGCGAAAGGATGAA  GCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCA  CCCCGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTT  GCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTT  GTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCCTTTCTGAAGGATGA  CTCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTC  AGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCG  GCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAACTCAC  TAAAGCCGAGCGCGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCAATCAA  ACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGCTGGCGCAGATCTT  GGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACCATAAGCTCATCCGGGA  AGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTGGACTTTTCGGAAGGA  CTTTCAGTTTACAAAAGTGAAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGA  CGCATACCTCAACGCTGTGGTCCGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAA  ACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAA  GATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGAAAAGCAACTGCGAAATACTT  CTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTCAAGACTGAAATACGCTGGCCAA  TGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAAATAACGGAGAAAACGGGCGA  AATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGTCTC  TATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAAACCGCGGATT  TTCAAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGACG  CAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCCGGACTGT  CGCATACTCCGTCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAGAGCAAAAA</p>	
------------	---	--

	<p>GCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTC  GTTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGT  GAAGAAGGATCTGATCATCAAACCTCCCAAGTACTCACTGTTTCGAACTGGA  AAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGGAGAACTCCAAAAAGGAAA  TGAGTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCA  CTACGAAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTT  CGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGA  GTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCTGTGTC  GGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGCCGAGAACAT  TATCCACTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCTTCAAGTA  CTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATAACACGTCCACCAAGGAAGTTCT  GGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAACTAGGAT  CGATCTGTTCGACAGCTGGGTGGCGATTGATAGTCTAGCCATCACATTTAAA  GCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAAATGAAGATCAATAGCT  TATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAA  AAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTCTCTGTGCTTCAATTA  TAAAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>ORF de Cas9  com junções de  emenda  removidas;  12,75% de teor  de U</p>	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGA  TGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTC  CTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCCTGATCGGAGCACTG  CTGTTTCGACAGCGGAGAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCA  AGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAACAAGAACTGCTACCTGCAGGAAAT  TTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCTGGAA  GAAAGCTTCTGGTTCGAAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTC  GGAAACATCGTTCGACGAAGTTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTAC  CACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTG  ATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTGTATC  GAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAG  CTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAAGCAGCAGC  GGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGCAGAGAAGA  CTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTC  GGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAAC  TTCGACCTGGCAGAAGAGCGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGAC  GACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTG  TTCTGGCAGCAAAGAACCCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCTCTG  AGAGTCAACACAGAAATCAAAAAGGCACCCTGAGCGCAAGCATGATCAAG  AGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTTCAGA  CAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC  GGATACGCAAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAG  TTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTTC  AAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAACATTTCGACAACGGA  AGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGA  CAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAG  ATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAAC  AGCAGATTTCGATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCCTGG  AACTTCGAAGAAGTTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGACTTTCATCGAA  AGAATGACAAACTTCGACAAGAACCCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCCGAAG  CACAGCCTGCTGTACGAATACTTACAGTCTACAACGAACTGACAAAAGGTC  AAGTACGTACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCCGAGAACAG  AAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAAACAGAAAAGGTTCACAGT  AAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTC  GAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAC  GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAAGAAAAC  GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAGA  GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAG  GTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGC  AGAAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAAGAACTCCTG  GACTTCTGAAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAACTTCTATGACAGTATC  CACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTGAGC  GGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGAAAACCTGGCAGGAAGCCCC</p>	<p>250</p>

	<p>GCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAACTGGTC  AAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGA  GAAAACCAGACACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAG  AGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACAC  CCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTG  CAaAACGGAAGAGACATGTACGTGACCGAGGAACTGGACATCAACAGACTG  AGCGACTACGACGTGACCCACATCGTCCCAGAGCTTCTGAAAGGACGAC  AGCATCGACAACAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC  GACAACGTCCCAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAATACTGGAGA  CAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACA  AAGCGAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAG  AGACAGCTGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGACAGATCCTG  GACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAA  GTCAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGAC  TTCAGATTCTACAGGTCAGAGAAATCAACAATACTACCACCACGCACACGAC  GCATACCTGAACGCAGTCTGCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAG  CTGGAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCATCGAGTTCAGAAAG  ATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTC  TTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAC  GGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAACGGAGAAACAGGAGAA  ATCGTCTGGGACAAGGGAAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGC  ATGCCGACGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTC  AGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGA  AAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTGACAGCCCGACAGTC  GCATACAGCGTCTGGTCTGCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG  CTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGC  TTCGAAAAGAACCAGATCGACTTCTTGGAAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTC  AAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGAACTGGAA  AACGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGAAAC  GAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCAC  TACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCTGTTT  GTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA  TTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC  GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC  ATCCACCTGTTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCATTCAAGTAC  TTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTCTG  GACGCAACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAATC  GACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA  AAGGTCATG</p>	
<p>Transcrito de  Cas9 com 5  'UTR de HSD,  ORF  correspondente  à SEQ ID NO:  250, sequência  de Kozak e 3'  UTR de ALB</p>	<p>GGGTCCCAGTCCGGCTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGCTGTT  GCAGGCCTTATTCCGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACT  GGACATCGGAACAACAGCGTCGGATGGGAGTCATCACAGACGAATACAA  GGTCCCAGCAAGAAGTCAAGGTCCTGGGAAAACACAGACAGACACAGCAT  CAAGAAGAACCCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGGAGAAAACAGCAGA  AGCAACAAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATAACAAAGAAGAAAGAA  CAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTACGCAACGAAATGGCAAAGGTCGA  CGACAGCTTCTTCCACcggCTGGAAGAAAGCTTCTGGTCGAAGAAGACAA  GAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGAAAACATCGTCGACGAAAGTCGCATA  CCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAAGAAGCTGGTCGACAG  CACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGAT  CAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAG  CGACGTGACAAGCTGTTTATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACCAGCTGTT  CGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAG  CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC  GGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGAAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG  ACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCT  GCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACA  GATCGGAGACCAGTACCGAGACCTGTTTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGA  CGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGC  ACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCT</p>	<p>251</p>

<p> GACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGA  AATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGG  AGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT  GGACGGAAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG  AAAGCAGAGAACATTCGACAACCGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGG  AGAAGTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAA  GGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTGAGAATCCCGTACTA  CGTCCGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAA  GAGCGAAGAAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGG  AGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGATGACAAACTTCGACAAGAACCT  GCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC  AGTCTACAACGAACTGACAAAAGGTCAAGTACGTACAGAGAAGGAATGAGAAA  GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTT  CAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAA  GAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT  CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA  GGACTTCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAAGCATCGTCAA  GACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAAATGATCGAAGAAAAGACTGAAGAC  ATACGCCACACCTGTTCCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAG  ATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGA  CAAGCAGAGCGGAAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTGCG  AAACAGAAACTTCATCGACTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGA  AGACATCCAGAAGGCACAGGTGAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCCACGAACA  CATCGCAAACTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC  AGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGA  AAACATCGTCATCGAAATGGCAAGGAAAACAGACAACACAGAAGGGGACA  GAAGAACAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAAT  GGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAA  CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA<sub>2</sub>AAACGGAAGAGACATGTACGTCGA  CCAGGAAGTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGT  CCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAG  AAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT  CAAGAAGATGAAGAATACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCAC  ACAGAGAAAAGTTCGACAACCTGACAAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGA  ACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAAACAAGACAGAT  CACAAAAGCAGTTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAGGTACGA  CGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAA  GCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCACAAAGGTCAGAGAAAT  CAACAATAACCACACGACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGGAAC  AGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAGCGAATTCGCTACCGGAGA  CTACAAGGTCACGACGTCAGAAAAGATGATCGCAAAGAGCGAAGCAAGAAAT  CGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAAGTCTT  CAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT  CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTT  CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGACAGGTCAAACATCGTCAAGAA  GACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAG  AAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGGAAGAAGTA  CGGAGGATTCGACAGCCGACAGTTCGCATACAGCGTCTGGTTCGTCGCAAAA  GGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAGTCTGGG  AATCACATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCT  GGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC  GAAGTACAGCCTGTTGAACTGGAAAACGGAAGAAAAGAGAATGCTGGCAAG  CGCAGGAGAAGTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCTGCCGAGCAAGTACGT  CAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGA  AGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGA  CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGA  CGAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAACAGCACAGAGACAAGCC  GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAAACCT  GGGAGCACCCGGCAGCATTCAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAAGAG  ATACACAAGCACAAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCAT  CACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGG  AGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAAGGTCATAGCTAGCCATCACATTTAA  AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAAATGAAGATCAATAG  CTTATTCATCTCTTTTCTTTTCTGTTGGTGTAAGCCAAACACCCCTGTCTA  AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATT  AATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG </p>	
--	--

<p>ORF de Cas9 com códons mínimos de uridina frequentemente usados em humanos em geral; 12,75% de teor de U</p>	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGC  TGGGCCGTGATCACCCAGCAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTG  CTGGGCAACACCCGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTG  CTGTTTCGACAGCGGCGAGACCCGCCGAGGCCACCAGACTGAAGAGAACCGCC  AGAAGAAGATACACCAGAAGAAGAACAAGAAATCTGCTACCTGCAGGAGATC  TTCAGCAACGAGATGGCCAAAGGTGGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAG  GAGAGCTTCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTTC  GGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTAC  CACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGAGACTG  ATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCAGAGGCCACTTCTGATC  GAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAG  CTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGC  GGCGTGGACGCAAGGCCATCCTGAGCGCCAGACTGAGCAAGAGCAAGA  CTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAGCGCCTGTTT  GGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAAC  TTCGACCTGGCCGAGGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGAC  GACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCACTACGCCGACCTG  TTCCTGGCCGCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTG  AGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAG  AGATACGACGACACCACCAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGAGA  CAGCAGCTGCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC  GGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAG  TTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTG  AAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGC  AGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGA  CAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACAGAGAGAAGATCGAGAAG  ATCCTGACCTTCAGAATCCCTACTACGTGGGCCCTGGCCAGAGGCAAC  AGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGG  AACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTCATCGAG  AGAATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAG  CACAGCCTGCTGTACGAGTACTTACCCTGTACAACGAGCTGACCAAGGTG  AAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAG  AAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTG  AAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTG  GAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCAC  GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAGGAGAAC  GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTGACCTGTTTCGAGGACAGA  GAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCACCTGTTTCGACGACAAG  GTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGC  AGAAAGCTGATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTG  GACTTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATGACGCTGATC  CACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGC  GGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGCGACCC  GCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTG  AAGGTGATGGGCAGACACAAGCCCGAGAATCGTGATCGAGATGGCCAGA  GAGAACCAGACCACCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAG  AGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCAC  CCCGTGGAGAACACCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACTGTACTACTG  CAGAACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACAGACTG  AGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCACCCAGAGCTTCTGAAGGACGAC  AGCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGC  GACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGA  CAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACC  AAGGCCGAGAGAGGCGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGCTTTCATCAAG  AGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCCAGATCCTG</p>	252
---	--	-----

	<p>GACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAG  GTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGAC  TTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGAC  GCCTACCTGAACCGCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAAGTACCCCAAG  CTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTTGAGAAAAG  ATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTC  TTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAAC  GGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGGCAG  ATCGTGTGGGACAAGGCCAGAGACTTCGCCACCCTGAGAAAGGTGCTGAGC  ATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGGCTTC  AGCAAGGAGAGCATCCTGCCAAGAGAAAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGA  AAGAAGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGC  GCCTACAGCGTGTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAAG  CTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGC  TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTG  AAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAG  AACGGCAGAAAGAGAATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAAC  GAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTTCTGTACCTGGCCAGCCAC  TACGAGAAGCTGAAGGCAGCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTC  GTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG  TTCAGCAAGAGAGTGTCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGC  GCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATC  ATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTAC  TTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCAGCACCAAGGAGGTGCTG  GACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGCCTGTACGAGACCAGAATC  GACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGACGCCCAAGAAGAAGAGA  AAGGTGTGA</p>	
<p>Transcrito Cas9  com 5' UTR de  HSD, ORF  correspondente  à SEQ ID NO:  252, sequência  de Kozak e 3'  UTR de ALB</p>	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGCTT  GCAGGCCTTATTTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCT  GGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCGTGTATCACCGACGAGTACAA  GGTGGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACAGACACAGCAT  CAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGA  GGCCACCAGACTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGAA  CAGAATCTGTACTCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTGGAA  CGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGAGCTTCTGGTGGAGGAGGACAA  GAAGCAGGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCATA  CCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAG  CACCGACAAGGCCGACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGAT  CAAGTTCAGAGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAG  CGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTT  CGAGGAGAACCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCTGAG  CGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCC  CGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGG  CCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCT  GCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCA  GATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCAAGAACCTGAGCGA  CGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAAGGC  CCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCT  GACCCCTGCTGAAGGCCCTGGTGGACAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGA  GATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGG  CGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCATCCTGGAGAAGAT  GGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAG  AAAGCAGAGAACCCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGG  CGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAA  GGACAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAATCCCTACTA  CGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAA  GAGCGAGGAGACCATACCCCTGGAATTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGG  CGCCAGCGCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTCGACAAGAACCT  GCCAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAC  CGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAA</p>	253

	<p>GCCCCCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTT  CAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAA  GAAGATCGAGTGTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATT  CAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA  GGACTTCTTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGT  GACCCTGACCCTGTTTCGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGAC  CTACGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAG  ATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGCATCAGAGA  CAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTTGAAGAGCGACGGCTTCGC  CAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGA  GGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCA  CATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTCGAGAC  CGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCAGACACAAGCCGA  GAACATCGTATCGAGATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCA  GAAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCT  GGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAA  CGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCAGAGACATGTACGTGGA  CCAGGAGCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGCTGGACCACATCGT  GCCCCAGAGCTTCTTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCAG  AAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGT  GAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCAC  CCAGAGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCTGAGCGA  GCTGGACAAGGCCGGCTTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGAT  CACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGA  CGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAA  GCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTCTTACAAGGTGAGAGAGAT  CAACAACCTACCACCACGCCACGACGCTTACCTGAACGCCGCTGGTGGGCAC  CGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGA  CTACAAGGTGTACGACGCTGAGAAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGAT  CGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTT  CAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGAT  CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTT  CGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAA  GACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGAG  AAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTA  CGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGTGTGGTGGTGGCCAA  GGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGTGGG  CATCACCATCATGGAGAGAAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTT  GGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC  CAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGAATGCTGGCCAG  CGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGT  GAACCTTCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGA  GGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCTGAGGAGCAGCACAAGCCTACTTGA  CGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGAGAGTATCCTGGCCGA  CGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCC  CATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCT  GGGCGCCCCCGCCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAG  ATACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCAT  CACCGGCTGTACGAGACCAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGGGACGG  CGGCGGCGAGCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGTGACTAGCCATCACATTTAA  AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAG  CTTATTATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTA  AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTCAATT  AATAAAAAATGGAAGAACCTCGAG</p>	
<p>ORF de Cas9  com códons  mínimos de  uridina  raramente  usados em  humanos em</p>	<p>ATGGACAAAAATACAGCATAGGGCTAGACATAGGGACGAACAGCGTAGGG  TGGGCGTAATAACGGACGAATACAAAGTACCGAGCAAAAAATTCAAAGTA  CTAGGGAACACGGACCAGACAGCATAAAAAAAACCTAATAGGGGGCGCTA  CTATTGACAGCGGGAAACGGCGGAAGCGACGCGACTAAAACGAACGGCG  CGACGACGATACAGCGCAGAAAAACCGAATATGCTACTTACAAGAAATA  TTCAGCAACGAAATGGCGAAAGTAGACGACAGCTTCTTCCACCGACTAGAA</p>	<p>254</p>

<p>geral; 12,75% de teor de U</p>	<p>GAAAGCTTCCTAGTAGAAGAAGACAAAAAACACGAACGACACCCGATATTC  GGGAACATAGTAGACGAAGTAGCGTACCACGAAAAATACCCGACGATATAC  CACCTACGAAAAAACTAGTAGACAGCACGGACAAAAGCGGACCTACGACTA  ATATACCTAGCGCTAGCGCACATGATAAAATCCGAGGGCACTTCCTAATA  GAAGGGGACCTAAACCCGGACAACAGCGACGTAGACAAACTATTCATACAA  CTAGTACAAACGTACAACCAACTATTCGAAGAAAACCCGATAAACCGGAGC  GGGGTAGACGCGAAAGCGATACTAAGCGCGCGACTAAGCAAAGCCGACGA  CTAGAAAACCTAATAGCGCAACTACCGGGGAAAAAAAACGGGCTATTC  GGGAACCTAATAGCGCTAAGCCTAGGGCTAACGCCGAACCTCAAAGCAAC  TTCGACCTAGCGGAAGACGCGAAACTACAACCTAAGCAAAGACACGTACGAC  GACGACCTAGACAACCTACTAGCGCAAATAGGGGACCAATACGCGGACCTA  TTCCTAGCGGCGAAAAACCTAAGCGACGCGATACTACTAAGCGACATACTA  CGAGTAAACACGGAAATAACGAAAGCGCCGCTAAGCGCGAGCATGATAAAA  CGATACGACGAACACCACCAAGACCTAACGCTACTAAAAGCGCTAGTACGA  CAACAACCTACCGAAAAATACAAAGAAATATTCCTTCGACCAAAGCAAAAAC  GGGTACGCGGGGTACATAGACGGGGGGCGAGCCAAGAAGAATTCTACAAA  TTCATAAAACCGATACTAGAAAAAATGGACGGGACGGAAGAACTACTAGTA  AAACTAAACCGAGAAGACCTACTACGAAAACACGAACGTTTCGACACGGG  AGCATACCGCACCAAATACACCTAGGGGAACACACGCGATACTACGACGA  CAAGAAGACTTCTACCCGTTCTAAAAGACAACCGAGAAAAAATAGAAAAA  ATACTAACGTTCCGAATACCGTACTACGTAGGGCCGCTAGCGCGAGGGAA  AGCCGATTTCGCGTGGATGACGCGAAAAAGCGAAGAAACGATAACGCGGTGG  AACTTCGAAGAAGTAGTAGACAAGGGGGCGAGCGCGCAAAGCTTCATAGAA  CGAATGACGAACCTTCGACAAAACCTACCGAACGAAAAAGTACTACGAAA  CACAGCCTACTATACGAATACTTCACGGTATACAACGAACCTAACGAAAGTA  AAATACGTAACGGAAGGGATGCGAAAACCGCGGTTCTAAGCGGGGAACAA  AAAAAAGCGATAGTAGACCTACTATTCAAACGAAACCGAAAAGTAACGGTA  AAACAACATAAAGAAGACTACTTCAAAAAAATAGAATGCTTCGACAGCGTA  GAAATAAGCGGGGTAGAAGACCGATTCAACGCGAGCCTAGGGACGTAACC  GACCTACTAAAAATAATAAAAGCAAAGACTTCTAGACAACGAAGAAAAC  GAAGACATACTAGAAGACATAGTACTAACGCTAACGCTATTCGAAGACCGA  GAAATGATAGAAGAACGACTAAAACGTACGCGCACCTATTCGACGACAAA  GTAATGAAACAACATAAACGACGACGATACACGGGGTGGGGGCGACTAAGC  CGAAAACATAAACCGGATACGAGACAACAAAGCGGGAAAAACGATACTA  GACTTCCTAAAAAGCGACGGGTTTCGCGAACCGAAACTTCATGCAACTATA  CACGACGACAGCCTAACGTTCAAAGAAGACATACAAAAAGCCAAAGTAAGC  GGGCAAGGGGACAGCCTACACGAACACATAGCGAACCTAGCGGGGAGCCCG  GCGATAAAAAAAGGGATACTACAAACGGTAAAAGTAGTAGACGAACCTAGTA  AAAGTAATGGGGGACACAAAACCGGAAAACATAGTAATAGAATGGCGCGA  GAAACCAAACGACGCAAAAAGGGCAAAAAAACAGCCGAGAACGAATGAAA  CGAATAGAAGAAGGATAAAAAGAACTAGGGAGCCAAATACTAAAAGAACAC  CCGGTAGAAAACACGCAACTACAAAACGAAAAACTATACTATACTACCTA  CAAAACGGGCGAGACATGTACGTAGACCAAGAACTAGACATAAACCGACTA  AGCGACTACGACGTAGACCACATAGTACCGCAAAGCTTCCTAAAAGACGAC  AGCATAGACAACAAAGTACTAACCGGAAGCGACAAAAACCGAGGGAAAAGC  GACAACTACCGAGCGAAGAAGTAGTAAAAAAAATGAAAACTACTGGCGA  CAACTACTAAAACGCGAAACTAATAACGCAACGAAAATTCGACAACCTAACG  AAAGCGGAACGAGGGGGGCTAAGCGAACTAGACAAAAGCGGGGTTTCATAAAA  CGACAACCTAGTAGAAAACGCGACAATAACGAAACACGTAGCGCAAATACTA  GACAGCCGAATGAACACGAAATACGACGAAAACGACAACTAATACGAGAA  GTAAGAAGTAATAACGCTAAAAAGCAAACCTAGTAAGCGACTTCGAAAAGAC  TTCCAATTCTACAAAGTACGAGAAATAAACAACCTACCACCACGCGCACGAC  CGGTACCTAAACGCGGTAGTAGGGACGGCGCTAATAAAAAAATACCCGAAA  CTAGAAAAGCAATTTCGTATACGGGGACTACAAAGTATACGACGTACGAAA  ATGATAGCGAAAAGCGAACAAGAAATAGGGAAAAGCGACGGCGAAATACTTC  TTCTACAGCAACATAATGAACCTCTTCAAACCGAAATAACGCTAGCGAAC  GGGAAAATACGAAAACGACCGCTAATAGAAAACGAAACGGGAAAACGGGGAA  ATAGTATGGGACAAAAGGGCGAGACTTCGCGACGGTACGAAAAGTACTAAGC  ATGCCGCAAGTAAACATAGTAAAAAAAACGGAAGTACAAAACGGGGGGTTTC  AGCAAAGAAAGCATACTACCAAAACGAAACAGCGACAACTAATAGCGCGA  AAAAAAGACTGGGACCCGAAAAAATACGGGGGTTTCGACAGCCCGACGGTA</p>
-----------------------------------	--

	<p>CGGTACAGCGTACTAGTAGTAGCGAAAGTAGAAAAAGGGAAAAAGCAAAAA  CTAAAAAGCGTAAAAGAAGTACTAGGGATAACGATAATGGAACGAAGCAGC  TTCGAAAAAACCCGATAGACTTCCTAGAAGCGAAAGGGTACAAAAGAAGTA  AAAAAGACCTAATAATAAACTACCGAAATACAGCCTATTTCGAACTAGAA  AACGGGCGAAAACGAATGCTAGCGAGCGCGGGGAACACAAAAAGGGAAC  GAACTAGCGCTACCGAGCAAATACGTAACTTCCATACCTAGCGAGCCAC  TACGAAAAACTAAAAGGAGCCCGGAAGACAACGAACAAAAACAATATTC  GTAGAACAAACAACTACTAGACGAAATAATAGAACAAATAAGCGAA  TTCAGCAAACGAGTAATACTAGCGGACGCGAACCTAGACAAAGTACTAAGC  CGGTACAACAAACACCGAGACAAACCGATACGAGAACAAGCGGAAAAACATA  ATACACCTATTACGCTAACGAACCTAGGGGCGCCGGCGGCTTCAAATAC  TTCGACACGACGATAGACCGAAAACGATACACGAGCAGCAAAGAAGTACTA  GACCGGACGCTAATACACCAAAGCATAACGGGGCTATACGAAACGCGAATA  GACCTAAGCCAACCTAGGGGGGACGGGGGGGAGCCCGAAAAAAAACGA  AAAGTATGA</p>	
<p>Transcrito de  Cas9 com 5'  UTR de HSD,  ORF  correspondente  à SEQ ID NO:  254, sequência  de Kozak e 3'  UTR de ALB</p>	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGTGCGTT  GCAGGCCCTATTTCGGATCCGCCACCATGGACAAAAAATACAGCATAGGGCT  AGACATAGGGACGAACAGCGTAGGGTGGGCGGTAATAACGGACGAATACAA  AGTACCGAGCAAAAAATTCAAAGTACTAGGGAACACGGACCGACACGAT  AAAAAAAACCTAATAGGGGCGTACTATTTCGACAGCGGGAAACGGCCGA  AGCGACGCGACTAAAACGAACGGCGGACGACGATACACGCGACGAAAAAA  CCGAATATGCTACCTACAAGAAATATTCAGCAACGAAATGGCGAAAGTAGA  CGACAGCTTCTTCCACCGACTAGAAGAAAGCTTCCCTAGTAGAAGAAGACAA  AAAACACGAACGACACCCGATATTTCGGGAACATAGTAGACGAAGTAGCGTA  CCACGAAAAATACCCGACGATATACCACCTACGAAAAAACTAGTAGACAG  CACGGACAAAGCGGACCTACGACTAATATACCTAGCGCTAGCGCACATGAT  AAAATTCGAGGGCCTTCCCTAATAGAAGGGGACCTAAACCCGGACAACAG  CGACGTAGACAACTATTTCATACACTAGTACAAACGTACAACCAACTATT  CGAAGAAAACCCGATAAACCGGAGCGGGGTAGACCGGAAAGCGATACTAAG  CGCGCGACTAAGCAAAAGCCGACGACTAGAAAACCTAATAGCGCAACTACC  GGGGGAAAAAAAACGGGCTATTTCGGGAACCTAATAGCGCTAAGCCTAGG  GCTAACGCCGAACCTCAAAGCAACTTCGACCTAGCGGAAGACGCGAAACT  ACAACCTAAGCAAAGACACGTACGACGACGACCTAGACAACTACTAGCGCA  AATAGGGGACCAATACCGGACCTATTCCCTAGCGGGGAAAAACCTAAGCGA  CGCGATACTACTAAGCGACATACTACGAGTAAACACGGAAATAACGAAAGC  GCCGCTAAGCGCGAGCATGATAAAACGATACGACGAACACCACCAAGACCT  AACGCTACTAAAAGCGCTAGTACGACAACAACCTACCGAAAAAATACAAAGA  AATATTCTTCGACCAAAGCAAAAACGGGTACCGGGGTACATAGACGGGGG  GGCGAGCCAAGAAGAATTCTACAAATTCATAAAAACCGATACTAGCAAAAAT  GGACGGGACGGAAGAACTACTAGTAAAACCTAAACCGAGAAAGACCTACTACG  AAAACAACGAACGTTTCGACAACGGGAGCATAACCGACCAAATACACCTAGG  GGAACCTACACGCGATACTACGACGACAAGAAGACTTCTACCCGTTCCCTAAA  AGACAACCGAGAAAAAATAGAAAAAATACTAACGTTCCGAATACCGTACTA  CGTAGGGCCGCTAGCGCGAGGGAACAGCCGATTTCGCGTGGATGACGCGAAA  AAGCGAAGAACGATAACGCCGTTGGAACCTTCGAAGAAGTAGTAGACAAAAGG  GGCGAGCGCGCAAAGCTTCATAGAACGAATGACGAACCTTCGACAAAAACCT  ACCGAACGAAAAAGTACTACCGAAACACAGCCTACTATACGAATACTTCAC  GGTATACAACGAACCTAACGAAAGTAAAATACGTAACGGAAGGGATGCGAAA  ACCGGCTTCCCTAAGCGGGGAACAAAAAAGCGATAGTAGACCTACTATT  CAAAACGAACCGAAAAGTAAACGGTAAAACAACCTAAAAGAAGACTACTTCAA  AAAAATAGAATGCTTCGACAGCGTAGAATAAGCGGGGTAGAAGACCGATT  CAACGCGAGCCTAGGGACGTACCACGACCTACTAAAAATAATAAAAAGACAA  AGACTTCCCTAGACAACGAAGAAAACGAAGACATACTAGAAACATAGTACT  AACGCTAACGCTATTTCGAAGACCGAGAAATGATAGAAGAACGACTAAAAAC  GTACGCGCACCTATTTCGACGACAAAGTAATGAAACAACATAAACGACGACG  ATACACGGGGTGGGGGGGACTAAGCCGAAAACCTAATAAACGGGATACGAGA  CAAACAAAGCGGAAAACGATACTAGACTTCCCTAAAAGCGACGGGTTCCG  GAACCGAACTTTCATGCACTAATACACGACGACGACCTAACGTTCAAAGA  AGACATACAAAAAGCGCAAGTAAGCGGGCAAGGGGACAGCCTACACGAACA  CATAGCGAACCTAGCGGGGAGCCCGCGGATAAAAAAAGGGATACTACAAC</p>	255

	<p>GGTAAAAGTAGTAGACGAAGTAGTAAAAGTAATGGGGCGACACAAACCGGA  AAACATAGTAATAGAAATGGCGCGAGAAAACCAAACGACGCAAAAAGGGCA  AAAAAACAGCCGAGAACGAATGAAACGAATAGAGAAGGGATAAAAAGAACT  AGGGAGCCAAATACTAAAAGAACACCCGGTAGAAAACACGCAACTACAAAA  CGAAAAACTATACCTATACTACCTACAAAAACGGGCGAGACATGTACGTAGA  CCAAGAACTAGACATAAACCGACTAAGCGACTACGACGTAGACCACATAGT  ACCGCAAAGCTTCTAAAAGACGACAGCATAGACAACAAAGTACTAACGCG  AAGCGACAAAACCGAGGGAAAAGCGACAACGTACCGAGCGAAGAAGTAGT  AAAAAAAATGAAAACTACTGGCGACAACCTAAACGCGAAAATAATAAC  GCAACGAAAATTCGACAACCTAACGAAAAGCGGAACGAGGGGGGCTAAGCGA  ACTAGACAAAAGCGGGTTTATAAAAACGACAACCTAGTAGAAAACGGCAAAAT  AACGAAACACGTAGCGCAAATACTAGACAGCCGAATGAACACGAAATACGA  CGAAAACGACAACTAATACGAGAAGTAAAAGTAATAACGCTAAAAGCAA  ACTAGTAAGCGACTTCCGAAAAGACTTCCAATTCTACAAAGTACGAGAAAT  AAACAACCTACCACCGCGCAGCAGCGGTACCTAAACGCGGTAGTAGGGAC  GGCGCTAATAAAAAAATACCCGAAACTAGAAAAGCGAATTCGTATACGGGGA  CTACAAAGTATACGACGTACGAAAATGATAGCGAAAAGCGAACAAGAAT  AGGGAAGCGACGCGGAAATACTTCTTCTACAGCAACATAATGAACTTCTT  CAAAACGGAATAACGCTAGCGAACGGGAAATACGAAAACGACCGCTAAT  AGAAACGAACGGGGAAACGGGGAAATAGTATGGGACAAAGGGCGAGACTT  CGCGACGGTACGAAAAGTACTAAGCATGCCGCAAGTAAACATAGTAAAAAA  AACGGAAGTACAAACGGGGGGTTCAGCAAAGAAAGCATACTACCGAAACG  AAACAGCGACAACTAATAGCGCGAAAAAAGACTGGGACCCGAAAAAATA  CGGGGGTTTCGACAGCCCGACGGTAGCGTACAGCGTACTAGTAGTAGCGAA  AGTAGAAAAGGGAAAAGCAAAAACTAAAAAGCGTAAAAGAACTACTAGG  GATAACGATAATGGAACGAAGCAGCTTCGAAAAAACCAGATAGACTTCTT  AGAAAGCGAAAGGTTACAAAGAAGTAAAAAAGACCTAATAATAAACTACC  GAAATACAGCCTATTTCGAAGTAGAAAACGGGGAAAACGAATGCTAGCGAG  CGCGGGGAACTACAAAAGGGAAACGAACTAGCGCTACCGAGCAAAATACGT  AAACTTCTTATACCTAGCGAGCCACTACGAAAACTAAAAGGGAGCCCGGA  AGACAACGAACAAAACACTATTTCGTAGAACAACACAAACACTACCTAGA  CGAAATAATAGAACAAATAAGCGAATTCAGCAAACGAGTAATACTAGCGGA  CGCGAACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGTACAACAAACACCGAGACAAACC  GATACGAGAACAAGCGGAAAACATAATACACCTATTTCAGCTAACGAACCT  AGGGGCGCCGGCGGCTTCAAATACTTCGACACGACGATAGACCGAAAACG  ATACACGAGCACGAAAGAAGTACTAGACCGCAGCCTAATAACACAAAGCAT  AACGGGGCTATACGAAACGCGAATAGACCTAAGCCAACCTAGGGGGGACGG  GGGGGGAGCCGAAAAAAGAAAGTATGACTAGCCATCACATTTAA  AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAATGAAGATCAATAG  CTTATTTCATCTCTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCTGTCTA  AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTCTCTGTGCTTCAATT  AATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Transcrito de Cas9 com AGG como primeiros três nucleotídeos para uso com CleanCap™, 5' UTR de HSD, ORF correspondente à SEQ ID NO: 204, sequência de Kozak e 3'</p>	<p>AGGTCCCGCAGTCCGGCTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGCTT  GCAGGCCATTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACT  GGACATCGGAACAACAGCGTCCGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAA  GGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGTCTTGGGAAACACAGACAGACACAGCAT  CAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGA  AGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAA  CAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGTTCGA  CGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAAGCTTCTTGGTCAAGAAGACAA  GAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGAAACATCGTCGACGAAGTTCGCATA  CCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAAGAAGCTGGTTCGACAG  CACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGAT  CAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAG  CGACGTTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTT  CGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTTCGACGCAAGGCAATCCTGAG  CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC  GGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGAAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG  ACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAGCT  GCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACA</p>	<p>256</p>

UTR de ALB	<p>GATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAAGAACCCTGAGCGA  CGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGC  ACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCT  GACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGA  AATCTTCTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGG  AGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT  GGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG  AAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGG  AGAATGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAA  GGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCCTACTA  CGTCGGACCCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAA  GAGCGAAGAAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTGCAAGGG  AGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGATGACAAACTTCGACAAGAACCT  GCCGAACGAAAAGGCTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC  AGTCTACAACGAACTGACAAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAA  GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTT  CAAGACAACAGAAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAA  GAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAAATCAGCGGAGTCGAAGACGATT  CAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA  GGACTTCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCT  GACTGACACTGTTGCAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC  ATACGCACACCTGTTGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAG  ATACACAGGATGGGAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACCGAATCAGAGA  CAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCTGAAGAGCGACGGATTTCG  AAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAGGA  AGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACA  CATCGCAAACTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC  AGTCAAGGTCGTGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGA  AAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAAGGACA  GAAGAACAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACT  GGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAA  CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGA  CCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGT  CCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAG  AAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCTGAGCGAAGAAAGACT  CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCAC  ACAGAGAAAAGTTCGACAACCTGACAAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGA  ACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAGACAGAT  CACAAAGCAGCTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAGTACGA  CGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAA  GCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAAT  CAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTGGAAC  AGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAAGCGAATTCGTCTACGGAGA  CTACAAGGTCACGACGTCAGAAAAGATGATCGCAAGAGCGAACAGGAAAT  CGGAAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCT  CAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAAGAGACCCTGAT  CGAAAACAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTT  CGCAACAGTCAGAAAAGGTCCTGAGCATGCCGACGGTCAACATCGTCAAGAA  GACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAG  AAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTA  CGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTGTGCGCAAA  GGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGG  AATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCTGATCGACTTCT  GGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC  GAAGTACAGCCTGTTGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG  CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGT  CAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGA  AGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTGTCGAAACAGCACAAGCACTACTCTGGA  CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTTCATCCTGCGAGA  CGCAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAACAAGCACAGAGACAAGCC  GATCAGAGAACAGGCGAAGAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCT</p>
------------	--

	<p>GGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAG  ATACACAAGCACAAAGGAAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCAT  CACAGGACTGTACGAAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGG  AGGAGGAAGCCCAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAA  AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAAATGAAGATCAATAG  CTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTA  AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTCGCCTCTTTCTCTGTGCTTCAATT  AATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Transcrito de  Cas9 com 5'  UTR de CMV,  ORF  correspondente  à SEQ ID NO:  204, sequência  de Kozak e 3'  UTR de ALB</p>	<p>GGGCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGA  CACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACCGGG  ATTCCCCTGCCAAGAGTACTCACCGTCTTGACACGGCCACCATGGACA  AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAACAGCGTCCGGATGGGCAG  TCATCACAGACGAATACAAGGTCCCAGCAAGAAGTCAAGGTCTGGGAA  ACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCCG  ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAA  GATACACAAGAAGAAGAACAAGAACTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCA  ACGAAATGGCAAAGTTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCT  TCCTGGTCAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACA  TCGTCGACGAAGTTCGATACACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGA  GAAAGAAGTGGTTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACC  TGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAG  ACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCC  AGACATACAACCAGCTGTTTCAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCCG  ACGCAAGGCAATCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAA  ACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACCGACTGTTTCGGAAACC  TGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACC  TGGCAGAAGACGCAAGACTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACC  TGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGACAGCTGTTTCCTGG  CAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCA  ACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACG  ACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGC  TGCCGAAAAGTACAAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACG  CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATCTACAAGTTCATCA  AGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGA  ACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAATTCGACAACGGAAAGCATCC  CGCACAGATCCACCTGGGAGAAGTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAG  ACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGA  CATTTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAT  TCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAAACAATCACACCGTGGAACTTCG  AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGA  CAAATTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGTCTGCCGAAGCACAGCC  TGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACG  TCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGG  CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAAACAGAAAAGTTCACAGTCAAGCAGC  TGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCA  GCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGC  TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGACAAACGAAAGAAAACGAAAGACA  TCCTGGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAATGA  TCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGA  AGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAAGC  TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC  TGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACG  ACAGCCTGACATTCAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGG  GAGACAGCCTGCACGAAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA  AGAAGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCA  TGGGAAGACACAAGCCGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAAC  AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAATCG  AAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTTCG  AAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACG  GAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACT</p>	257

	<p>ACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCG  ACAACAAGGTCTTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACG  TCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGC  TGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAG  AGAGAGGAGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGC  TGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCA  GAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGG  TCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT  TCTACAAGGTTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACC  TGAACGCAGTCGTCCGAAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAA  GCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCG  CAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACA  GCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAA  TCAGAAAGAGACCCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCT  GGGACAAGGGGAAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAGCATGCCGC  AGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGG  AAAGCATCCTGCCGAAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGG  ACTGGGACCCGAAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACA  GCGTCTGGTTCGTCCGAAAGGTGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGA  GCGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACAATCATGAAAAGAAGCAGCTTCGAAA  AGAACCCGATCGACTTCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGG  ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGAACTGGAAAACGGAA  GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGG  CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA  AGCTGAAGGGAAAGCCCGAAGACAAACGAAACAGAAGCAGCTGTTCTGTCGAA  AGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCA  AGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAGGTCTGAGCGCATACA  ACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC  TGTTCACTGACAAAACCTGGGAGCACCAGCAGCATCAAGTACTTCGACA  CAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTGGAGCAA  CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAATCGACCTGA  GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCT  AGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAA  AGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCTGGTGT  AAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTC  TTTTCTGTGCTCAATTAATAAAAAATGAAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Transcrito Cas9  com 5' UTR de  HBB, ORF  correspondente  à SEQ ID NO:  204, sequência  de Kozak e 3'  UTR de HBB</p>	<p>GGGACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAAACCTCAAACAGACA  CCGGATCTGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAA  CAAACAGCGTCGGATGGGAGTTCATCACAGACGAATACAAGTCCCGAGCA  AGAAGTTCAAGGTCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACC  TGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGAC  TGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCT  ACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGTTCGACGACAGCTTCT  TCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTTCGAAAGAAGACAAGAAGCACGAAA  GACACCCGATCTTCGAAACATCGTCGACGAAGTTCGCATACCACGAAAAGT  ACCCGACAATCTACCCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGACAGCACAGCAAGG  CAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAG  GACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACA  AGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACC  CGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGA  GCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGA  AGAACGGACTGTTTCGAAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGA  ACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCA  AGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACC  AGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGC  TGAGCGCATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCG  CAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACAGGACCTGACACTGCTGA  AGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTCG  ACCAGAGCAAGAACCGGATACGCAAGGATACATCGACGAGGAGGCAAGCCAGG  AAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAG</p>	258

<p> AAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAA  CATTGACAACGGAAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACG  CAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAAGACAACAGAG  AAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTGAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGC  TGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAAGAGCGAAGAAA  CAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCAC  AGAGCTTCATCGAAAAGATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAA  AGGTCTGCCGAAGCAGCAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG  AACTGACAAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAAGCCGGCATTCC  TGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAAACA  GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAAT  GCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCC  TGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGG  ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTGACACTGACAC  TGTTGGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAAGACTGAAGACATACGGACACC  TGTTGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGAT  GGGGAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCG  GAAAGCAATCCTGGACTTCTGAAGAGCGACGGATTTCGAAAACAGAAA  TCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGA  AGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAACACATCGCAAACC  TGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTTCG  TCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGAAAACATCGTCA  TCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCA  GAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGA  TCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGT  ACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGG  ACATCAACAGACTGAGCGACTACGACCTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCT  TCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGA  ACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCTCCGAGCGAAGAAGTCTCAAGAAGATGA  AGAAGTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGT  TCGACAACCTGACAAGGCGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGG  CAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCAGC  TCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAAGTACGACGAAAACGACA  AGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCG  ACTTCAGAAAAGGACTTCCAGTCTTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACC  ACCACGCACACAGCATACCTGAACGCACTCGTCGGAAACAGCACTGATCA  AGAAGTACCCGAAGCTGGAAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCT  ACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAA  CAGCAAAGTACTTCTTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAA  TCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAAACAAACG  GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCA  GAAAGTCTGAGCATGCCGAGGTCACATCGTCAAGAAGACAGAACTCC  AGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAGCATCCTGCCGAAAGAAACAGCGACA  AGCTGATCGCAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCG  ACAGCCGACAGTCGCATACAGCCTCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGG  GAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCA  TGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCAGATCGACTTCTGGAAGCAAAGG  GATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC  TGTTGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAC  TGCAGAAGGGAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGT  ACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAAC  AGAAGCAGCTGTTCTGTAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCG  AACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGG  ACAAGTCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAAC  AGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAAACCTGGGAGCACCGG  CAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAAGAGATACACAAGCA  CAAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGT  ACGAAAACAAGAATCGACTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCC  CGAAGAAGAAGAGAAAAGGCTAGCTAGCGCTCGCTTCTTGTGTCCAATT  TCTATTAAGGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTAAACTGGGGGATA  TTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTT  TCATTGCCTCGAG </p>
---

<p>Transcrito de Cas9 com 5' UTR de XBG, ORF correspondente à SEQ ID NO: 204, sequência de Kozak e 3' UTR de XBG</p>	<pre> GGGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCCGGATCTGCCACCATGGACA AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCCGGATGGGCAG TCATCACAGACGAATACAAGGTCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTCTCGGGAA ACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCG ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAA GATACACAAGAAGAAGAAGCAAGAAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCA ACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAAGAAAGCT TCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACA TCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGA GAAAGAAGCTGGTCGACGACAGCAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACC TGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAG ACCTGAACCCGGACACAGCAGCGACGTGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGCTC AGACATACAACCAGCTGTTTCAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTTCG ACGCAAAGGCAATCTTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAA ACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCCGAAACC TGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAATCTCAAGAGCAACTTCGACC TGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACC TGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTTGG CAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCA ACACAGAAATCACAAAGGCACCCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACG ACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGC TGCCGGAAAAGTACAAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACG CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATCTACAAGTTCATCA AGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGA ACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCC CGCACAGATCCACCTGGGAGAAGTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAG ACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGA CATTGAGAATCCCCTACTACGTCCGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGAT TCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCG AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGATGA CAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGCTCCTGCCGAAGCACGCC TGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACG TCACAGAAGGAATGAGAAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGG CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAAGTCCACAGTCAAGCAGC TGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCA GCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGC TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAAAGAAAACGAAAGACA TCCTGGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTTCGAAAGACAGAGAAATGA TCGAAGAAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGA AGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAGC TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTGCAAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACG ACAGCCTGACATTCAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGTCCAGCGGACAGG GAGACAGCCTGCACGAAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA AGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTGCTCGACGAACTGGTCAAGGTCA TGGGAAGACACAAGCCGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAAGCAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAATCG AAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTTCG AAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACTGCAGAAGC GAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACT ACGACGTCGACCACATCGTCCCAGAGCTTCTGAAAGGACGACAGCATCG ACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACG TCCCAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAAGTACTGGAGACAGCTGC TGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGC TGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCA GAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGG TCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT </pre>	259
--	---	-----

	<p>TCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACC  TGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAA  GCCAATTCGCTCTACCGAGACTACAAGGCTACGACGTCAGAAAAGATGATCG  CAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACA  GCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAA  TCAGAAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAATCGTCT  GGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAAGGTCCTGAGCATGCCGC  AGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTGAGCAAGG  AAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGG  ACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTGACAGCCCGACAGTCGCATACA  GCGTCTGGTTCGTCGAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAGCTGAAGA  GCGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTCGAAA  AGAACCCGATCGACTTCTTGGAAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGG  ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCAACTGGAAAACGGAA  GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAAACGAACTGG  CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA  AGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAAACGAACAGAAGCAGCTGTTCTGTCGAAC  AGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCA  AGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACA  ACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC  TGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATCAAGTACTTCGACA  CAACAATCGACAGAAAAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTGGACGCAA  CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAATCGACCTGA  GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAAAGGTCCT  AGCTAGCACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCTACATAAT  ACCAACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCCAAAATGTAGCCATTTCGTAT  CTGCTCCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCTCTCGAG</p>	
<p>Transcrito de  Cas9 com AGG  como três  primeiros  nucleotídeos  para uso com  CleanCap™, 5'  UTR de XBG,  ORF  correspondente  a SEQ ID NO:  204, sequência  de Kozak e 3'  UTR de XBG</p>	<p>AGGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCCGGATCTGCCACCATTGGACA  AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCCGGATGGGCAG  TCATCACAGACGAATACAAGGTCGCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAA  ACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCG  ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAA  GATACACAAGAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCA  ACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCT  TCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGAAAACA  TCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGA  GAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGCAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACC  TGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAG  ACCTGAACCCGGACAAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCC  AGACATAACAACCAGCTGTTTGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCG  ACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAA  ACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGAAAACC  TGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAATTCAGAGCAACTTCGACC  TGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACC  TGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGG  CAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCA  ACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACG  ACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGC  TGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACCAGGATACG  CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATCTACAAGTTCATCA  AGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAGAAGTCTGCTGTTCAAGCTGA  ACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAAGCATCC  CGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAG  ACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGA  CATTGAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGAT  TCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCTGGAACTTCG  AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGAAATGA  CAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCC  TGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAAGTACAAAAGGTCAGTACG  TCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGG</p>	260

	<p>CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGC  TGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCA  GCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGC  TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACA  TCCTGGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTTGAAGACAGAGAAATGA  TCGAAGAAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGA  AGCAGCTGAAGAGAGAAGATACACAGGATGGGAAGACTGAGCAGAAAAGC  TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC  TGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACG  ACAGCCTGACATTCAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGG  GAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCA  AGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCA  TGGGAAGACACAAGCCGGAACATCGTTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC  AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAAATCG  AAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCCGTCCG  AAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAAGC  GAAGAGACATGTACGTGACCGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACT  ACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCG  ACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAAGC  TCCCAGCGAAGAGTTCGTCAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGC  TGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAG  AGAGAGGAGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGC  TGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCA  GAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGG  TCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT  TCTACAAGGTCAGAGAAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACC  TGAACGACAGTTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAA  GCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCACGACGTCAGAAAAGATGATCG  CAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACA  GCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAAATCACACTGGCAAACGGAGAAA  TCAGAAAAGAGACCCTGATCGAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAAAATCGTCT  GGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAAGAAAGTCCCTGAGCATGCCCG  AGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGG  AAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAAGAGG  ACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTTCGCATACA  GCGTCTGGTTCGTCGAAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAGCTGAAGA  GCGTCAAGGAAGTCTGGGAATCACAATCATGGAAAAGAGCAGCTTCGAAA  AGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAGGATACAAGGAAGTCAAGAAGG  ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTGAAGTGGAAAACGGAA  GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAACGAACTGG  CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA  AGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTCGAAC  AGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCA  AGAGAGTCATCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACA  ACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC  TGTTCACTGACAAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACA  CAACAATCGACAGAAAAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTTCGACGCAA  CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAATCGACCTGA  GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTC  AGCTAGCACCCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCTACATAAT  ACCAACTTACACTTACAAAATGTTGTCCCCAAAATGTAGCCATTCTGAT  CTGCTCCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCTCTCGAG</p>	
<p>Transcrito de Cas9 com AGG como três primeiros nucleotídeos para uso com CleanCap™, 5' UTR de HSD,</p>	<p>AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT  GCAGGCCTTATTCCGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACT  GGACATCGGAACAAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAA  GGTCCCGAGCAAGAAGTTCAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCAT  CAAGAAGAACCCTGATCGGAGCACTGTGTTTCGACAGCGGAGAAAACAGCAGA  AGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAAGAA  CAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGA  CGACAGCTTCTTCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTTCGAAGAAGACAA</p>	261

<p>ORF correspondente à SEQ ID NO: 204, sequência de Kozak e 3' UTR de ALB</p>	<pre> CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGC TGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCA GCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGC TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACA TCCTGGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTTGAAGACAGAGAAATGA TCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGA AGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAAGC TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC TGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTTCATGCAGCTGATCCACGACG ACAGCCTGACATTCAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTACGCGGACAGG GAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA AGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTTCGACGAACTGGTCAAGGTC TGGGAAGACACAAGCCGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAAGCAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAATCG AAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTTCG AAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACG GAAGAGACATGTACGTTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACT ACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTTGAAGGACGACAGCATCG ACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAAGCAGAGGAAAGAGCGACAACG TCCCAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGC TGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGC TGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCAGTTCGACAGATCCTGGACAGCA GAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGG TCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT TCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACC TGAACGACAGTTCGTTCGAAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAA GCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCACGACGTCAGAAAAGATGATCG CAAAGAGCGAAGCAGGAAATCGGAAGGCAACAGCAAGTACTTCTTCTACA GCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAA TCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAAATCGTCT GGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAAGGTCCTGAGCATGCCGC AGGTCACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGG AAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGG ACTGGGACCCGAAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACA GCGTCTGGTTCGTTCGAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAGCTGAAGA GCGTCAAGGAAGTCTGGGAATCACAATCATGGAAAAGAAGCAGCTTCGAAA AGAACCCGATCGACTTCTTGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAA GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAACGAACTGG CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACTTGGCAAGCCACTACGAAA AGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAAACGAAACAGAGCAGCTGTTTCGTTCGAAC AGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCA AGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACA ACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC TGTTCACTGACAAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACA CAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTGGACGCAA CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAATCGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCT AGCTAGCACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGTACATAAT ACCAACTTACACTTACAAAATGTTGTCCCCCAAATGTAGCCATTTCGTAT CTGCTCCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCTCTCGAG </pre>	
--	--	--

	<p>GAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATA  CCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAAGAAGCTGGTCGCACAG  CACAGACAAGGCAGACTTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGAT  CAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAG  CGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTT  CGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAG  CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC  GGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG  ACTGACACCCGAACCTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCT  GCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACA  GATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGA  CGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGC  ACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACAGGACCT  GACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGA  AATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGG  AGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT  GGACGGAAACAGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG  AAAGCAGAGAACATTCGACAACGGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGG  AGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAA  GGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTA  CGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAA  GAGCGAAGAAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGG  AGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGATGACAAACTTCGACAAGAACCT  GCCGAACGAAAAGGTCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC  AGTCTACAACGAACTGACAAAAGGTCAAGTACGTACAGAGGAATGAGAAA  GCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTT  CAAGACAAAACAGAAAAGTTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAA  GAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT  CAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA  GGACTTCTGGACAACGAAAGAAAACGAAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCT  GACACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC  ATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAGAGAGAAG  ATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGGAATCAGAGA  CAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCTGAAGAGCGACGGATTGCG  AAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGA  AGACATCCAGAAGGCACAGGTGAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACA  CATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC  AGTCAAGGTGCTCGACGAACTGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGA  AAACATCGTTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAACACAGAAGGGACA  GAAGAACAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAAT  GGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTTCGAAAACACACAGCTGCAGAA  CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGA  CCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGT  CCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCTTGACAAG  AAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT  CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCAC  ACAGAGAAAAGTTCGACAACCTGACAAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGA  ACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAAACAAGACAGAT  CACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGA  CGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTTCATCACTGAAGAGCAA  GCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTTCAGAGAAAT  CAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCACTGCTCGGAAC  AGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGCTACGGGAGA  CTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAAGATGATCGCAAAGAGCGAAGCAAGAAAT  CGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTT  CAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT  CGAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTT  CGCAACAGTCAGAAAAGGTCTGAGCATGCCCGAGGTCAACATCGTCAAGAA  GACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAG  AAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAAGAAGGACTGGGACCCGAAAGAAGTA  CGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTTCGTCGAAA</p>	
--	---	--

	GGTCGAAAAGGGAAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGG AATCACAATCATGGAAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACC CGATCGACTTCT GGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC GAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAGAATGTGGCAAG CGCAGGAGAAGTGCAGAAGGGAAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGT CAACTTCTGTACTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGGA AGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGA CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGA CGCAAACCTGGACAAGGTCTGAGCGCATACAACAAGCAGAGACAAGCC GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACTGTTCCACTGACAAAACCT GGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAAGAG ATACACAAGCACAAAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCAT CACAGGACTGTACGAAAACAAGAATCGACTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGG AGGAGGAAGCCCGAAGAAGAGAGAAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTAA AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAAATGAAGATCAATAG CTTATTTCATCTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTGTCCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT AATAAAAAATGGAAAAGAACCTCGAG	
30/30/39 sequência poli-A	Não utilizado	262
sequência poli-A 100	AA AA	263
RNA guia único G209 direcionado ao gene TTR de camundongo	AAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC	264
ORF que codifica Neisseria meningitidis Cas9 usando códon mínimos de uridina, com códon de início e parada	ATGGCAGCATTCAAGCCGAACTCGATCAACTACATCTTGGGACTGGACATC GGAATCGCATCGGTCCGATGGGCAATGGTCGAAATCGACGAAGAAGAAAAC CCGATCAGACTGATCGACTGGGAGTCAAGTCTTCGAAAAGAGCAGAAGTC CCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCAAGATCGGTG AGAAGACTGACAAGAAGAAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTG CTGAAGAGAGAAGGAGTCTGCGAGGAGCAAACTTCGACGAAAACGGACTG ATCAAGTCTGCTGCCGAACACACCCGTGGCAGCTGAGAGCAGCAGCACTGGAC AGAAAGCTGACACCGCTGGAATGGTCCGAGTCTGCTGCACCTGATCAAG CACAGAGGATACCTGTGCGAGAGAAAAGAACGAAGGAGAAAACAGCAGACAAG GAACTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTGCAGGAAAACGCACACCGCACTGCAG ACAGGAGACTTCAGAACACCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAG GAATCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTCGCACACATTCTCG AGAAAAGGACCTGCAGGCAGAATGATCCTGCTGTTTCGAAAAGCAGAAGGAA TTCCGAAAACCCGCACGTCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTG CTGATGACACAGAGACCGGCACTGTGCGGAGACGCACTCCAGAAGATGCTG GGCACTGCACATTGCAACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAACACATAC ACAGCAGAAAGATTCTGCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTG GAACAGGGATCGGAAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACTGATG GACGAACCGTACAGAAAGTCAAGCTGACATACGCACAGGCAAGAAAGCTG CTGGGACTGGAAGACACAGCATTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGAC AACCGAGAAGCATCGACACTGATGGAATGAAGGCATACCACGCAATCTCG AGAGCACTGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAGTCCGCCGTGAACCTG TCGCCGAACTGCAGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACA GACGAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAATCCTG GAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTTCGTCCAGATCTCGCTG AAGCACTGAGAAGAATCGTCCCGCTGATGGAACAGGAAAAGAGATACGAC GAAGCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCCTACGGAAGAAGAACAACAGAA GAAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAAACCCGGTC GTCCTGAGAGCACTGTGCGAGGCAAGAAAGTTCATCAACGGAGTGTGAGA AGATACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAAGTCCGGA AAGTCGTTCAAGGACAGAAAAGGAATCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGA AAGGACAGAGAAAAGGCAGCAGCAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAATTC	265

	<p>GTCCGAGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAAACAG  CAGCACGGAAAGTGCCTGTACTCGGAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACTG  AACGAAAAGGGATACGTCGAAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACA  TGGGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCTTGGTCTGGGATCGGAAAACCGAG  AACAAAGGAAACCGACAGACCCGTACGAATACTTCAACGGAAAGGACAACCTCG  AGAGAATGGCAGGAATTCGAAGGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGA  TCGAAGAAGCAGAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGATTCAAG  GAAAGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGATTCTGTGCCAGTTC  GTCGCAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAGAGAGTCTTCGCA  TCGAACGGACAGATCACAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGACTGAGAAAAG  GTCAGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACTGGACGCACTCGTCGTCGCA  TGCTCGACAGTCGCAATGCAGCAGAAGATCACAAGATTCTCGTCAAGTCAAG  GAAATGAACGCATTTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAAACAGGAGAAGTC  CTGCACCAGAAGACACACTTCCCAGCAGCCGTGGGAATTCTTCGCACAGGAA  GTCATGATCAGAGTCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAA  GCAGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGCTGTCGTCG  AGACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTACACCCGCTGTTCTGTCGAGAGCA  CCGAACAGAAAAGATGTCGGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCA  AAGAGACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCTGAGAGTCCCCTGACACAGCTG  AAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAGAAAAGAGAACCGAAGCTG  TACGAAGCACTGAAGCAAGACTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAG  GCATTTCGAGAACCCTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACAGAACACAG  CAGGTCAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTC  AGAAACCACAACGGAAATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTC  TTCGAAAAGGGAGACAAGTACTACTTGGTCCCCTGATCTACTCGTGGCAGGTC  GCAAAGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCCAGGGAAAAGGACGAAGAA  GACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTTCAAGTCTCGCTGCACCCG  AACGACCTGGTTCGAAGTTCATCACAAGAAGGCAAGAATGTTCCGGTACTTC  GCATCGTGCACAGAGGAACAGGAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTG  GACCACAAGATCGGAAAGAACGGAAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACA  GCACTGTGCTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACCTGGGAAAAGGAAATCAGA  CCGTGCAGACTGAAGAAGAGACCGCCGGTTCAGATCCGGAAAAGAGAACAGCA  GACGGATCGGAATTCGAATCGCCGAAGAAGAAGAGAAGGTTCGAATGA</p>	
<p>ORF que  codifica  Neisseria  meningitidis  Cas9 usando  códons mínimos  de uridina (sem  códons de início  ou parada;  adequado para  inclusão na  sequência de  codificação das  proteínas de  fusão)</p>	<p>GCAGCATTCAAGCCGAACTCGATCAACTACATCCTGGGACTGGACATCGGA  ATCGCATCGGTTCGGATGGGCAATGGTTCGAAATCGACGAAGAAGAAAACCCG  ATCAGACTGATCGACTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTCCCG  AAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCAAGATCGGTTCAGA  AGACTGACAAGAAGAAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTG  AAGAGAGAAGGAGTCTTCAGGCAAGCAACTTCGACGAAAACCGGACTGATC  AAGTTCGCTGCCGAACACACCCGTGGCAGCTGAGAGCAGCAGCACTGGACAGA  AAGCTGACACCCGTGGAATGGTTCGGCAGTCTGCTGCACCTGATCAAGCAC  AGAGGATACCTGTCGAGAGAAAAGAACGAAGGAGAAAACAGCAGACAAGGAA  CTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTTCGAGGAAACGCACACGCACTGCAGACA  GGAGACTTCAGAACACCCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAGGAA  TCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTCGCACACATTCGAGAGA  AAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTTCGAAAAGCAGAAGGAATTC  GGAAACCCGCACGCTCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTG  ATGACACAGAGACCCGGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGCTGGGA  CACTGCACATTCGAACCCGGCAGAAACCGAAGGCAGCAAAGAACACATACACA  GCAGAAAGATTCTGCTGCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGAA  CAGGGATCGGAAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAAGAGCAACACTGATGGAC  GAACCGTACAGAAAGTTCGAAGCTGACATACGCACAGGCAAGAAAGCTGCTG  GGACTGGAAGACACAGCATTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAAC  GCAGAAGCATCGACACTGATGGAATGAAGGCATACCACGCAATCTCGAGA  GCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAGTCCGCCGCTGAACCTGTCTG  CCGAACTGCAGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCGTGTTCAGACAGAC  GAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAAATCCTGGAA  GCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTTCGTCAGATCTCGCTGAAG  GCACTGAGAAGAATCGTCCCCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAA  GCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAGAAGAACACAGAAGAA  AAGATCTACTGCGCCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAAACCCGGTTCGTC</p>	266

	<p>CTGAGAGCACTGTGCGAGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTCAGAAGA  TACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAAGTCGGAAAAG  TCGTTCAAGGACAGAAAAGGAAATCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAAAG  GACAGAGAAAAGGCAGCAGCAAAGTTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGTC  GGAGAACCAGAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAACAGCAG  CACGGAAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACTGAAC  GAAAAGGGATACGTCGAAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACATGG  GACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCTGGGATCGGAAAACAGAAC  AAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACTTCAACGGAAAGGACAACCTCGAGA  GAATGGCAGGAATTCGAAGGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCG  AAGAAGCAGAGAATCCTGCTGCAGAAAGTTCGACGAAGACGGATTCAAGGAA  AGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGATTCCGTGCCAGTTCGTC  GCAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAAGAGAGTCTTCGCATCG  AACGGACAGATCACAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGGTC  AGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACTGGACGCACTGTCGTCGCATGC  TCGACAGTCGCAATGCAGCAGAAAGATCACAAGATTCTGTCAGATACAGGAA  ATGAACGCATTTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAGAAGTCTTG  CACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTTGGAAATTCCTGCGACAGGAAGTC  ATGATCAGAGTCTTCGGAAGCCGGACGGAAAGCCGGAAATTCGAAGAGCA  GACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGCTGTCGTCGAGA  CCGGAAAGCAGTCCAGAAATACGTACACCCGCTGTTCTGTCGAGAGCACC  AACAGAAAAGATGTCGGGACAGGGACACATGGAACAGTCAAGTCGGCAAAG  AGACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCTGAGAGTCCCGCTGACACAGCTGAAG  CTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAGAAAAGAGAACCGAAGCTGTAC  GAAGCACTGAAGCAAGACTGGAAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCA  TTCGAGAACCCGTTCTACAAGTACGACAAGGCAAGGAAACAGAACACAGCAG  GTCGAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCAGAAAGACAGGAGTCTGGGTCAGA  AACCAACAACGGAAATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAAGTAGACGTCCTTC  GAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATCTACTCGTGGCAGGTCGCA  AAGGGAAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCTCCAGGGAAAGGACGAAGAGAC  TGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTCAAGTCTCGCTGCACCCGAAAC  GACCTGGTTCGAAGTCAATCACAAGAAGGCAAGAATGTCGGACTACTTCGCA  TCGTGCCACAGAGGAAACAGGAAACATCAACATCAGAATCCACAGCACTGGAC  CACAAGATCGGAAAGAACGGAAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGCA  CTGTGTTCCAGAAAGTACCAGATCGACGAACTGGGAAAGGAAATCAGACCG  TGCAGACTGAAGAAGAGACCCCGGTGAGATCCGGAAGAGAAACAGCAGAC  GGATCGGAATTCGAATCGCCGAAGAAGAAGAGAAAAGGTCGAA</p>	
<p>Transcrito  compreendendo  SEQ ID NO: 265  (codificando  Neisseria  meningitidis  Cas9)</p>	<p>GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGATCCGCCACCAT  GGCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATCAACTACATCCTGGGACTGGACATCGG  AATCGCATCGGTGGATGGGCAATGGTCCGAAATCGACGAAGAAGAAAACCC  GATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTCCC  GAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCAAGATCGGTCAG  AAGACTGACAAGAAGAAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCT  GAAGAGAGAAGGAGTCTGCGAGGCAGCAAACTTCGACGAAAACGGACTGAT  CAAGTCGCTGCCGAACACACCCGTTGGCAGCTGAGAGCAGCAGCATGGACAG  AAAGCTGACACCCGCTGGAATGGTCCGAGTCTGCTGACACTGATCAAGCA  CAGAGGATACCTGTCGAGAGAAAAGAACGAAGGAGAAAACAGCAGACAAGGA  ACTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTGCAGGAAACGCACACGCACTGCAGAC  AGGAGACTTCAGAACACCCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAGGA  ATCGGGACACATCAGAAAACAGAGATCGGACTACTCGCACACATTCCTCGAG  AAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTTCGAAAAGCAGAAGGAATT  CGGAAAACCCGCACGTCCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAAAACACTGCT  GATGACACAGAGACCGGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGCTGGG  ACACTGCACATTCGAACCCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAGAACACATACAC  AGCAGAAAAGATTCATCTGGCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGA  ACAGGGATCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAAGCAACACTGATGGA  CGAACCGTACAGAAAAGTCAAGCTGACATACGCACAGGCAAGAAGCTGCT  GGGACTGGAAGACACAGCATTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAA  CGCAGAAGCATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCAGCAATTCGAG  AGCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAGTCCCGCTGAACCTGTC  GCCGAACTGCAGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACAGA</p>	267

	<p>CGAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAAATCCTGGA  AGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTTCGTCCAGATCTCGCTGAA  GGCACTGAGAAGAAATCGTCCCCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGA  AGCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCCTACGGAAAGAAGAACACAGAAGA  AAAGATCTACCTGCCCGCATCCCGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTCTGT  CCTGAGAGCACTGTGCGAGGCAAGAAAGGTTCATCAACGGAGTGTGTCAGAA  ATACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAAGTTCGGAAA  GTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAA  GGACAGAGAAAAGGCAGCAGCAAAGTTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGT  CGGAGAACCAGTTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAACAGCA  GCACGGAAAGTGCCTGTACTCGGAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACTGAA  CGAAAAGGGATACGTGCAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACATG  GGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCTGGTCTGGGATCGGAAAACAGAAA  CAAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACTTCAACGGAAAGGACAACCTCGAG  AGAATGGCAGGAATTCAGGGCAAGAGTTCGAAACATCGAGATTCCTCGAGATC  GAAGAAGCAGAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGATTCAAGGA  AAGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGATTCTGTGCGAATTCGT  CGCAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGAAAGAAGAGAGTCTTCCGATC  GAACGGACAGATCACAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGGT  CAGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACTGGACGCAGTCTGTCGATG  CTCGACAGTTCGCAATGCAGCAGAAGATCACAAGATTCTGTCAGATACAAGGA  AATGAACGCATTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAGAAGTCTCT  GCACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATTTCTCGCAGAGGAGT  CATGATCAGAGTCTTCGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAAGC  AGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGTGTGTCGAG  ACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTACACCCGCTGTTCTGTCGAGAGCACC  GAACAGAAAGATGTCCGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCCGGCAA  GAGACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCTGAGAGTCCCGCTGACACAGCTGAA  GCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAGAAAAGAGAACCAGGATGTA  CGAAGCACTGAAGGCAAGACTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGC  ATTTCGAGAACCCTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCA  GGTCAAGGCAGTTCAGAGTTCGAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTGAG  AAACCACAACCGGAATCGCAGACAACGCAACAATGGTTCAGAGTAGACGTCTT  CGAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATCTACTCTGTCGAGGTCGC  AAAGGGAATCCTGCCGACAGAGCAGTCTGTCAGGGAAAGGACGAAGAAGA  CTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGCACCCGAA  CGACCTGGTTCGAAGTCATCACAAGAAGGCAAGAATGTTCCGATACTTCCG  ATCGTGCCACAGAGGAACAGGAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGA  CCACAAGATCGGAAAGAACCGGAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGC  ACTGTCGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACTGGGAAAGGAAATCAGACC  GTGCAGACTGAAGAAGAGACCCCGGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCAGA  CGGATCGGAATTCGAATCGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTTCGAATGATAGCT  AGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGC  CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGA  CCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGCTCTTCTTAATAAAAATGAGGAAATTG  CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGC  AGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG  CGGTGGCTCTATGG</p>	
<p>Sequência de aminoácidos de Neisseria meningitidis Cas9</p>	<p>MAAFKPNINSINYILGLDIGIASVGMAMVEIDEENPIRLIDLGVRFERA  PKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRAHRLRLRRLKREGVLQANFDENGL  IKSLPNTFWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYSQRKNEGETADK  ELGALLKGVAGNAHALQTGDFRTPAELALNKFESGHIRNQSDYSHTFS  RKDLQAEILLLFEKQKREFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKML  GHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTCLNLRILEQGSERPLDTERATLM  DEPYRKSCLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAIS  RALEKEGLKDKKSPINLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRDKDRIQPEIL  EALLKHISFDKQVQISLALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTE  EKIYLPPIPADEIRNPVLRALSQARKVINGVRRYGSPPARIHIETAREVG  KSPKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNPFVGEPKSKDILKRLRYEQ  QHGKCLYSGKEINLGRLEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQ  NKGNTQPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPKSKQRILLQKDFEDGFK</p>	268

	ERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGGKRVFASNGQITNLLRGFWGLRK VRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEV LHQKTHFPQPWEFFAQEVMIKRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLAEKLS RPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSARKLDEGVSVLRVPLTQL KLDLEKMNRREREKPLYEALKARLEAHKDDPAKAFAPFYKYDKAGNRTQ QVKAVRVEQVQKTGVVVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKEYLVPIYSWQV AKGILPDRAVVQKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFQYF ASCHRGFTGNINIRIHDLHDKIGKNGILEGIGVKTALSFOKYQIDELGKEIR FCRLKKRPPVRSKRTADGSEFEFSPKKRKRVE	
RNA guia único G390 drecionado ao gene TTR de rato	mG*mC*mC*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	269
trRNA	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	270
	Não Usado	271
RNA guia único G534 drecionado ao gene TTR de rato	mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	272
G000395 sequência modificada de sgRNA inativo truncado 5'	mG*mC*mA*AUGGUGUAGCGGGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	273
SV40 NLS	PKKKRKV	274
SV40 NLS alternativo	PKKKRRV	275
Nucleoplasmina NLS	KRPAATKKAGQAKKKK	276
Sequência de Kozak exemplificativa	gccRccAUGG	277
Sequência de Kozak exemplificativa	gccgccRccAUGG	278

\* = Ligação PS; 'm' = nucleotídeo 2'-O-Me

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para induzir uma quebra de fita dupla (DSB) dentro do gene *TTR*, caracterizado pelo fato de que compreende distribuir uma composição a uma célula, em que a composição compreende

a. um RNA guia compreendendo uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;

b. um RNA guia compreendendo pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou

c. um RNA guia compreendendo uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82.

2. Método para modificar o gene *TTR*, caracterizado pelo fato de que compreende distribuir uma composição a uma célula, em que a composição compreende (i) um agente de ligação a DNA guiado por RNA ou um ácido nucleico que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA e (ii) um RNA guia compreendendo:

a. uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;

b. pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou

c. uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82.

3. Método para tratar a amiloidose associada a *TTR* (ATTR), caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma composição a um sujeito em necessidade do mesmo, em que a composição compreende (i) um agente de ligação a DNA guiado por RNA ou um ácido nucleico que codifica um agente de ligação a DNA

guiado por RNA e (ii) um RNA guia compreendendo:

- a. uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;
- b. pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou
- c. uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82, tratando assim ATTR.

4. Método para reduzir a concentração sérica de TTR, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma composição a um sujeito em necessidade do mesmo, em que a composição compreende (i) um agente de ligação a DNA guiado por RNA ou um ácido nucleico que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA e (ii) um RNA guia compreendendo:

- a. uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;
- b. pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou
- c. uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82, reduzindo assim a concentração sérica de TTR.

5. Método para reduzir ou impedir o acúmulo de amiloides ou fibrilas amiloides compreendendo TTR em um sujeito, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma composição a um sujeito em necessidade do mesmo, em que a composição compreende (i) um agente de ligação a DNA guiado por RNA ou um ácido nucleico que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA e (ii) um RNA guia compreendendo:

a. uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;

b. pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou

c. uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82,

reduzindo assim a acumulação de amiloides ou fibrilas amiloides.

6. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um RNA guia compreendendo:

a. uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;

b. pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou

c. uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82,

7. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um vetor que codifica um RNA guia, em que o RNA guia compreende:

a. uma sequência guia selecionada de SEQ ID NOs: 5-82;

b. pelo menos 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos contíguos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82; ou

c. uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que é para uso na indução de uma quebra de fita dupla (DSB) dentro do gene *TTR* em uma célula ou sujeito.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que é para uso na modificação do gene *TTR* em uma célula ou sujeito.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de amiloidose associada a *TTR* (*ATTR*) em um sujeito.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que é para uso na redução da concentração sérica de *TTR* em um sujeito.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que é para uso na redução ou prevenção do acúmulo de amiloides ou fibrilas amiloides em um sujeito.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, caracterizado pelo fato de que a composição reduz os níveis séricos de *TTR*.

14. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que os níveis séricos de *TTR* são reduzidos em pelo menos 50% em comparação com os níveis séricos de *TTR* antes da administração da composição.

15. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que os níveis séricos de *TTR* são reduzidos em 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-95%, 95-98%, 98-99% ou 99-100% em comparação com os níveis séricos de *TTR* antes da administração da composição.

16. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 15, caracterizado pelo fato de que a composição resulta na edição do gene *TTR*.

17. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a edição é calculada

como uma porcentagem da população que é editada (porcentagem de edição).

18. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a porcentagem de edição está entre 30 e 99% da população.

19. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a porcentagem de edição está entre 30 e 35%, 35 e 40%, 40 e 45%, 45 e 50%, 50 e 55%, 55 e 60%, 60 e 65%, 65 e 70%, 70 e 75%, 75 e 80%, 80 e 85%, 85 e 90%, 90 e 95% ou 95 e 99% da população.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, ou composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 19, caracterizado pelo fato de que a composição reduz a deposição de amiloide em pelo menos um tecido.

21. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que pelo menos um tecido compreende um ou mais de estômago, cólon, nervo ciático ou gânglio da raiz dorsal.

22. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 20 ou 21, caracterizado pelo fato de que a deposição de amiloide é medida 8 semanas após a administração da composição.

23. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22, caracterizado pelo fato de que a deposição de amiloide é comparada a um controle negativo ou a um nível medido antes da administração da composição.

24. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 23, caracterizado pelo fato de que a deposição de amiloide é medida em uma amostra de biópsia e/ou por imunocoloração.

25. Método ou composição para uso, de acordo com

qualquer uma das reivindicações 20 a 24, caracterizado pelo fato de que a deposição de amiloide é reduzida entre 30 e 35%, 35 e 40%, 40 e 45%, 45 e 50%, 50 e 55%, 55 e 60%, 60 e 65%, 65 e 70%, 70 e 75%, 75 e 80%, 80 e 85%, 85 e 90%, 90 e 95% ou 95 e 99% da deposição de amiloide vista de forma negativa ao controle.

26. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 25, caracterizado pelo fato de que a deposição de amiloide é reduzida entre 30 e 35%, 35 e 40%, 40 e 45%, 45 e 50%, 50 e 55%, 55 e 60 %, 60 e 65%, 65 e 70%, 70 e 75%, 75 e 80%, 80 e 85%, 85 e 90%, 90 e 95% ou 95 e 99% da deposição de amiloide observada antes da administração da composição.

27. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 26, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada ou distribuída pelo menos duas vezes.

28. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada ou distribuída pelo menos três vezes.

29. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada ou distribuída pelo menos quatro vezes.

30. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada ou distribuída até cinco, seis, sete, oito, nove ou dez vezes.

31. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 30, caracterizado pelo fato de que a administração ou a distribuição ocorre em um intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 dias.

32. Método ou composição para uso, de acordo com

qualquer uma das reivindicações 27 a 30, caracterizado pelo fato de que a administração ou a distribuição ocorre em um intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 semanas.

33. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 30, caracterizado pelo fato de que a administração ou a distribuição ocorre em um intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 meses.

34. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a sequência guia é selecionada de SEQ ID NOs: 5-82.

35. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o RNA guia é pelo menos parcialmente complementar a uma sequência-alvo presente no gene *TTR* humano.

36. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a sequência-alvo está no éxon 1, 2, 3 ou 4 do gene *TTR* humano.

37. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a sequência-alvo está no éxon 1 do gene *TTR* humano.

38. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a sequência-alvo está no éxon 2 do gene *TTR* humano.

39. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a sequência-alvo está no éxon 3 do gene *TTR* humano.

40. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a sequência-alvo está no éxon 4 do gene *TTR* humano.

41. Método ou composição, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 40, caracterizado pelo fato de que a sequência guia é complementar a uma sequência-alvo na fita positiva de *TTR*.

42. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, caracterizado pelo fato de que a sequência guia é complementar a uma sequência-alvo na fita negativa de *TTR*.

43. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, caracterizado pelo fato de que a primeira sequência guia é complementar a uma primeira sequência-alvo na fita positiva do gene *TTR* e em que a composição compreende ainda uma segunda sequência guia que é complementar a uma segunda sequência-alvo na fita negativa do gene *TTR*.

44. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o RNA guia compreende um crRNA que compreende a sequência guia e compreende ainda uma sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 126, em que os nucleotídeos da SEQ ID NO: 126 seguem a sequência guia na sua extremidade 3'.

45. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o RNA guia é um guia duplo (dgRNA).

46. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que o RNA guia duplo compreende um crRNA compreendendo uma sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 126, em que os nucleotídeos da SEQ ID NO: 126 seguem a sequência guia na sua extremidade 3' e um trRNA.

47. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 43, caracterizado pelo fato de que o RNA guia é um guia único (sgRNA).

48. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende uma sequência guia que tem o padrão de SEQ ID NO: 3.

49. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende a sequência da SEQ ID NO: 3.

50. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 48 ou 49, caracterizado pelo fato de que cada N na SEQ ID NO: 3 é qualquer nucleotídeo natural ou não natural, em que os N formam a sequência guia e a sequência guia direciona Cas9 ao gene *TTR*.

51. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 50, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende qualquer uma das sequências guia das SEQ ID NOs: 5-82 e os nucleotídeos da SEQ ID NO: 126.

52. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 51, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende uma sequência guia que é pelo menos 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% ou 90% idêntica a uma sequência selecionada de SEQ ID Nos: 87-124.

53. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o sgRNA compreende uma sequência selecionada de SEQ ID Nos: 87-124.

54. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o RNA guia compreende pelo menos uma modificação.

55. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma modificação inclui um nucleotídeo modificado em 2'-O-metil (2'-O-Me).

56. Método ou composição, de acordo com a

reivindicação 54 ou 55, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma modificação inclui uma ligação de fosforotioato (PS) entre nucleotídeos.

57. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 56, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma modificação inclui um nucleotídeo modificado em 2'-fluoro (2'-F).

58. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 57, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma modificação inclui uma modificação em um ou mais dos cinco primeiros nucleotídeos na extremidade 5'.

59. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 58, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma modificação inclui uma modificação em um ou mais dos últimos cinco nucleotídeos na extremidade 3'.

60. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 59, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma modificação inclui ligações PS entre os quatro primeiros nucleotídeos.

61. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 60, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma modificação inclui ligações PS entre os últimos quatro nucleotídeos.

62. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 61, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma modificação inclui nucleotídeos modificados em 2'-O-Me nos três primeiros nucleotídeos na extremidade 5'.

63. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 62, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma modificação inclui nucleotídeos modificados em 2'-O-Me

nos três últimos nucleotídeos na extremidade 3'.

64. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54 a 63, caracterizado pelo fato de que o RNA guia compreende os nucleotídeos modificados da SEQ ID NO: 3.

65. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 64, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um excipiente farmacologicamente aceitável.

66. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 65, caracterizado pelo fato de que o RNA guia está associado a uma nanopartícula lipídica (LNP).

67. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que o LNP compreende um lipídeo CCD.

68. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que o lipídeo CCD é o Lipídeo A ou o Lipídeo B.

69. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 66 a 68, caracterizado pelo fato de que o LNP compreende um lipídeo neutro.

70. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que o lipídeo neutro é DSPC.

71. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 66 a 70, caracterizado pelo fato de que o LNP compreende um lipídeo auxiliar.

72. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de que o lipídeo auxiliar é o colesterol.

73. Método ou composição, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 66 a 72, caracterizado pelo fato de que o LNP compreende um lipídeo furtivo.

74. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que o lipídeo furtivo é PEG2k-DMG.

75. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um agente de ligação a DNA guiado por RNA.

76. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um mRNA que codifica um agente de ligação a DNA guiado por RNA.

77. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 75 ou 76, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação a DNA guiado por RNA é uma Cas clivase.

78. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 77, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação a DNA guiado por RNA é Cas9.

79. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 75 a 78, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação a DNA guiado por RNA é modificado.

80. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 75 a 79, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação a DNA guiado por RNA é uma nickase.

81. Método ou composição, de acordo com a reivindicação 79 ou 80, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação ao DNA guiado por RNA modificado compreende um sinal de localização nuclear (NLS).

82. Método ou composição, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 75 a 81, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação a DNA guiado por RNA é um Cas de um sistema CRISPR / Cas Tipo II.

83. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a composição é uma formulação farmacêutica e compreende ainda um transportador farmacêuticamente aceitável.

84. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 83, caracterizado pelo fato de que a composição reduz ou previne amiloides ou fibrilas amiloides compreendendo *TTR*.

85. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que os amiloides ou fibrilas amiloides estão nos nervos, coração ou via gastrointestinal.

86. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 83, caracterizado pelo fato de que a união de extremidade não homóloga (NHEJ) leva a uma mutação durante o reparo de um DSB no gene *TTR*.

87. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que a NHEJ leva a uma exclusão ou inserção de um nucleotídeo(s) durante o reparo de um DSB no gene *TTR*.

88. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que a exclusão ou inserção de um nucleotídeo(s) induz uma mudança de quadro ou mutação sem sentido no gene *TTR*.

89. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que uma mudança de quadro ou mutação sem sentido é induzida no gene *TTR* de pelo menos 50% das células hepáticas.

90. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que uma mudança de quadro ou mutação sem sentido é induzida no gene *TTR* de 50% a 60%, 60% a 70%, 70% ou 80%, 80% a 90%, 90 a 95%, 95% a 99% ou 99% a 100% das células do fígado.

91. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 87 a 90, caracterizado pelo fato de que uma exclusão ou inserção de um nucleotídeo(s) ocorre no gene *TTR* pelo menos 50 vezes ou mais do que em sítios fora do alvo.

92. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que a exclusão ou inserção de um nucleotídeo ocorre no gene *TTR* de 50 a 150 vezes, 150 a 500 vezes, 500 a 1.500 vezes, 1.500 a 5.000 vezes, 5.000 a 15.000 vezes, 15.000 a 30.000 vezes ou 30.000 a 60.000 vezes mais do que em sítios fora do alvo.

93. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 87 a 92, caracterizado pelo fato de que a exclusão ou inserção de um nucleotídeo ocorre em menor ou igual a 3, 2, 1 ou 0 sítio(s) fora do alvo em hepatócitos humanos primários, opcionalmente em que o(s) sítio(s) fora do alvo(s) não ocorre(m) em uma região de codificação de proteínas no genoma dos hepatócitos humanos primários.

94. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que a exclusão ou inserção de um nucleotídeo(s) ocorre em vários sítios fora do alvo nos hepatócitos humanos primários que é menor que o número de sítios fora do alvo nos quais uma exclusão ou a inserção de um nucleotídeo(s) ocorre em células superexpressando Cas9, opcionalmente em que o(s) sítio(s) alvo(s) não ocorre(m) em uma região de codificação de proteínas no genoma dos hepatócitos humanos primários.

95. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que as células superexpressando Cas9 são células HEK293 que expressam estavelmente Cas9.

96. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 95, caracterizado pelo fato de que o número de sítios fora do alvo nos hepatócitos humanos primários é determinado pela análise do DNA genômico de hepatócitos humanos primários transfectados *in vitro* com mRNA de Cas9 e o RNA guia, opcionalmente em que o(s) sítio(s) alvo(s) não ocorre(m) em uma região de codificação de proteínas no genoma dos hepatócitos humanos primários.

97. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 95, caracterizado pelo fato de que o número de sítios fora do alvo nos hepatócitos humanos primários é determinado por um ensaio de inserção de oligonucleotídeo que compreende a análise de DNA genômico de hepatócitos humanos primários transfectados *in vitro* com mRNA de Cas9, RNA guia, e um oligonucleotídeo doador, opcionalmente em que o(s) sítio(s) alvo(s) não ocorre(m) em uma região de codificação de proteínas no genoma dos hepatócitos humanos primários.

98. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 43 ou 47 a 97, caracterizado pelo fato de que a sequência do RNA guia é:

- a) SEQ ID NO: 92 ou 104;
- b) SEQ ID NO: 87, 89, 96 ou 113;
- c) SEQ ID NO: 100, 102, 106, 111 ou 112; ou
- d) SEQ ID NO: 88, 90, 91, 93, 94, 95, 97, 101, 103, 108 ou

109,

opcionalmente, em que o RNA guia não produz indels em

sítios fora do alvo que ocorrem em uma região de codificação de proteínas no genoma de hepatócitos humanos primários.

99. Método ou composição para uso de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 98, caracterizado pelo fato de que a administração da composição reduz os níveis de TTR no sujeito.

100. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que os níveis de TTR são reduzidos em pelo menos 50%.

101. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que os níveis de TTR são reduzidos em 50% a 60%, 60% a 70%, 70% ou 80%, 80% a 90%, 90 a 95%, 95% a 99% ou 99% a 100%.

102. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 100 ou 101, caracterizado pelo fato de que os níveis de TTR são medidos no soro, plasma, sangue, fluido espinhal cerebral ou escarro.

103. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 100 ou 101, caracterizado pelo fato de que os níveis de TTR são medidos no fígado, plexo coroide e/ou retina.

104. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 103, caracterizado pelo fato de que os níveis de TTR são medidos por meio de ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA).

105. Método ou composição para uso, de acordo qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 104, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem ATTR.

106. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 105, caracterizado pelo fato de que o sujeito é humano.

107. Método ou composição para uso, de acordo com a

reivindicação 105 ou 106, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem ATTRwt.

108. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 105 ou 106, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem ATTR hereditário.

109. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, 8 a 106 ou 108, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem uma histórico familiar de ATTR.

110. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, 8 a 106 ou 108 a 109, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem polineuropatia amiloide familiar.

111. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 110, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem apenas ou predominantemente sintomas nervosos de ATTR.

112. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 110, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem cardiomiopatia amiloide familiar.

113. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, 8 a 109 ou 112, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem apenas ou predominantemente sintomas cardíacos de ATTR.

114. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 113, caracterizado pelo fato de que o sujeito expressa TTR com uma mutação V30.

115. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 114, caracterizado pelo fato de que a mutação V30 é V30A, V30G, V30L ou V30M.

116. Método ou composição para uso, de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 113, caracterizado pelo fato de que o sujeito expressa TTR com uma mutação T60.

117. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 116, caracterizado pelo fato de que a mutação T60 é T60A.

118. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 113, caracterizado pelo fato de que o sujeito expressa TTR com uma mutação V122.

119. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 118, caracterizado pelo fato de que a mutação V122 é V122A, V122I ou V122 (-).

120. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 119, caracterizado pelo fato de que o sujeito expressa TTR de tipo selvagem.

121. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, 8 a 107 ou 120, caracterizado pelo fato de que o sujeito não expressa TTR com uma mutação V30, T60 ou V122.

122. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, 8 a 107 ou 120 a 121, caracterizado pelo fato de que o sujeito não expressa TTR com uma mutação patológica.

123. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que o sujeito é homocigoto para TTR de tipo selvagem.

124. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 123, caracterizado pelo fato de que após a administração o sujeito apresenta uma melhora, estabilização ou lentidão da alteração nos sintomas da neuropatia sensório-motora.

125. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 124, caracterizado pelo fato de que a melhora, estabilização ou lentidão da mudança na neuropatia sensorial é medida usando eletromiograma, testes de condução nervosa ou resultados relatados pelo paciente.

126. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 125, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem uma melhora, estabilização ou lentidão da mudança nos sintomas de insuficiência cardíaca congestiva.

127. Método ou composição para uso, de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que a melhora, estabilização ou lentidão da mudança na insuficiência cardíaca congestiva é medida usando testes de biomarcadores cardíacos, testes de função pulmonar, radiografias de tórax ou eletrocardiografia.

128. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 127, caracterizado pelo fato de que a composição ou formulação farmacêutica é administrada via um vetor viral.

129. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 127, caracterizado pelo fato de que a composição ou formulação farmacêutica é administrada via nanopartículas lipídicas.

130. Método ou composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 8 a 129, caracterizado pelo fato de que o sujeito é testado para mutações específicas no gene *TTR* antes de administrar a composição ou formulação.

131. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 5.

132. Método ou composição, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 6.

133. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 7.

134. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 8.

135. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 9.

136. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 10.

137. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 11.

138. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 12.

139. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 13.

140. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 14.

141. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 15.

142. Método ou composição, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 16.

143. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 17.

144. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 18.

145. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 19.

146. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 20.

147. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 21.

148. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 22.

149. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 23.

150. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 24.

151. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 25.

152. Método ou composição, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 26.

153. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 27.

154. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 28.

155. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 29.

156. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 30.

157. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 31.

158. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 32.

159. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 33.

160. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 34.

161. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 35.

162. Método ou composição, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 36.

163. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 37.

164. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 38.

165. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 39.

166. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 40.

167. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 41.

168. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 42.

169. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 43.

170. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 44.

171. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 45.

172. Método ou composição, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 46.

173. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 47.

174. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 48.

175. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 49.

176. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 50.

177. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 51.

178. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 52.

179. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 53.

180. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 54.

181. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 55.

182. Método ou composição, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 56.

183. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 57.

184. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 58.

185. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 59.

186. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 60.

187. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 61.

188. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 62.

189. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 63.

190. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 64.

191. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 65.

192. Método ou composição, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 66.

193. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 67.

194. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 68.

195. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 69.

196. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 70.

197. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 71.

198. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 72.

199. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 73.

200. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 74.

201. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 75.

202. Método ou composição, de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 76.

203. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 77.

204. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 78.

205. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 79.

206. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 80.

207. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 81.

208. Método ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 130, caracterizado pelo fato de que a sequência selecionada de SEQ ID NOs: 5-82 é SEQ ID NO: 82.

209. Uso de uma composição ou formulação, como definida em qualquer uma das reivindicações 6 a 208, caracterizado pelo fato de que é para preparar um medicamento para tratamento de um sujeito humano que tem ATTR.

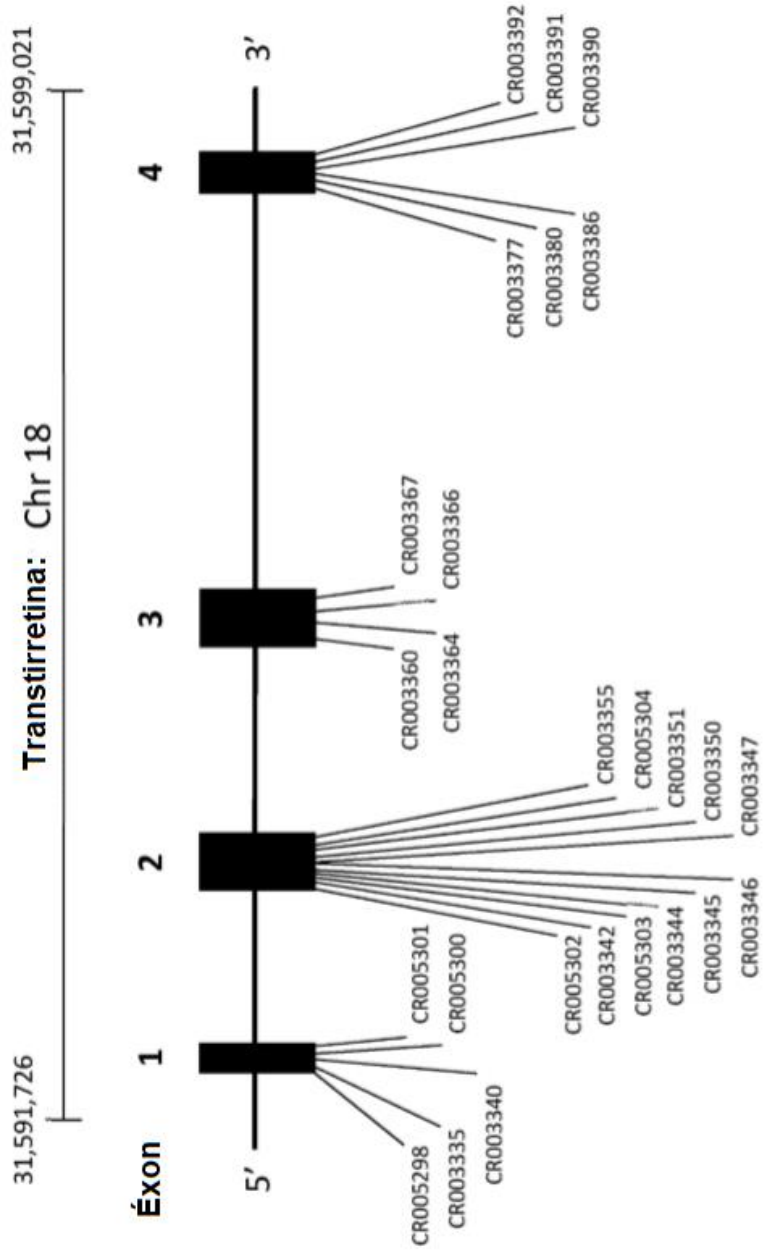


FIG. 1

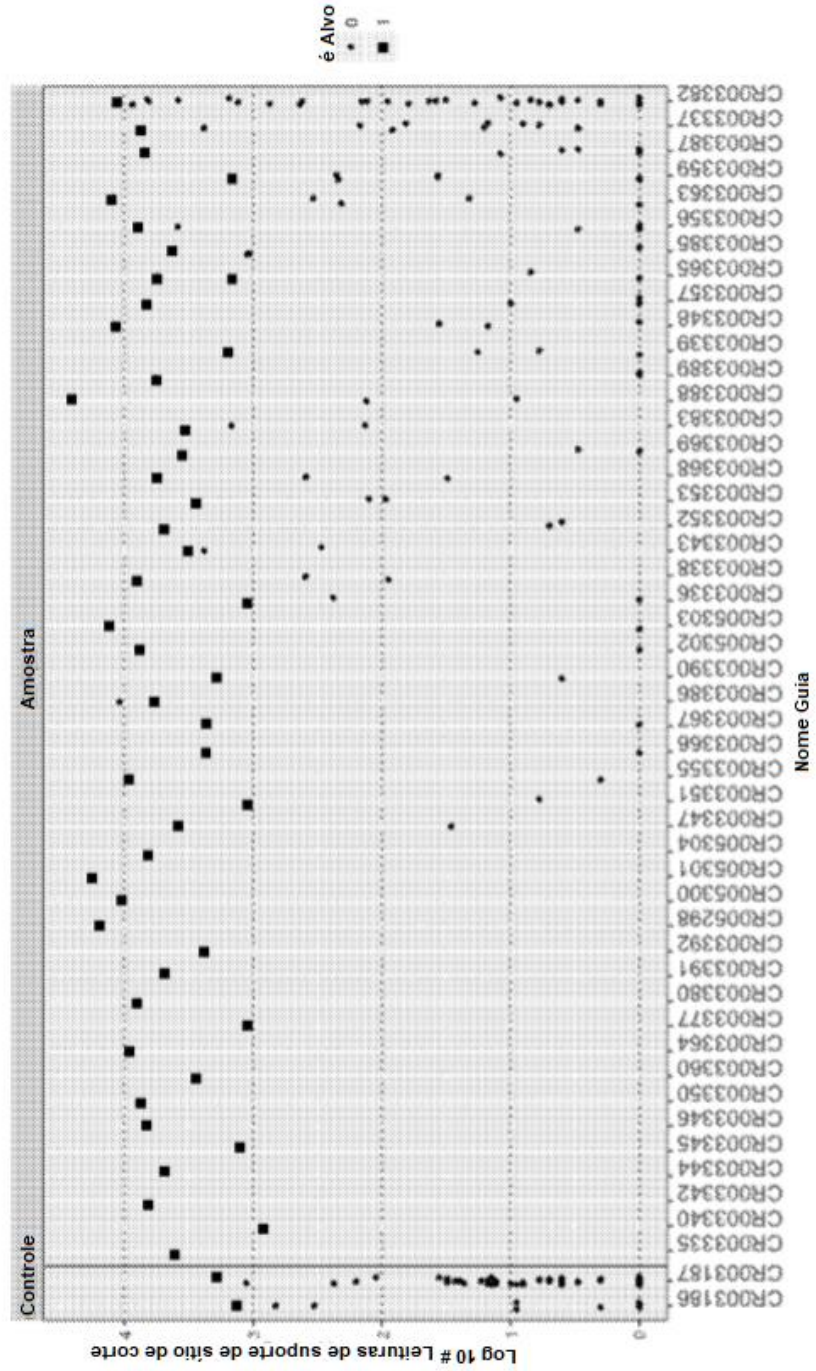


FIG. 2

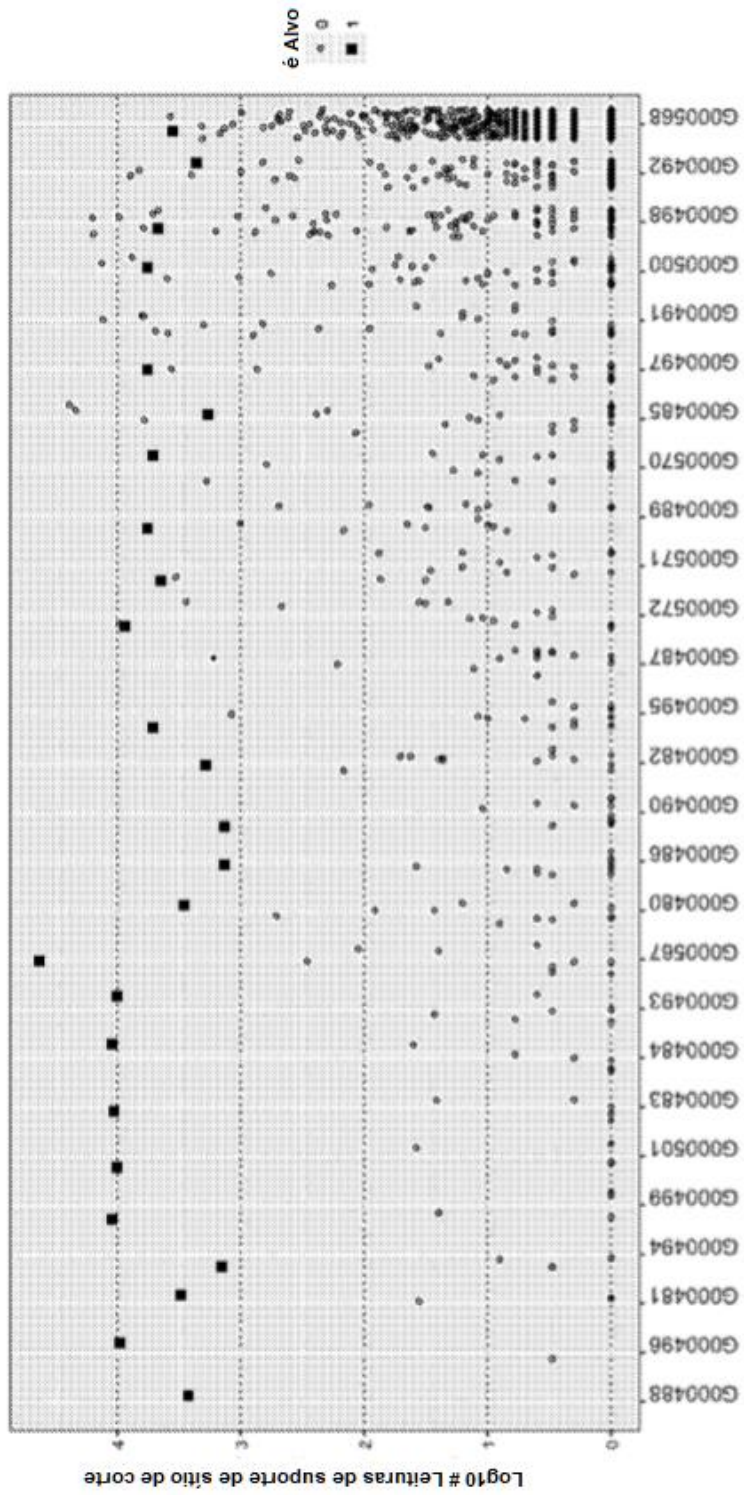


FIG. 3

Hepatócitos humanos primários TTR sgrNA  
DRC formulados por LNP

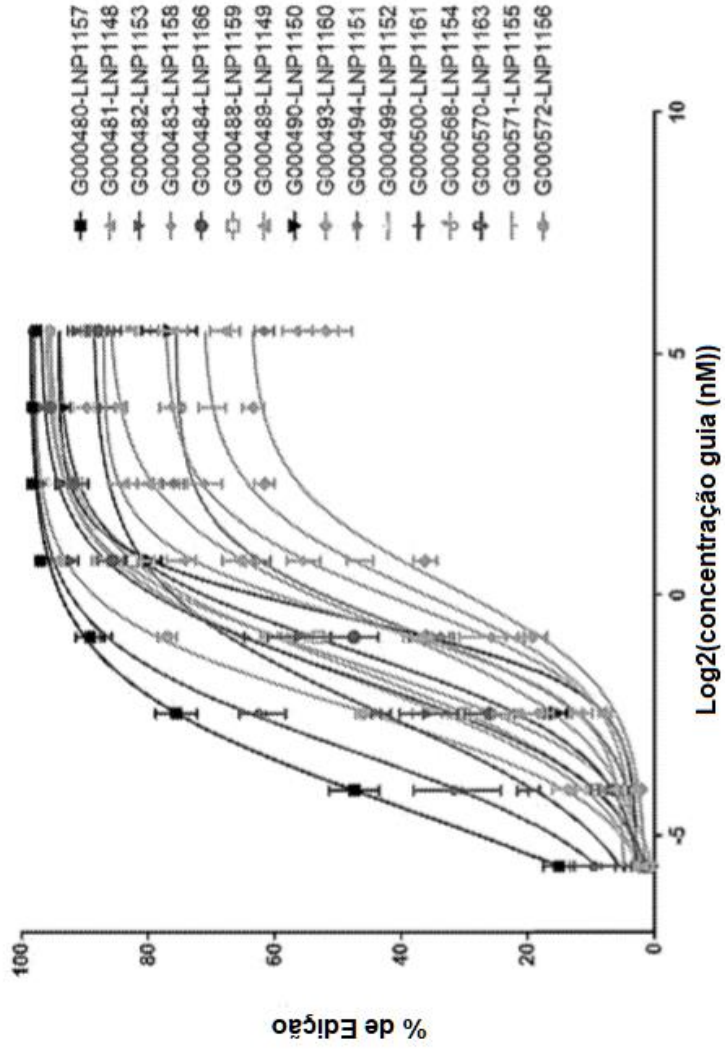


FIG. 4

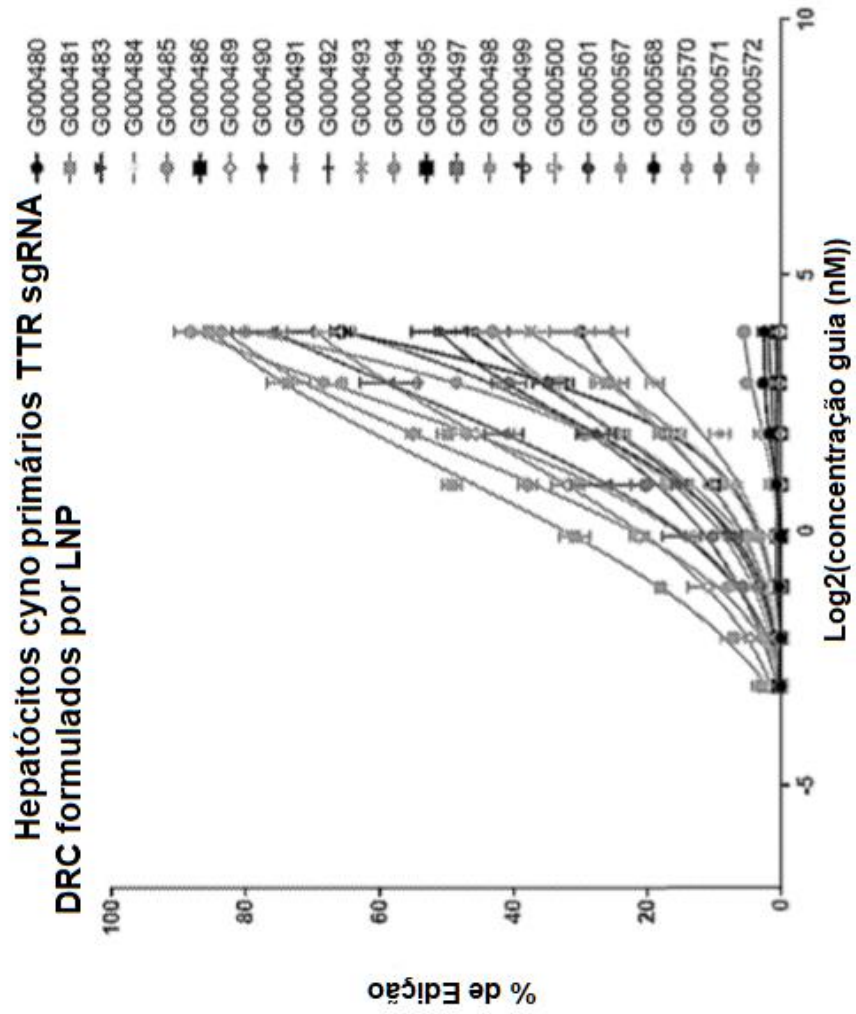


FIG. 5

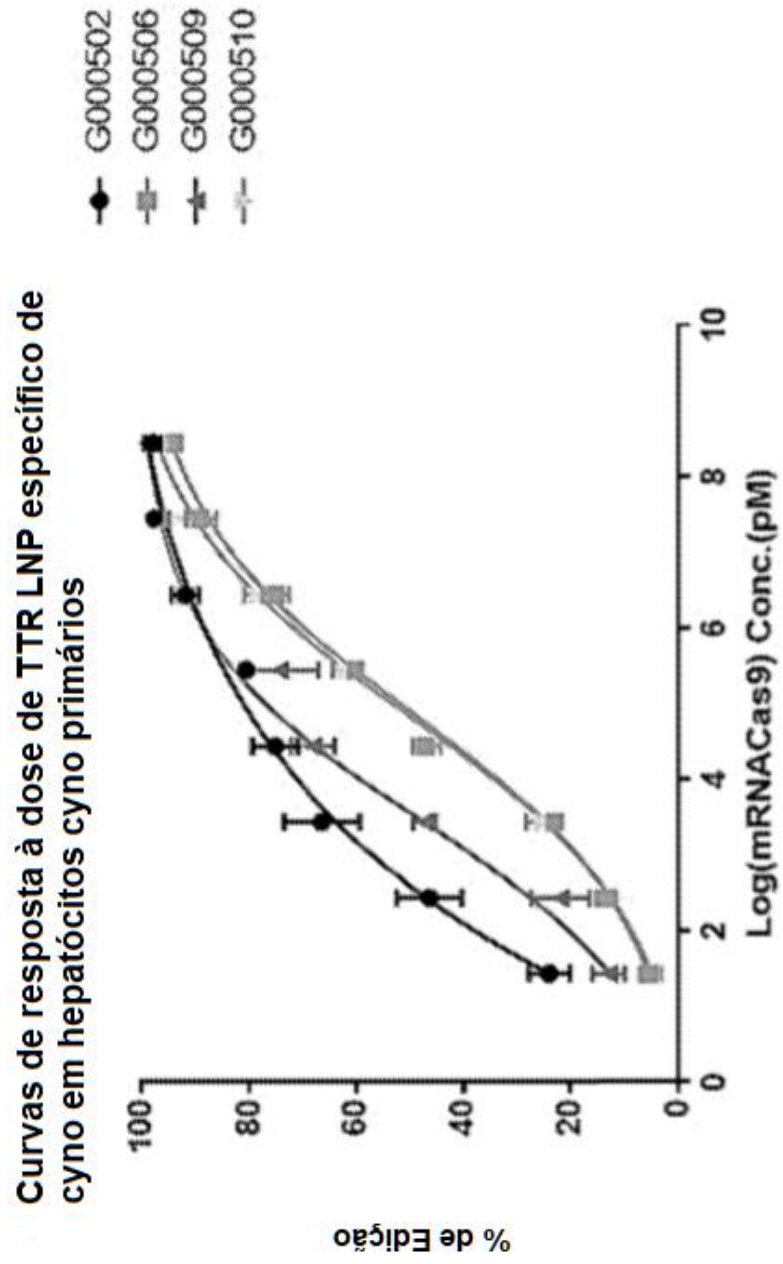


FIG. 6

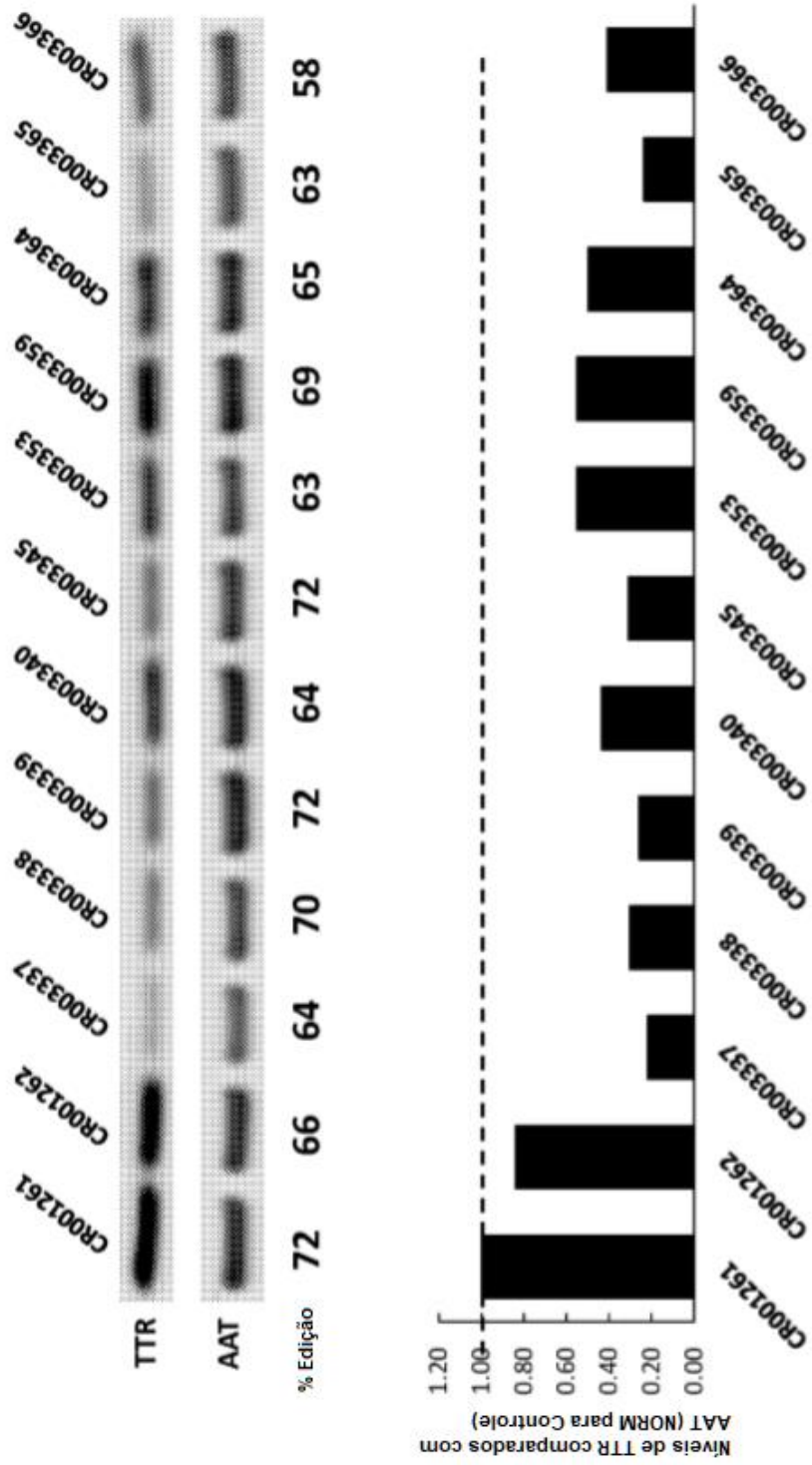


FIG. 7



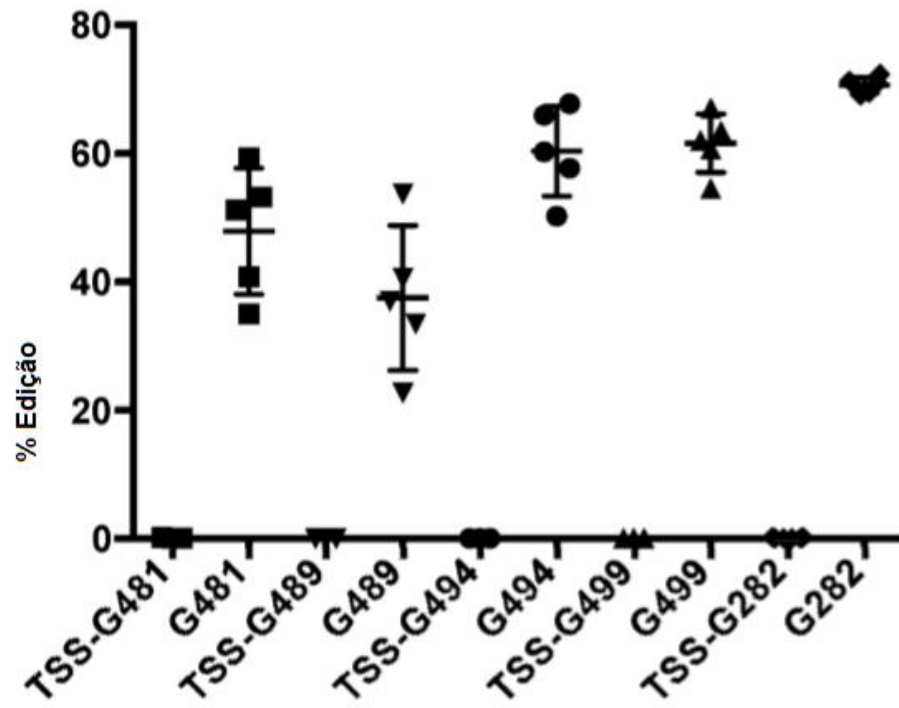


FIG. 9

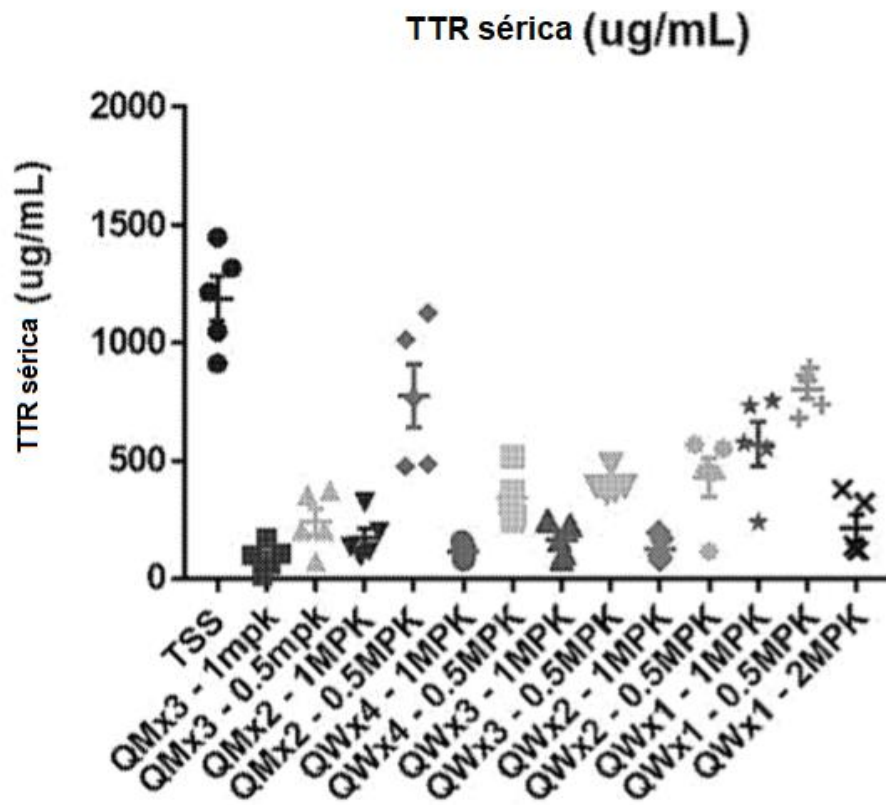


FIG. 10A

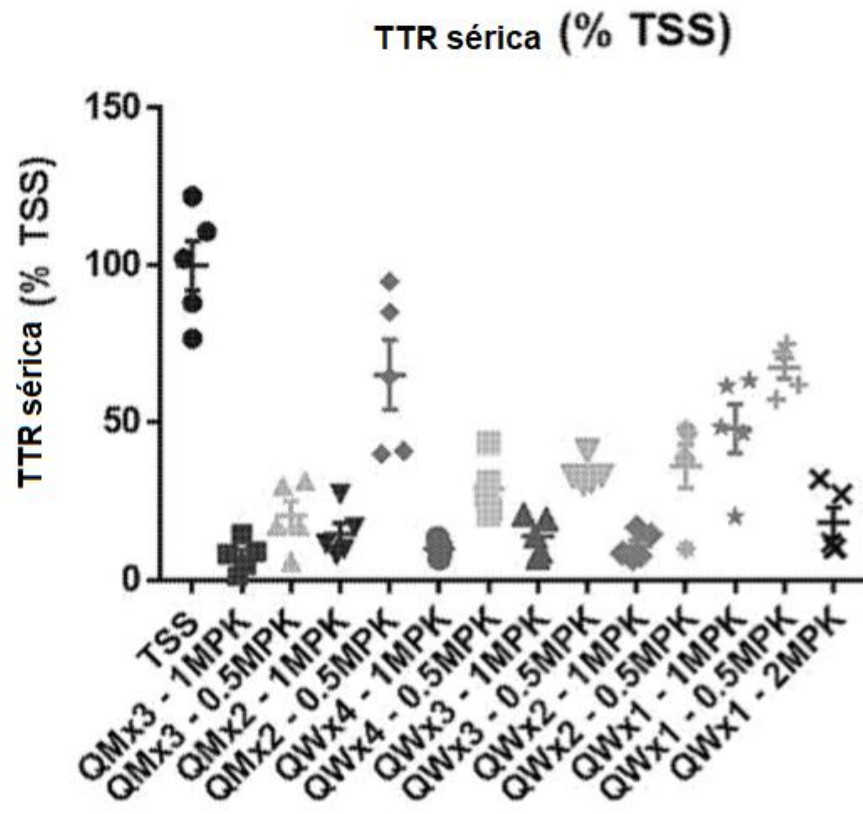


FIG. 10B

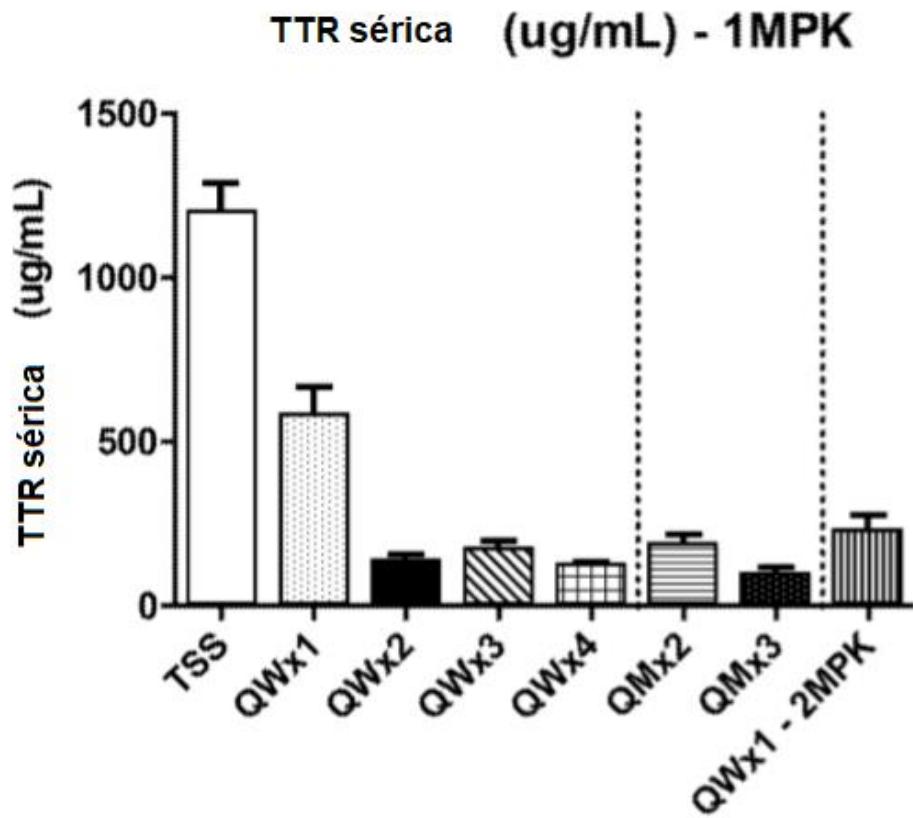


FIG. 11A

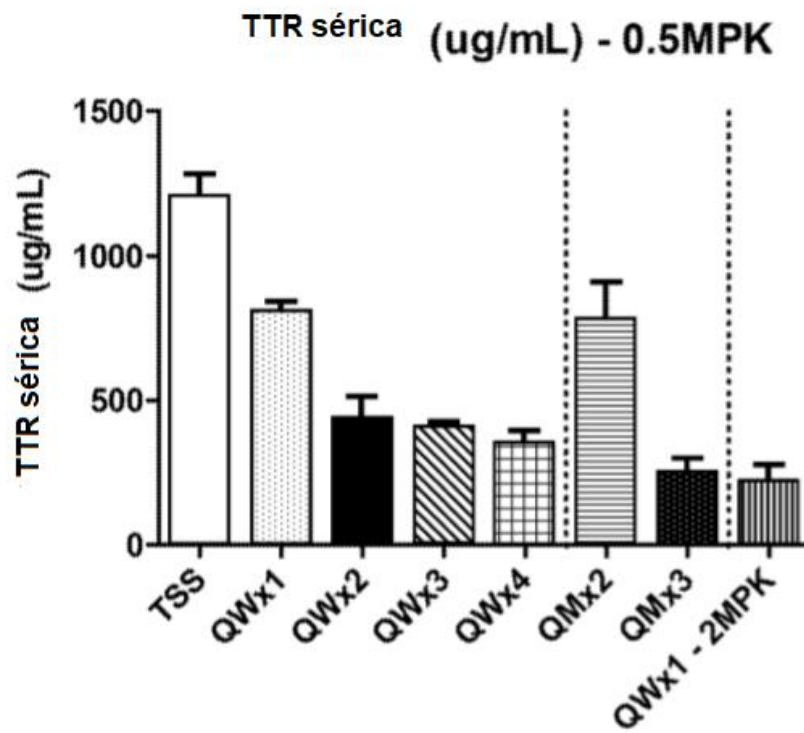


FIG. 11B

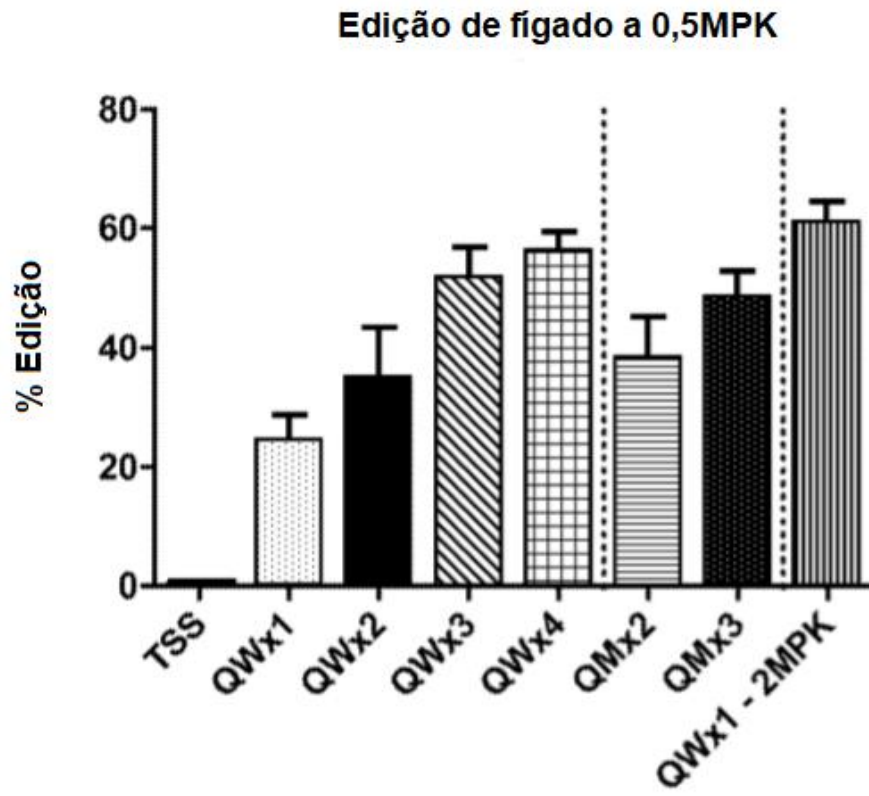


FIG. 12A

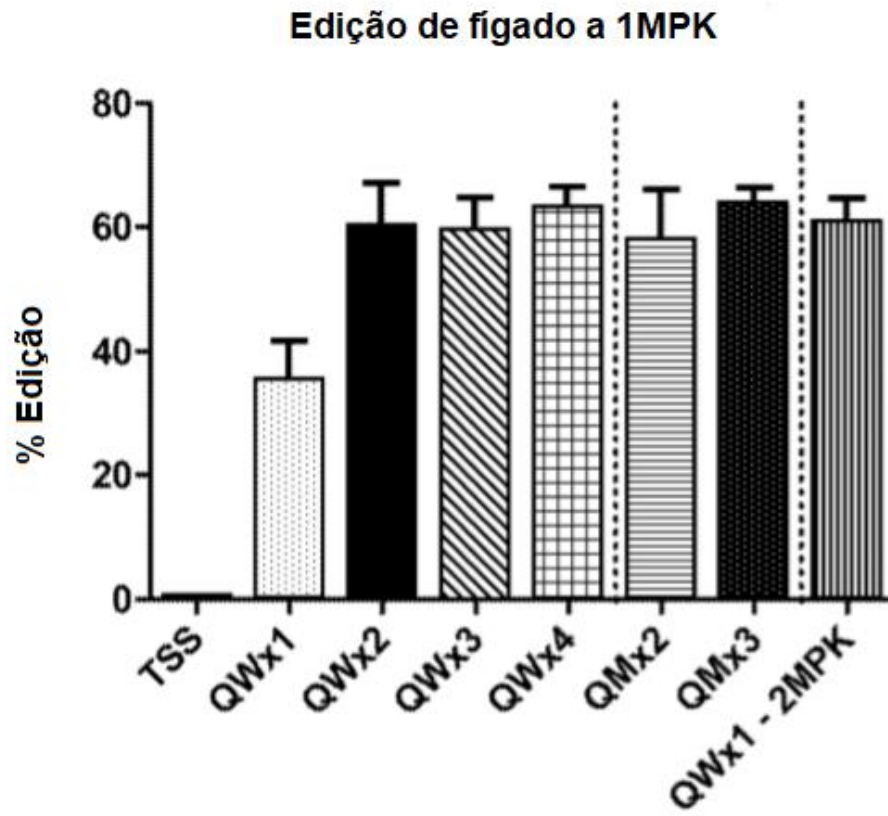


FIG. 12B

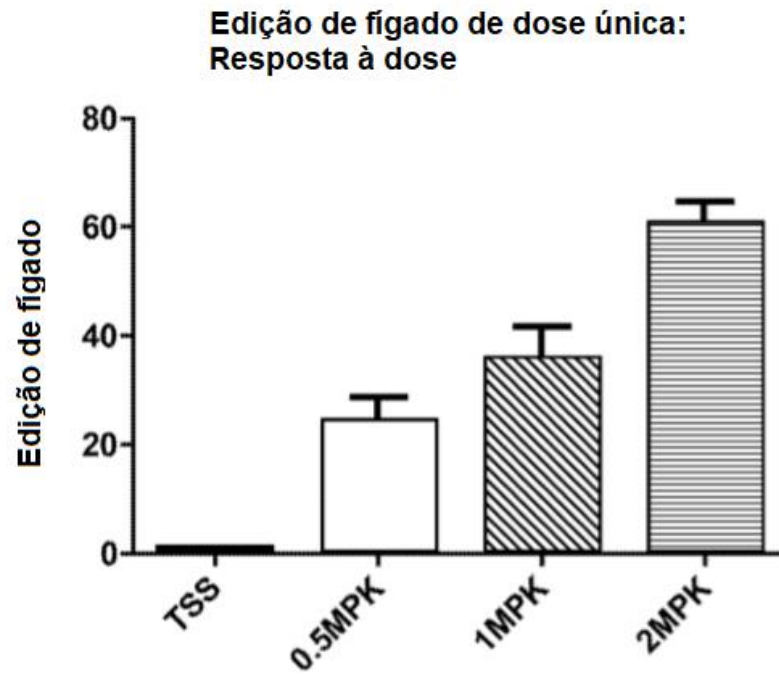


FIG. 12C

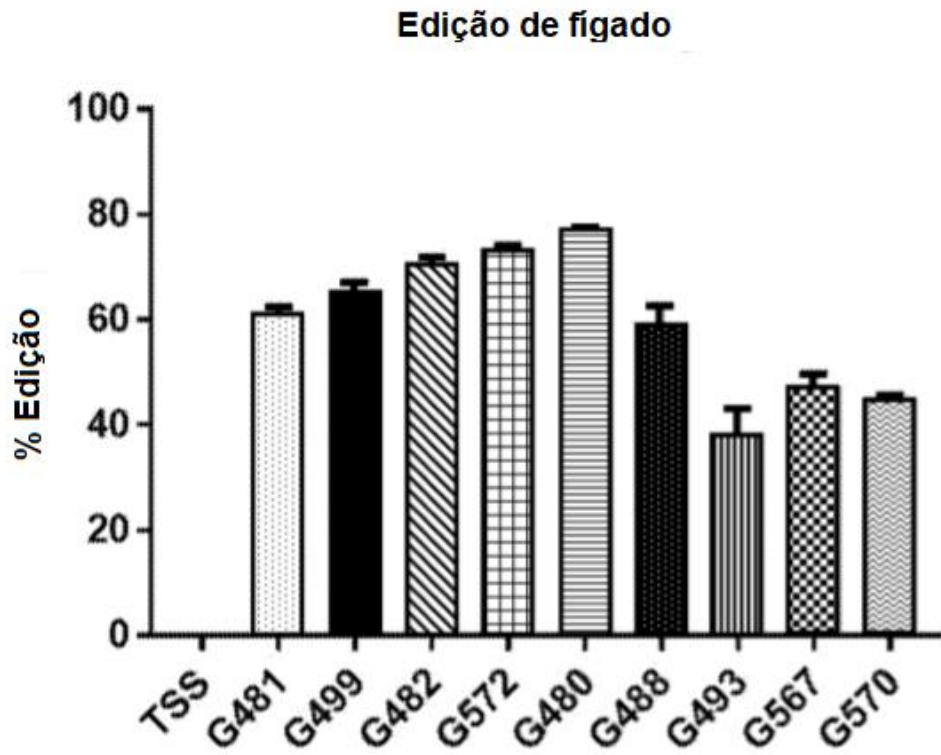


FIG. 13

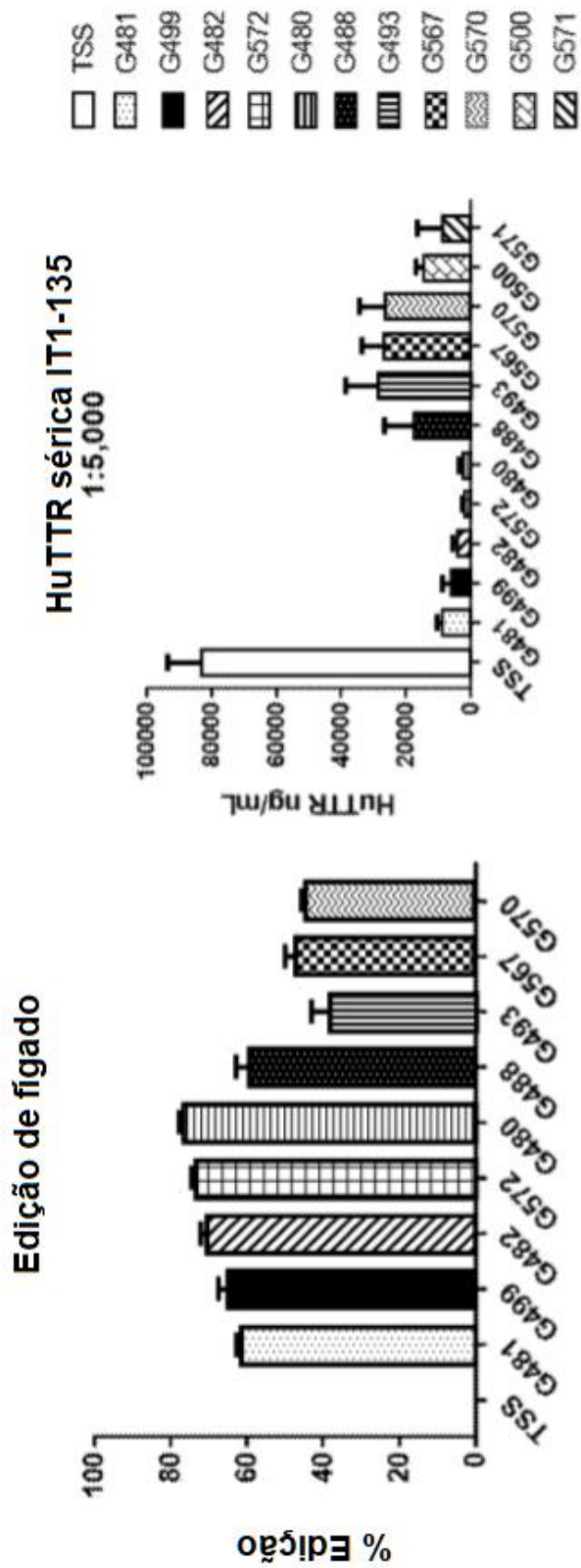


FIG. 14B

FIG. 14A

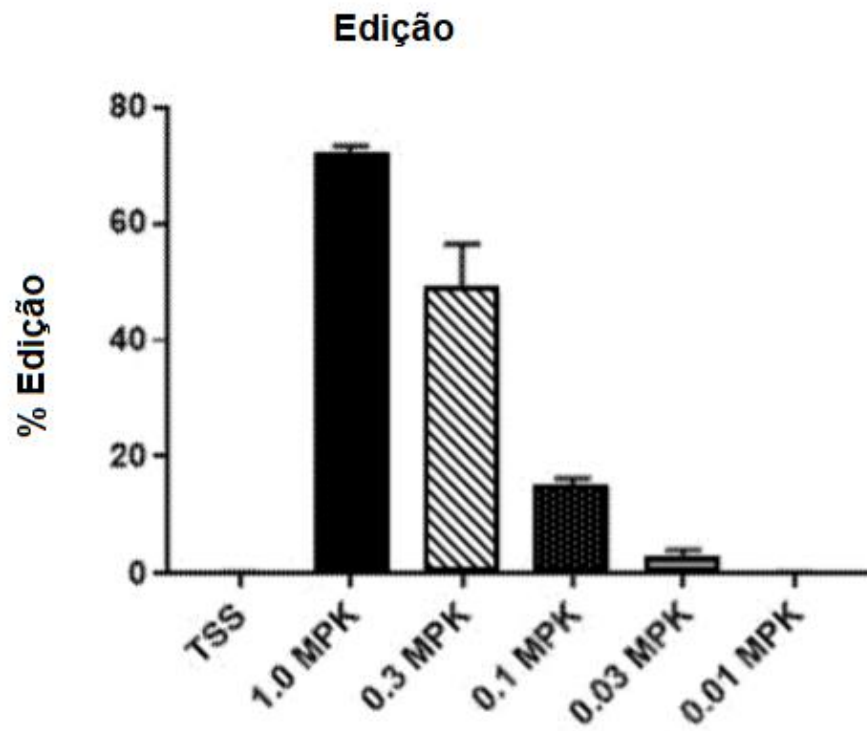
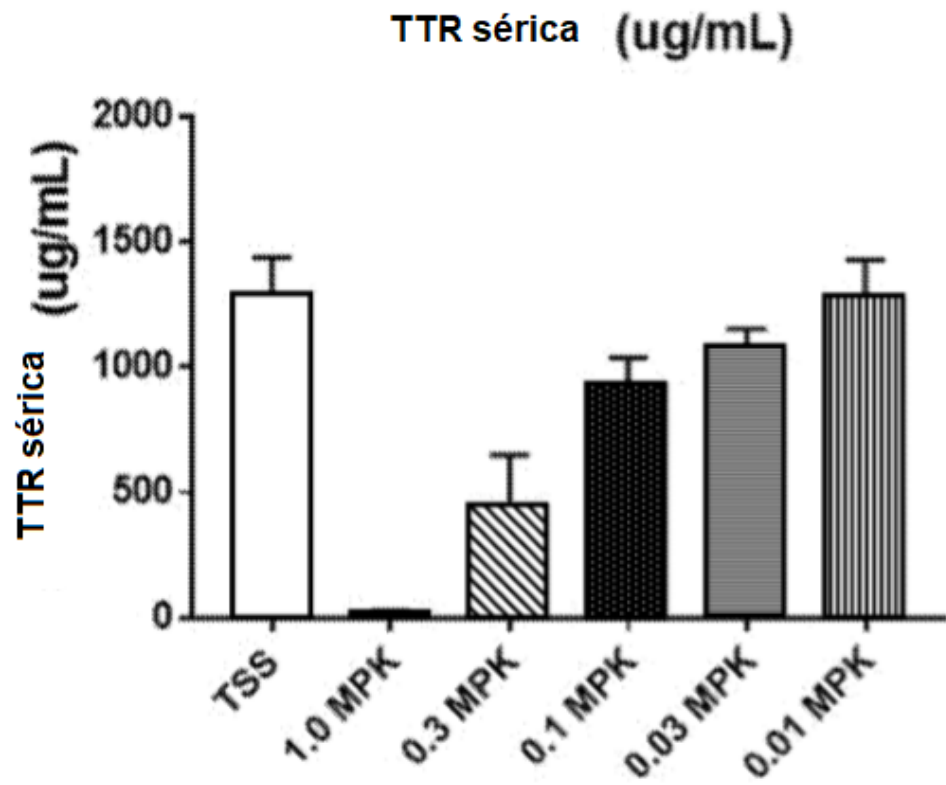


FIG. 15A



**FIG. 15B**

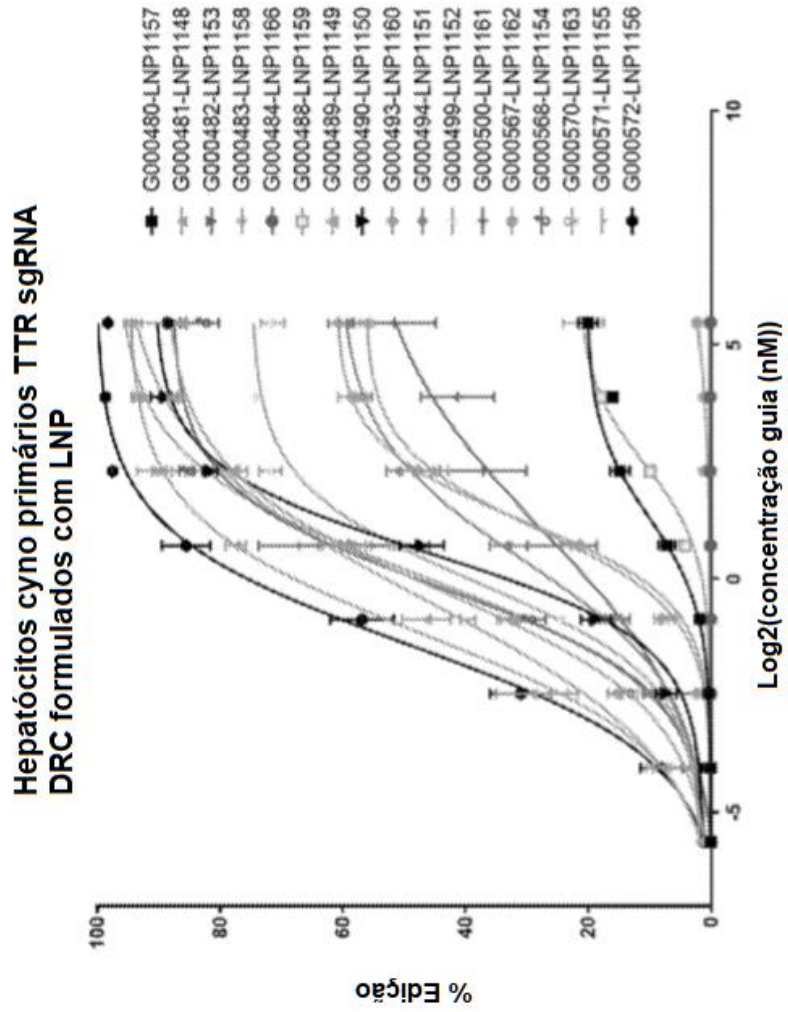


FIG. 16

Hepatócitos humanos primários sgRNA DRC específico de TTR Cyno formulado por LNP

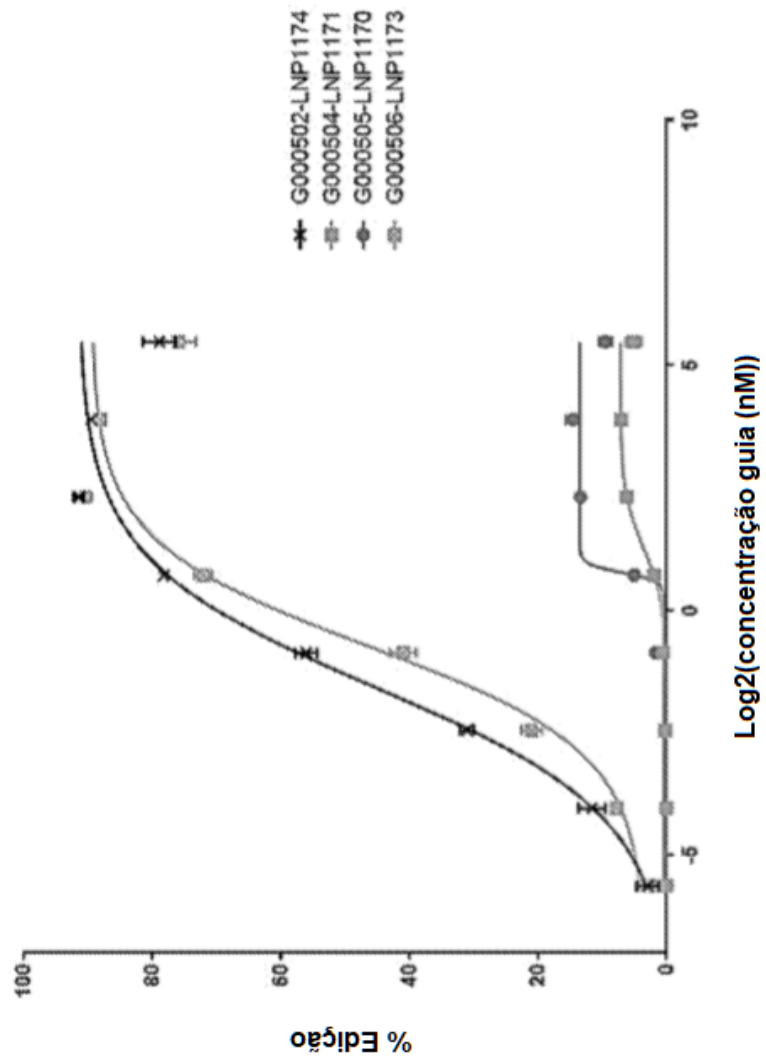


FIG. 17

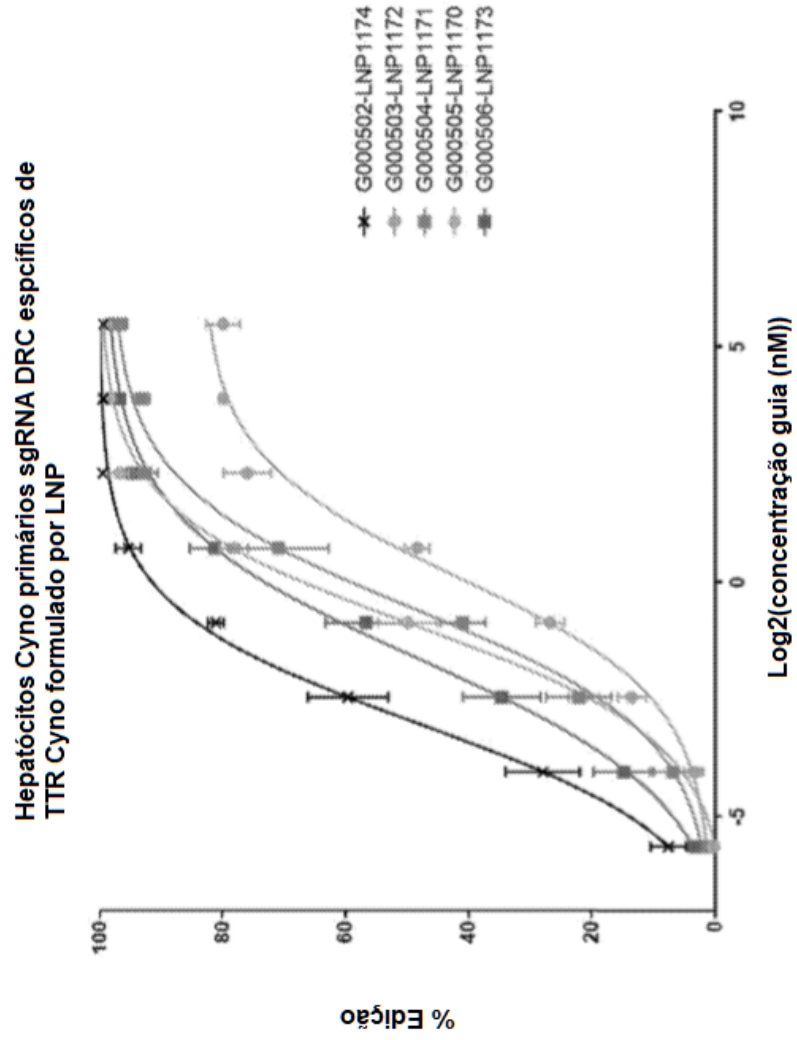


FIG. 18

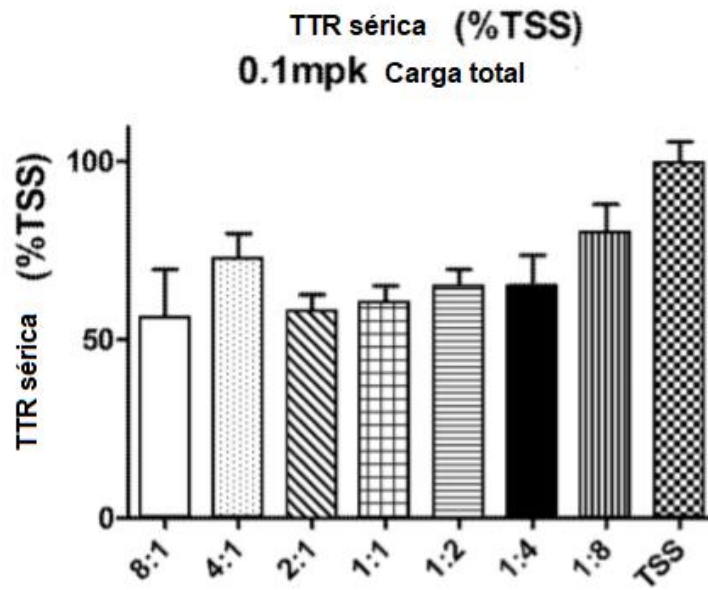


FIG. 19A

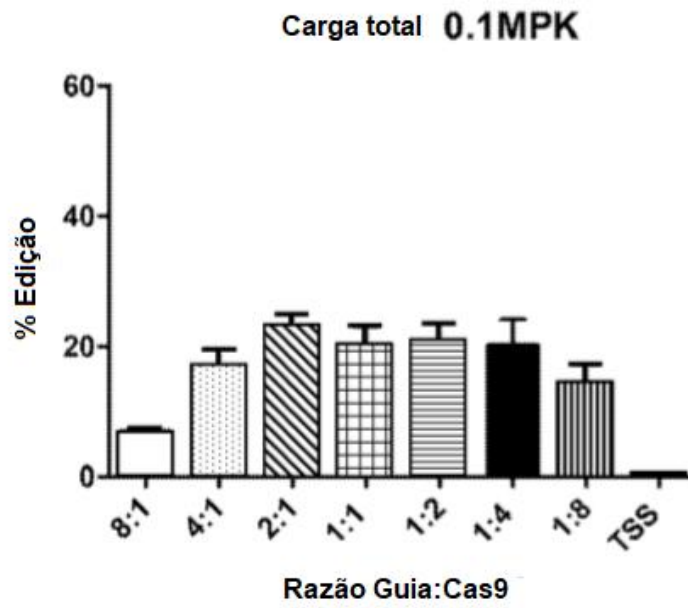


FIG. 19B

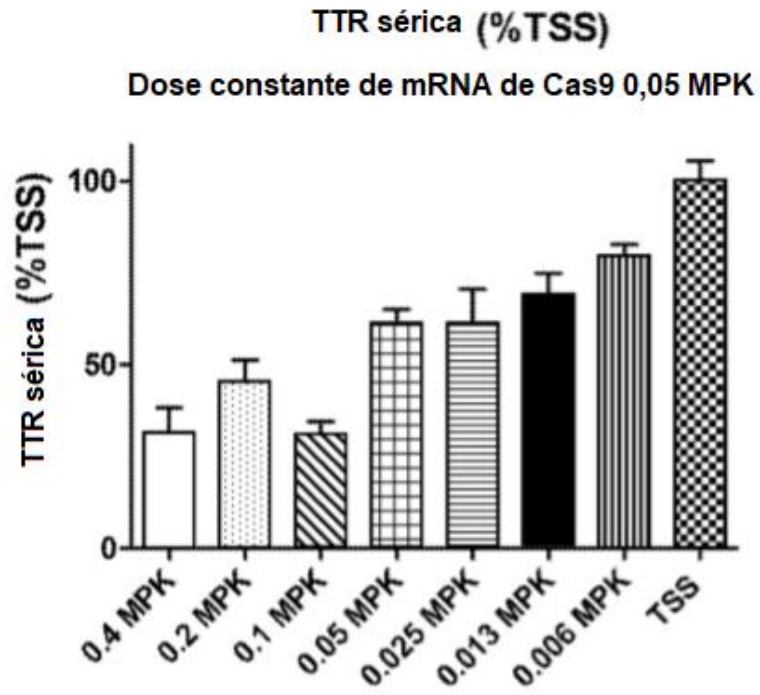
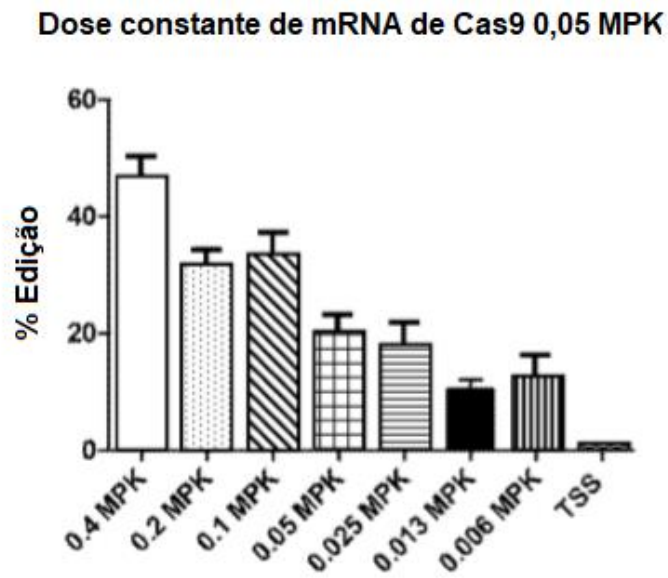


FIG. 19C



mpk de Guia

FIG. 19D

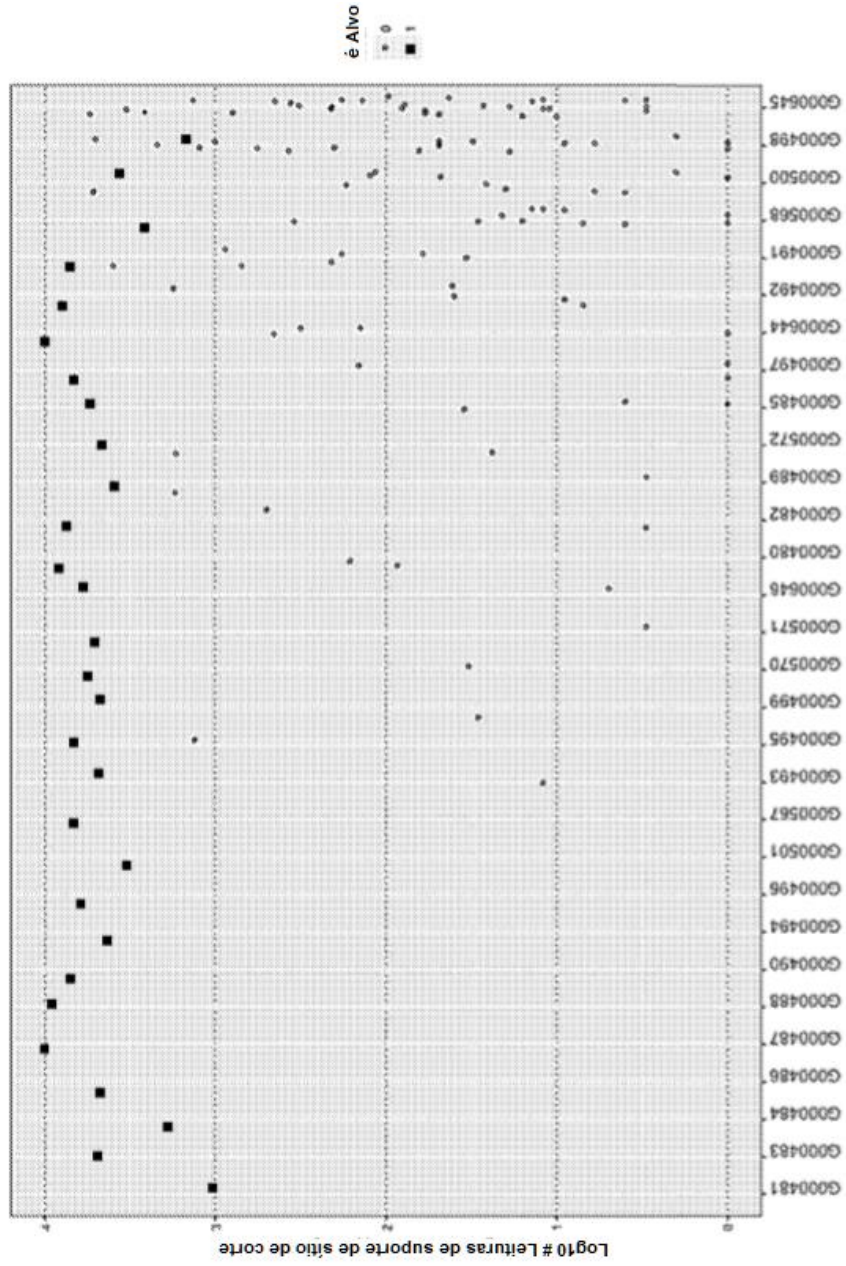


FIG. 20

Hepatócitos humanos primários G000480  
DRC formulados por LNP

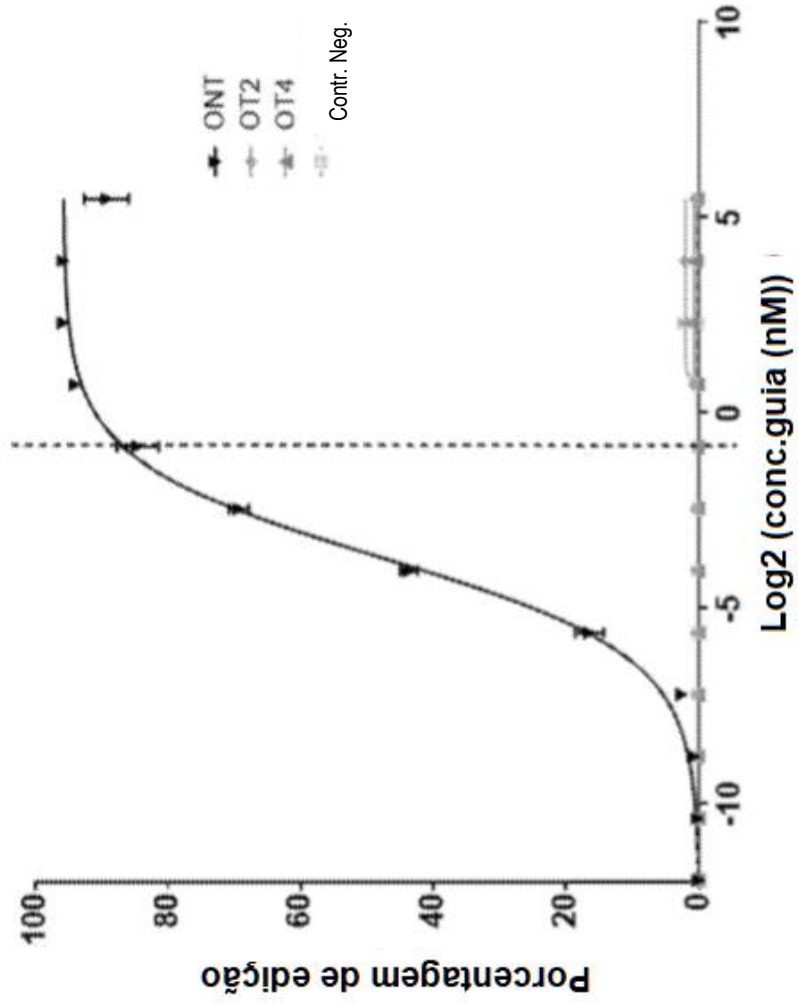


FIG. 21A

Hepatócitos humanos primários G000480 DRC  
formulados por LNP  
Sítios fora do alvo

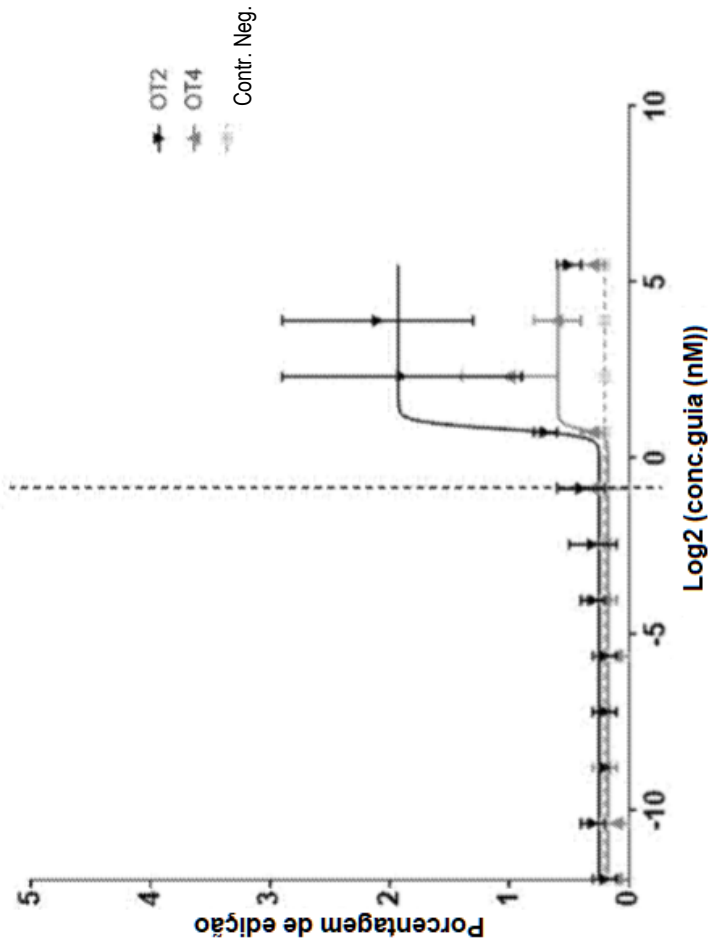


FIG. 21B

Hepatócitos humanos primários G000486  
DRC formulados por LNP

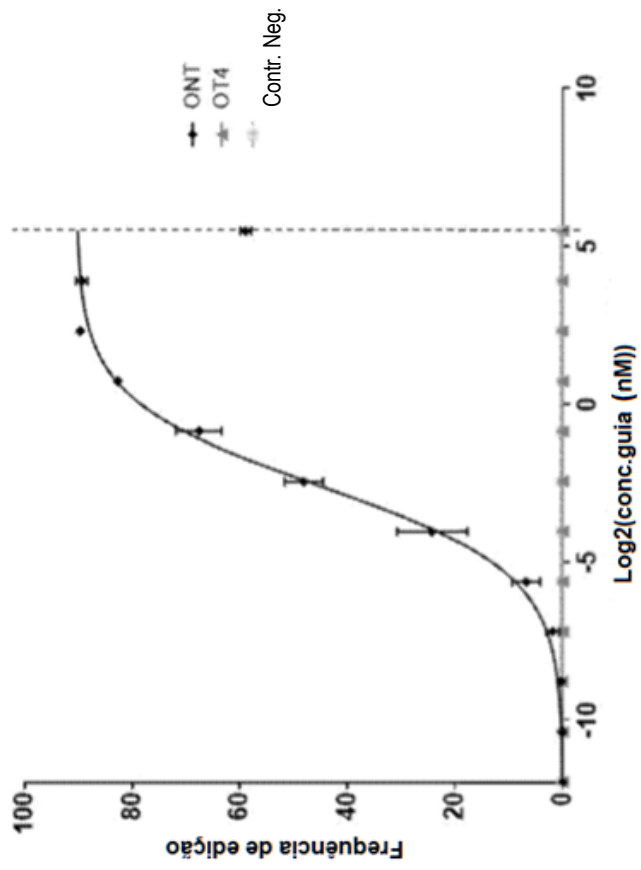


FIG. 22A

Hepatócitos humanos primários G000486  
DRC formulados por LNP  
Sítios fora do alvo

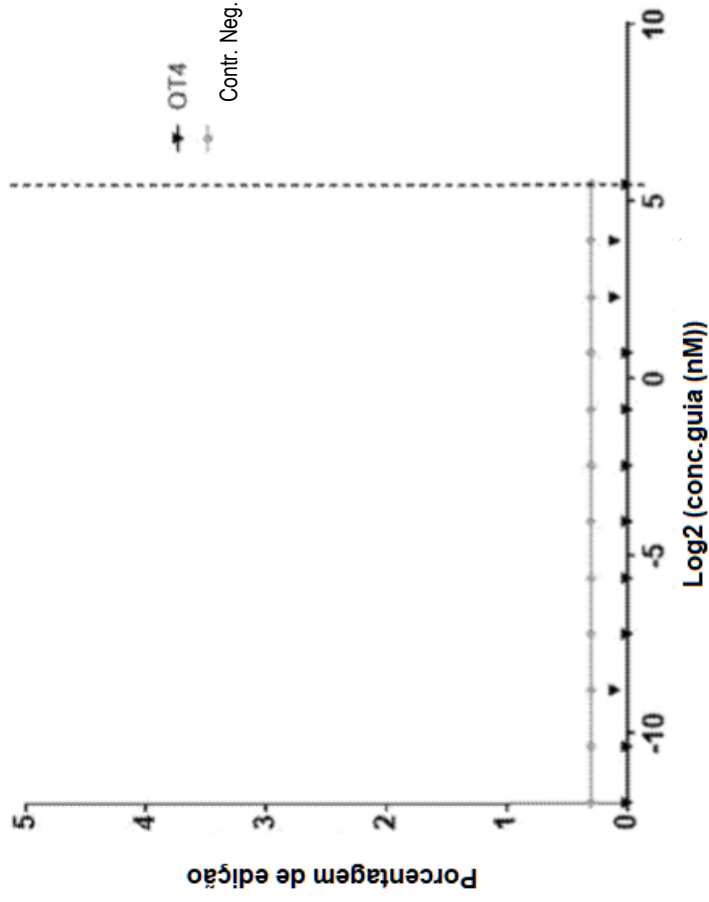


FIG. 22B

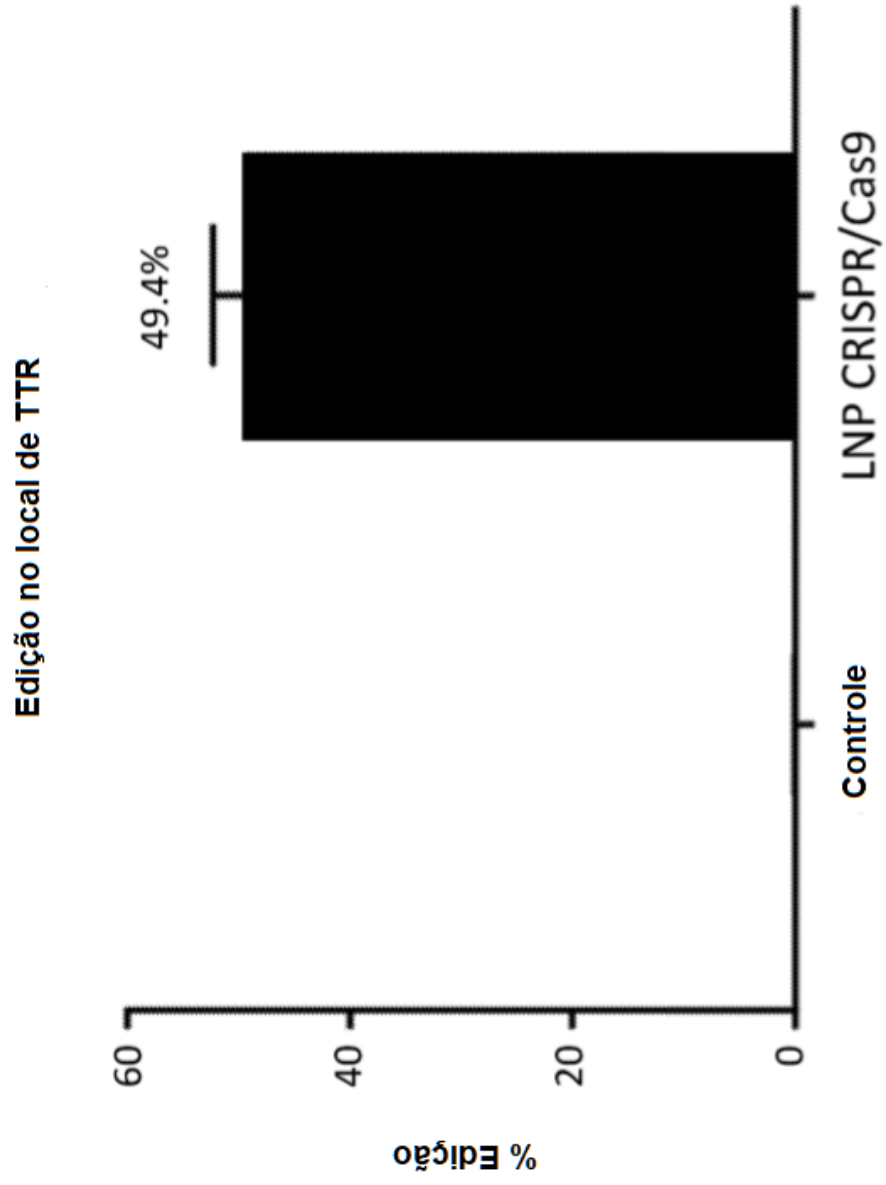


FIG. 23A

### Sumário de Resultados NGS

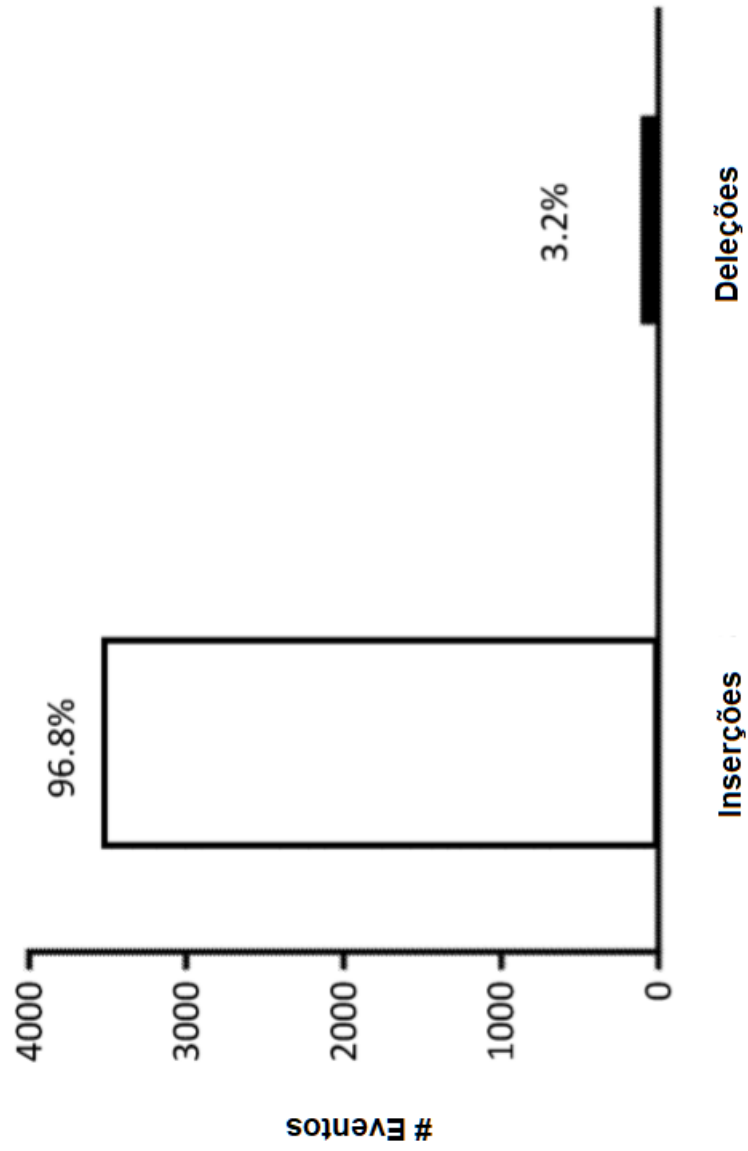


FIG. 23B

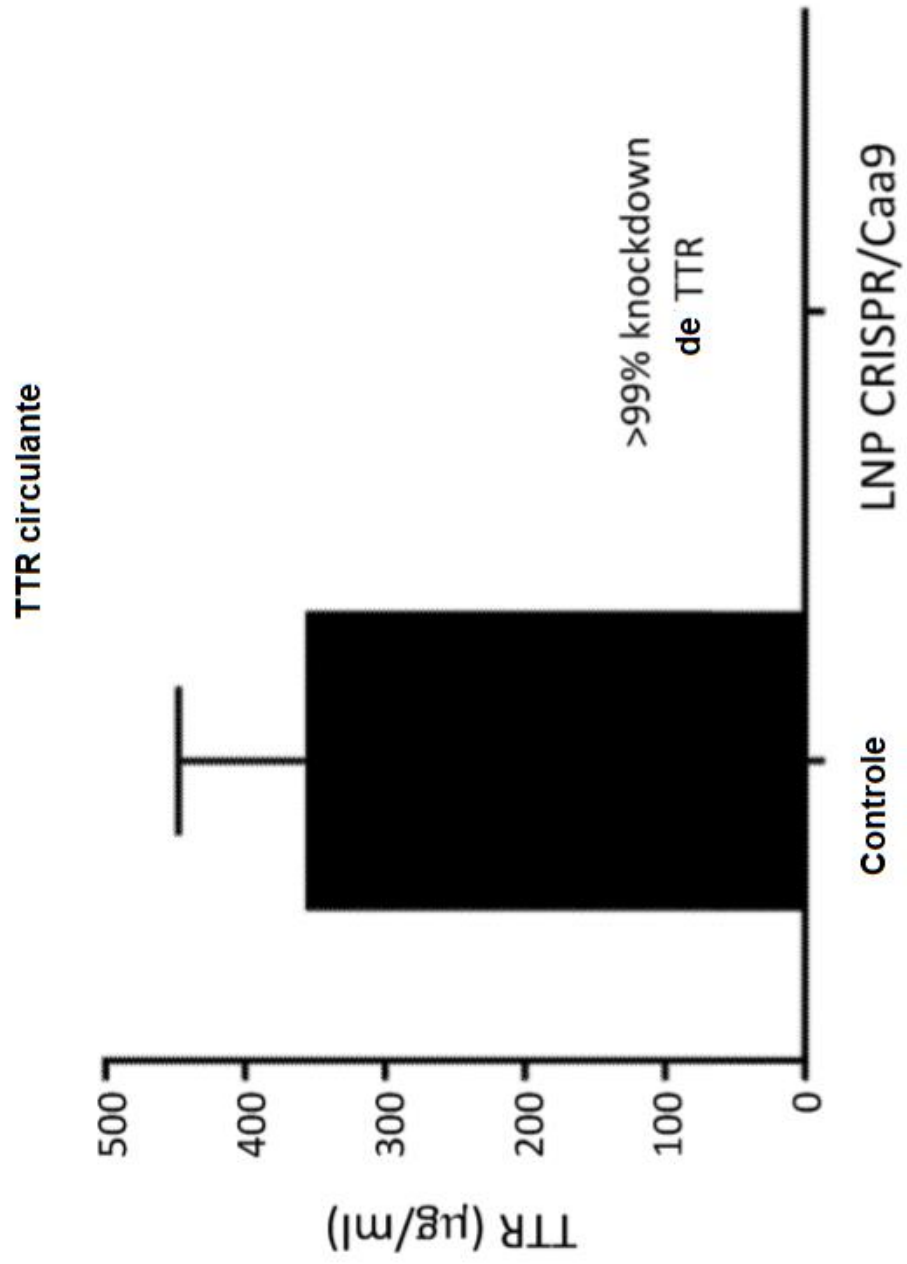


FIG. 24A

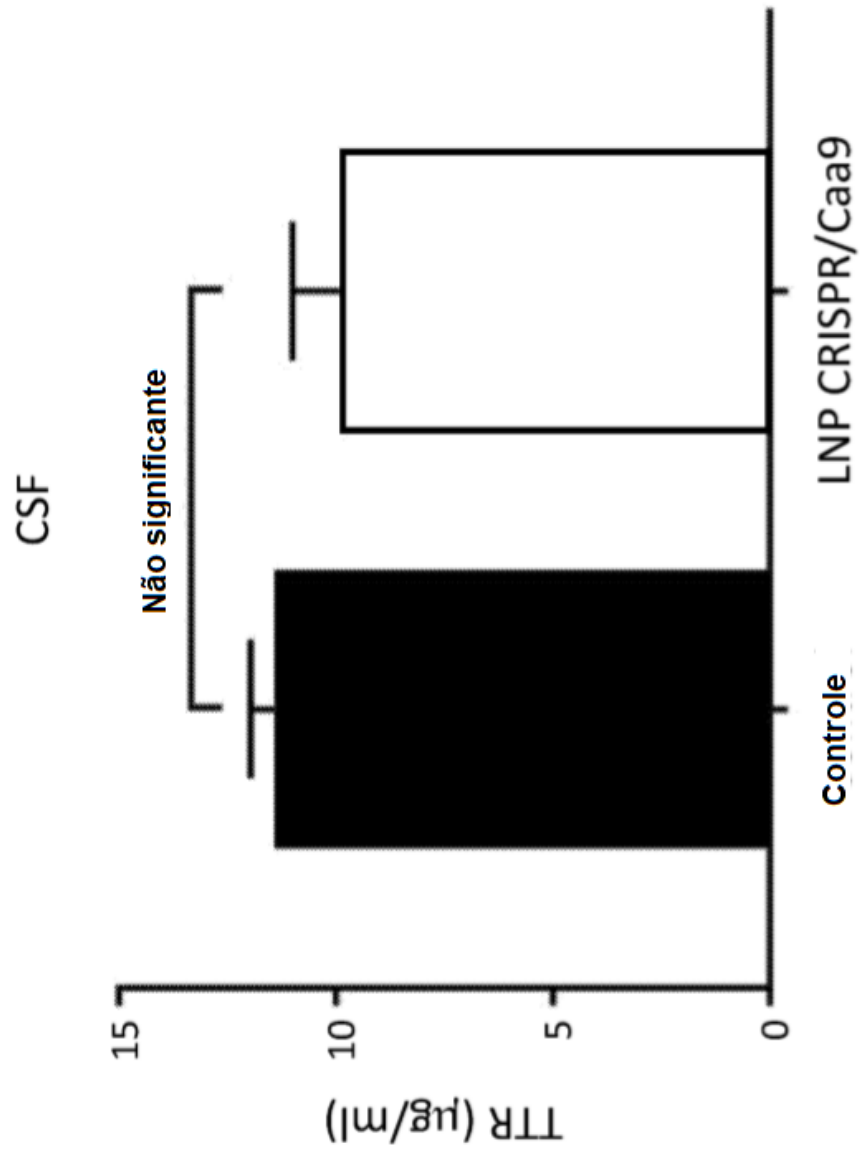
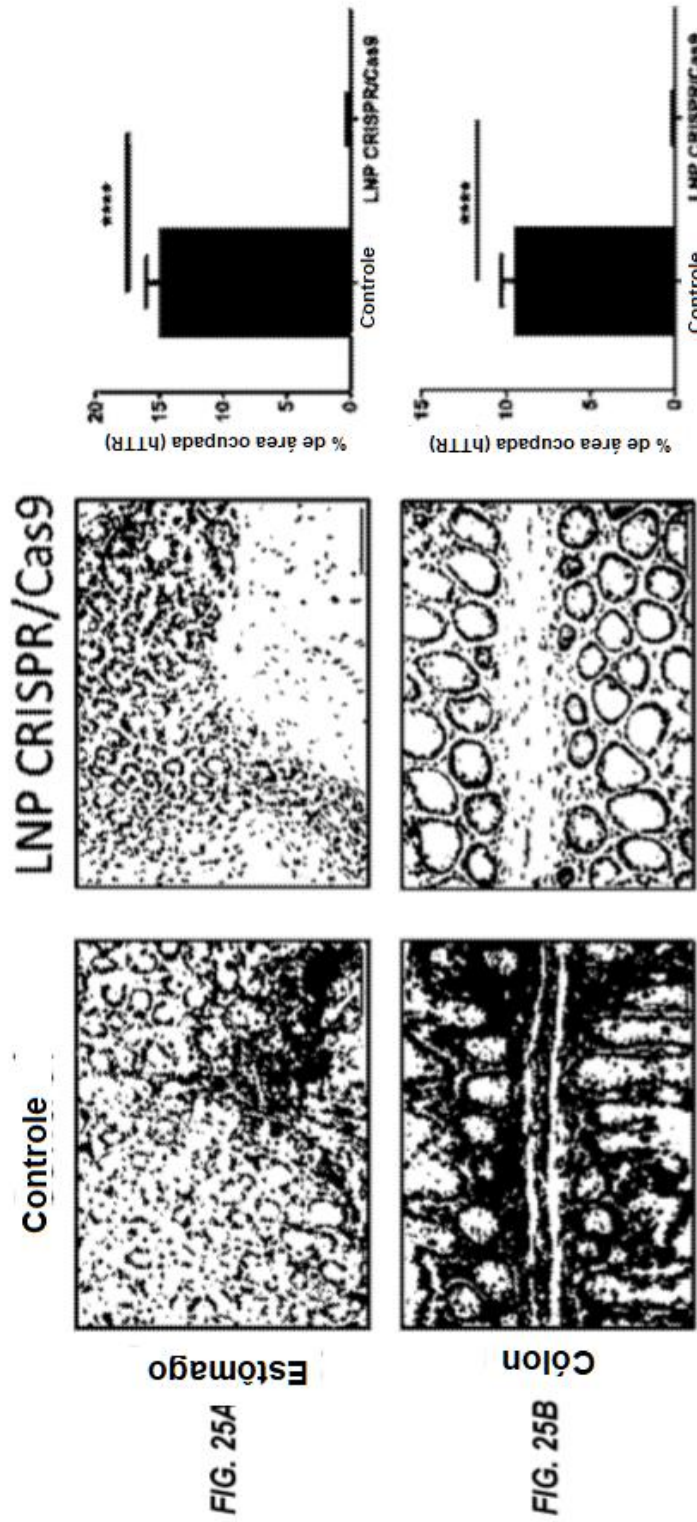
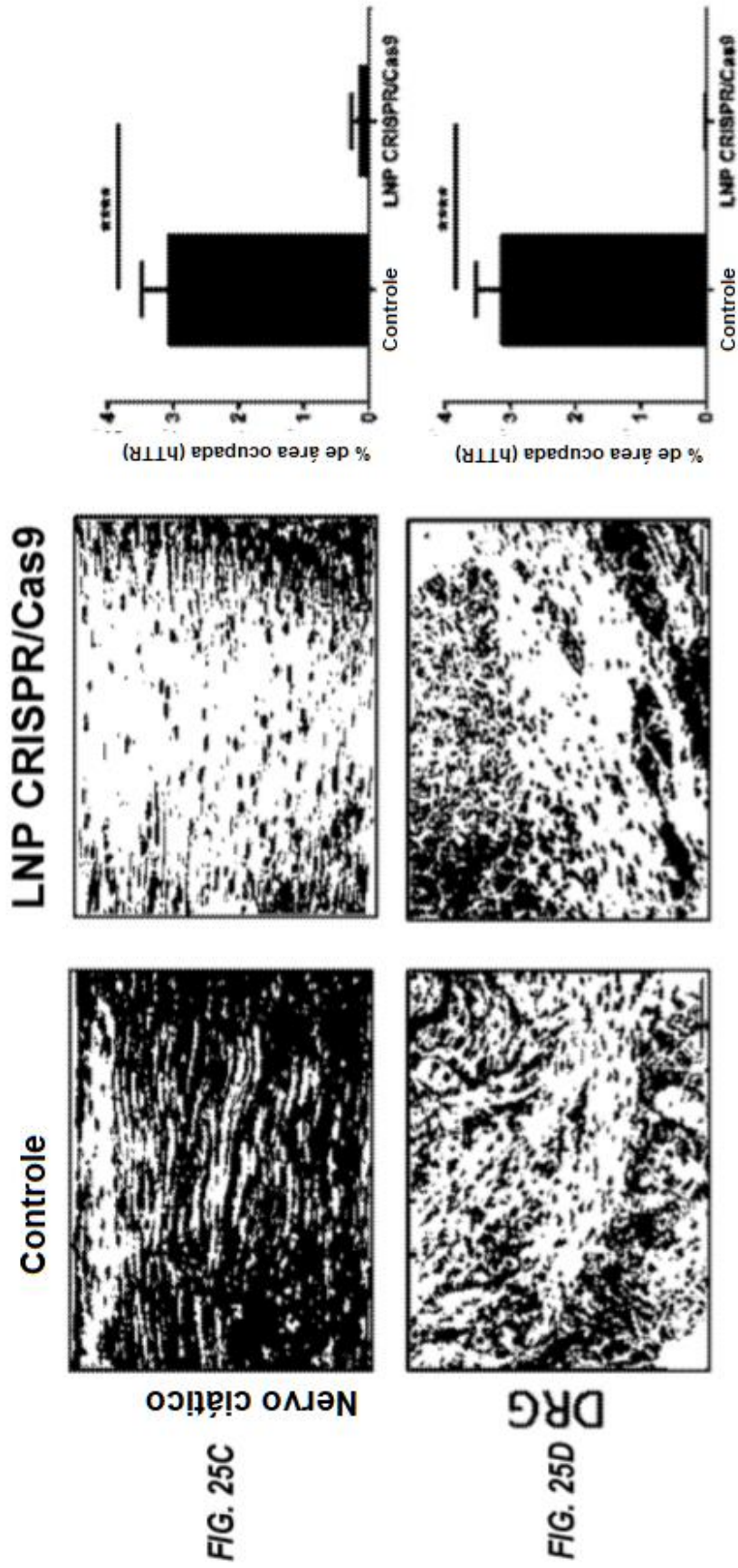


FIG. 24B





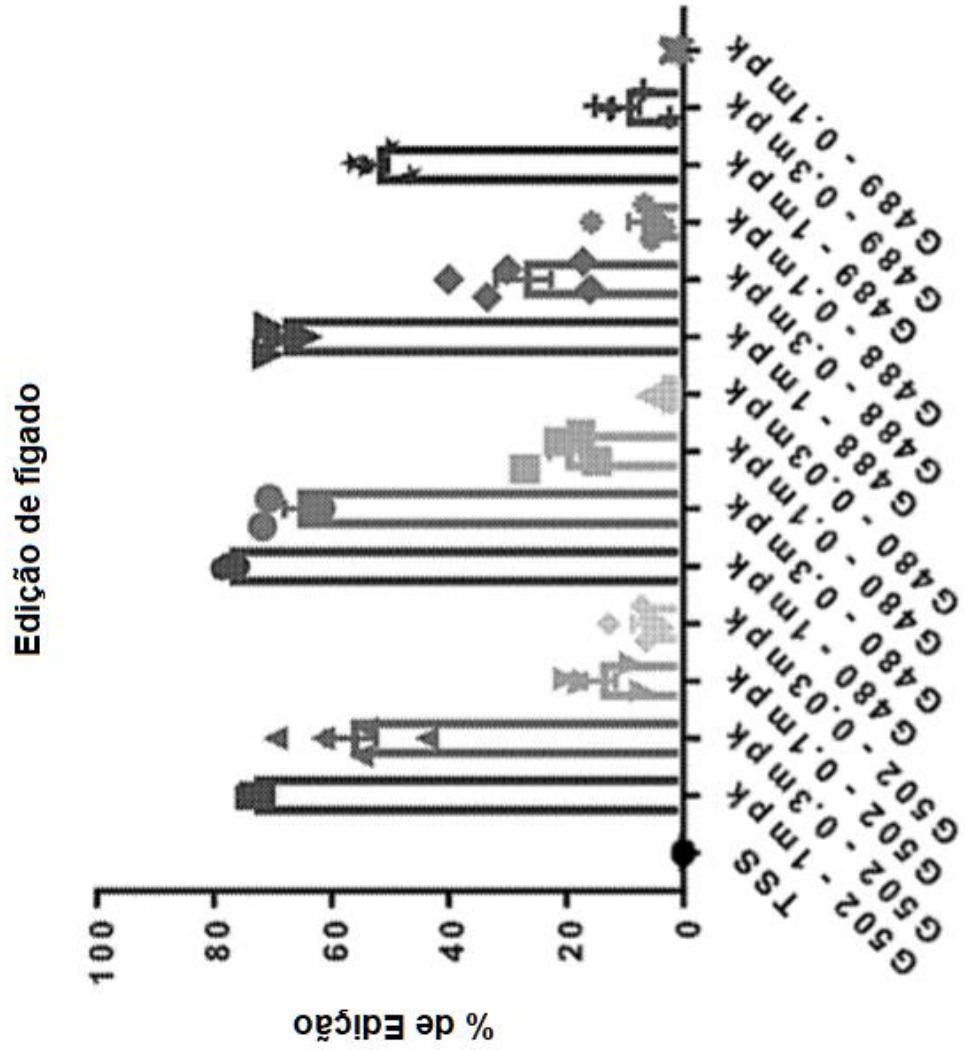


FIG. 26A

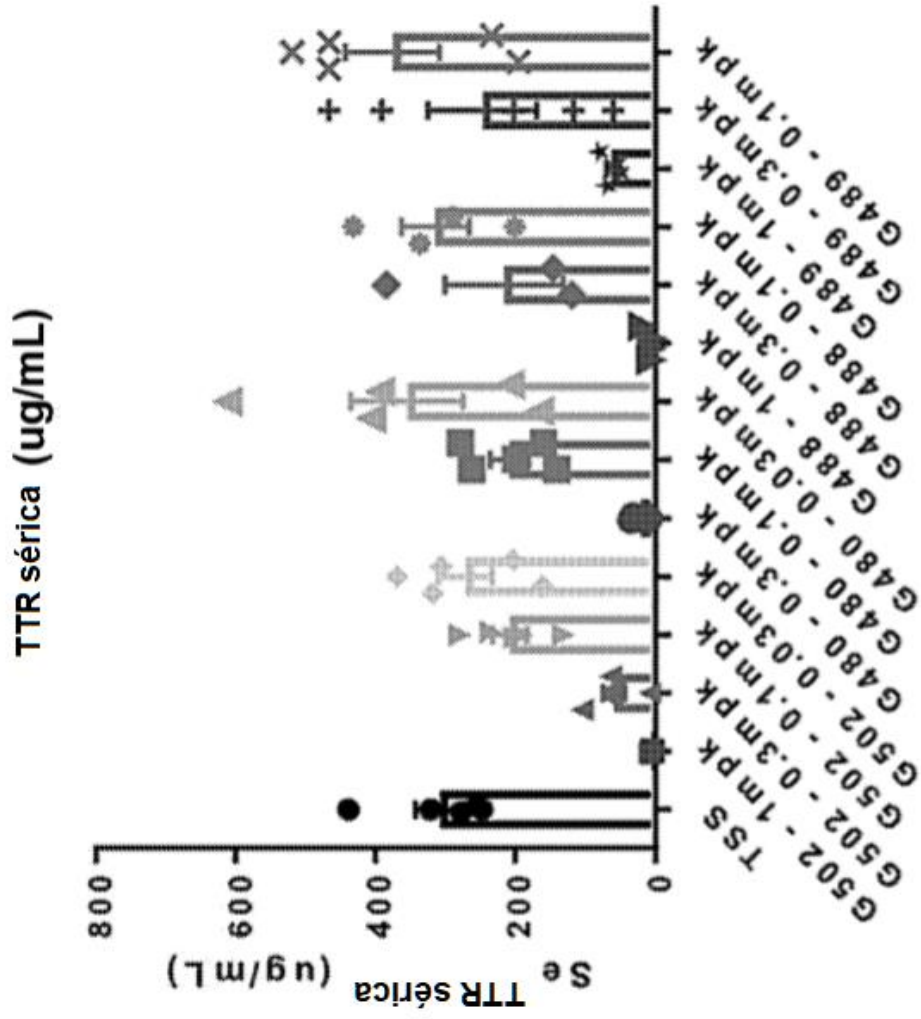


FIG. 26B

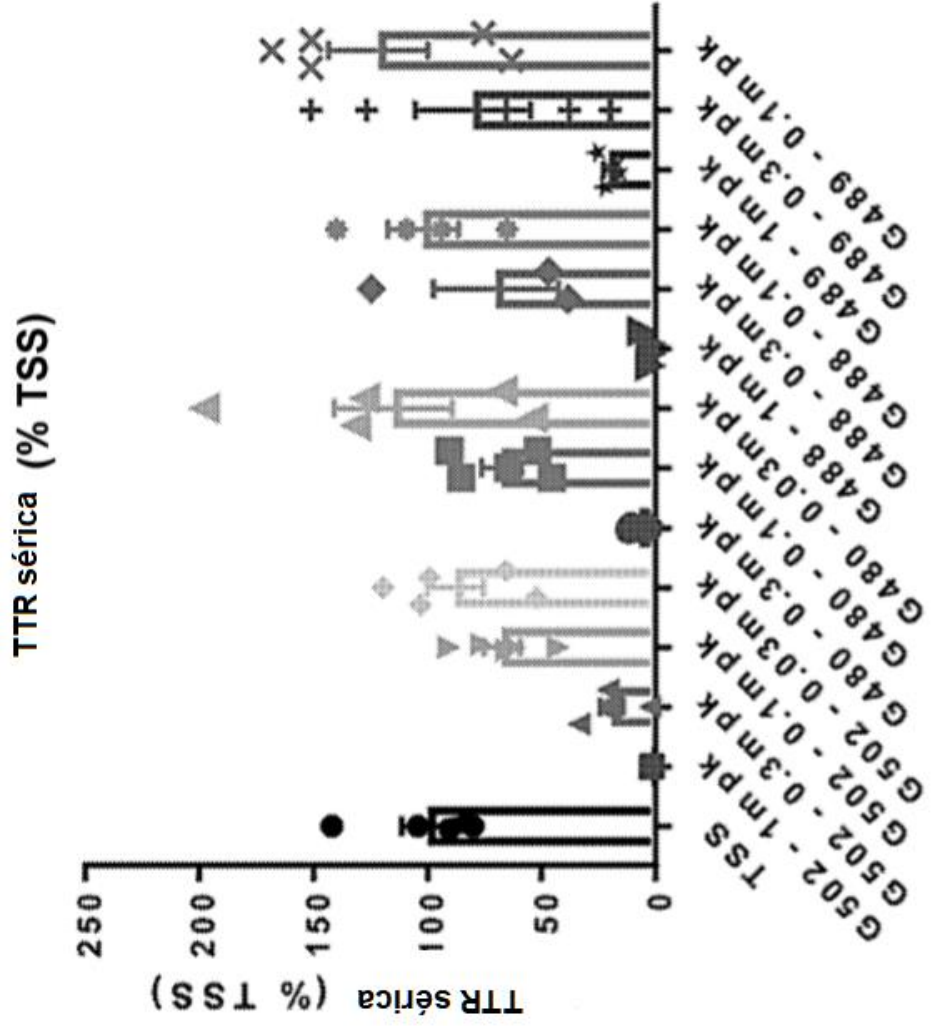


FIG. 26C

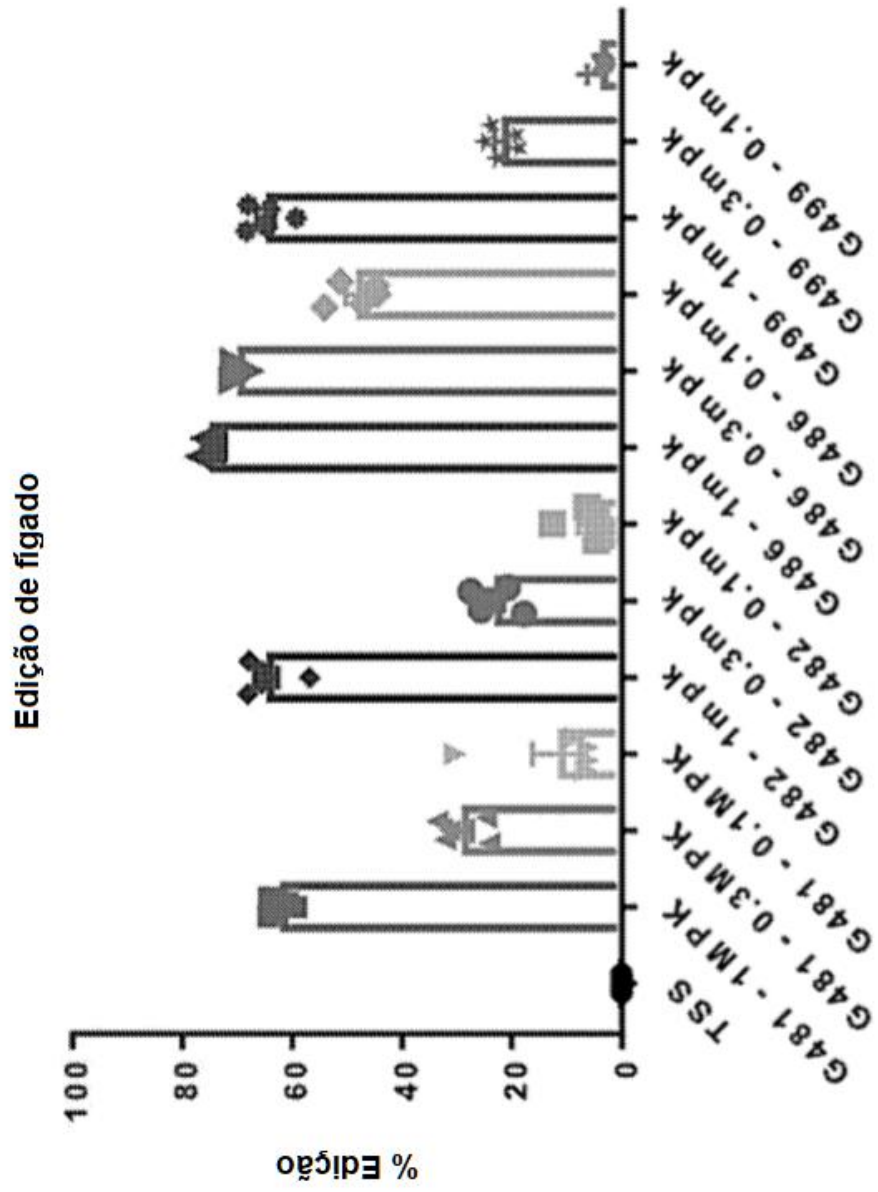


FIG. 27A

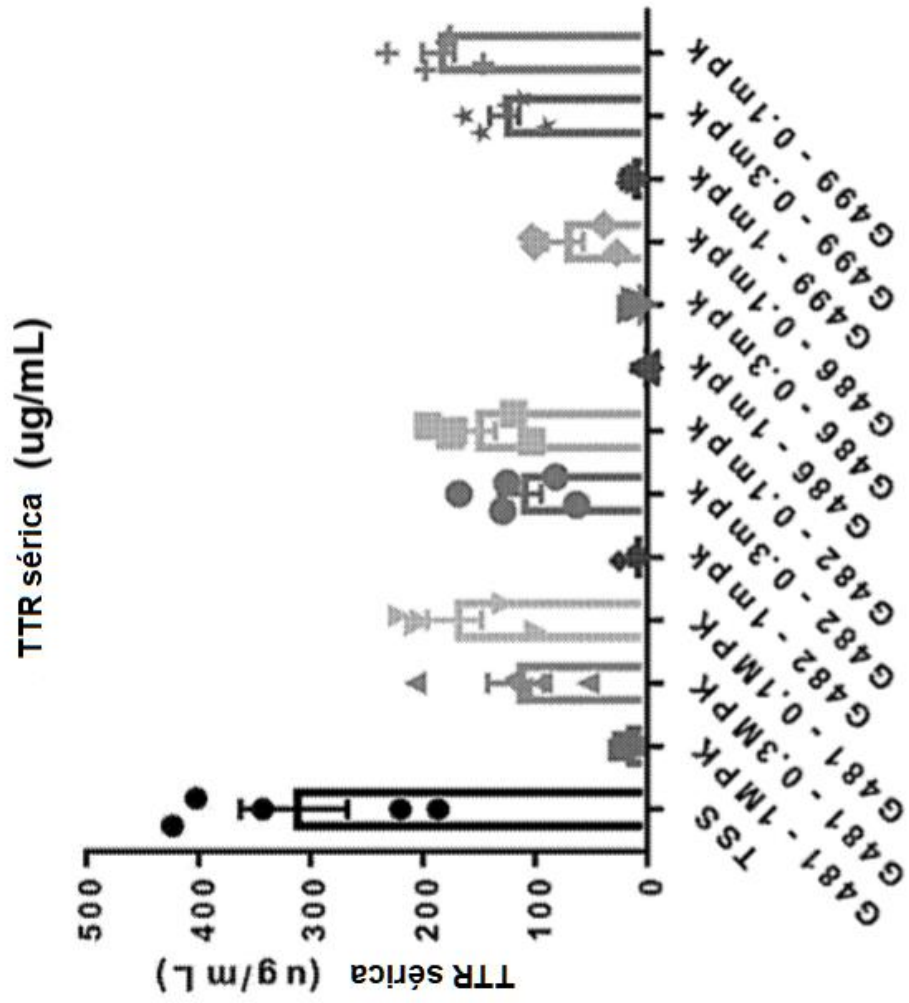


FIG. 27B

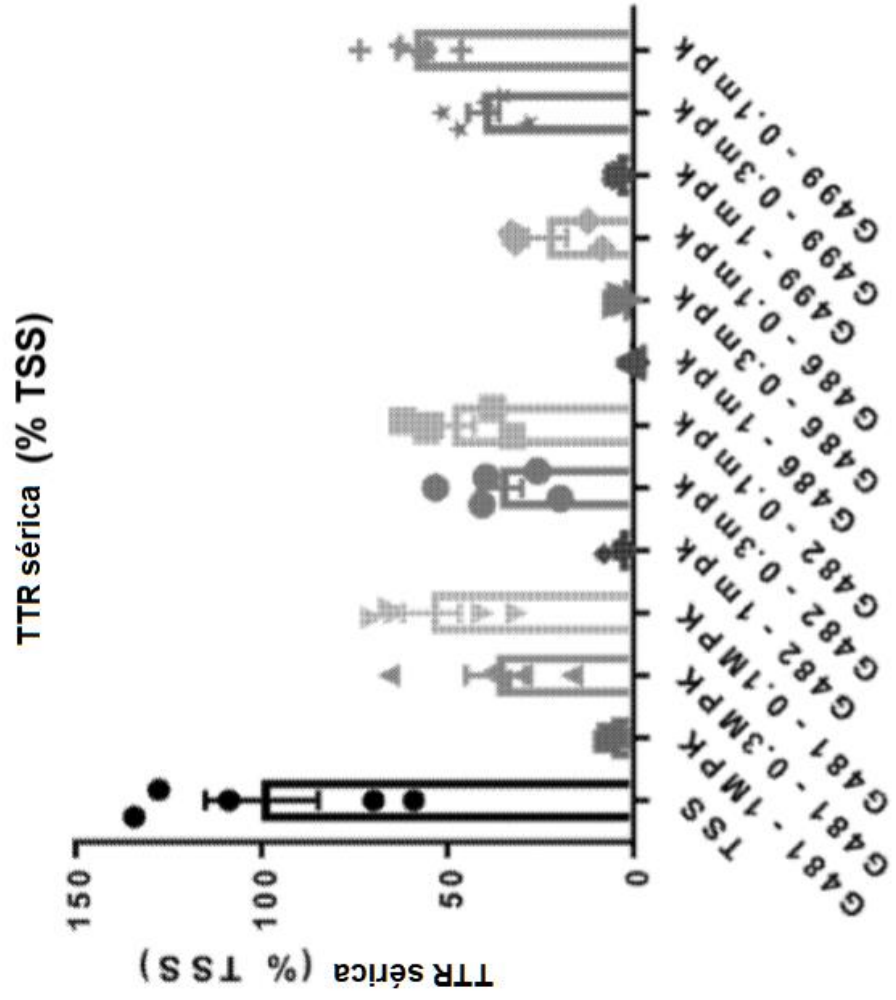


FIG. 27C

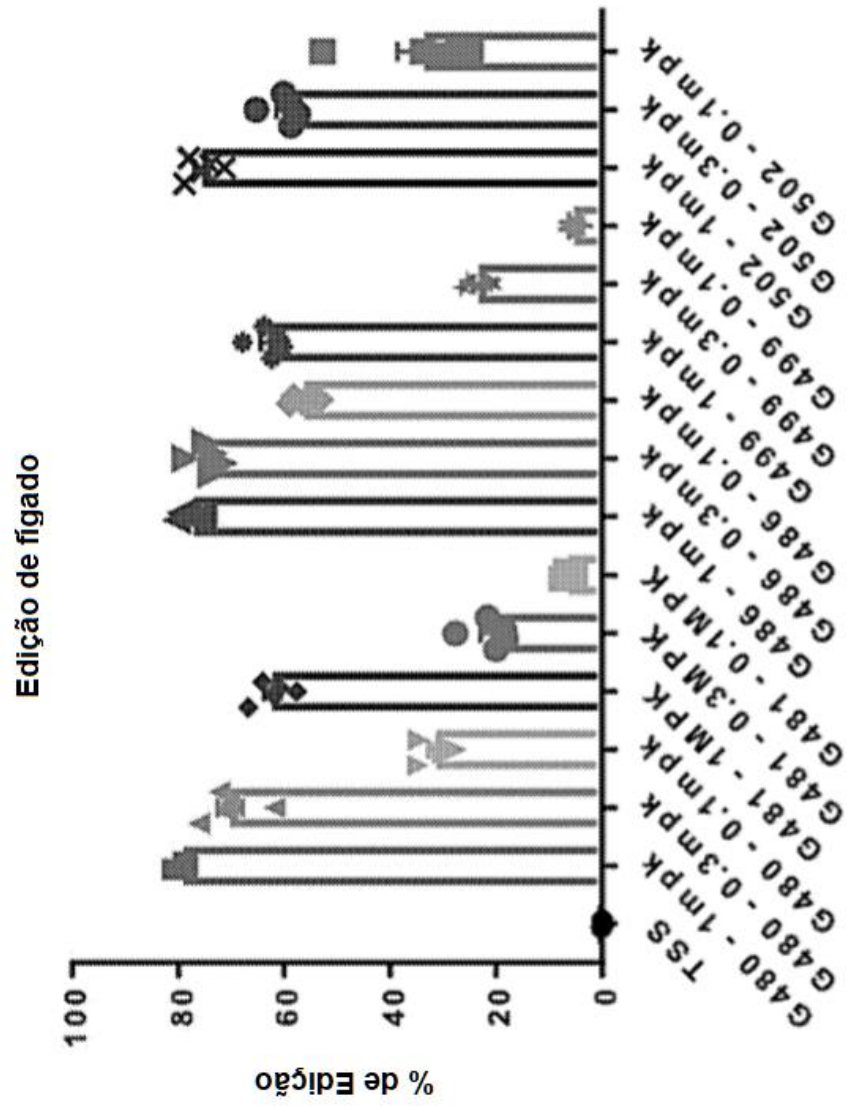


FIG. 28A

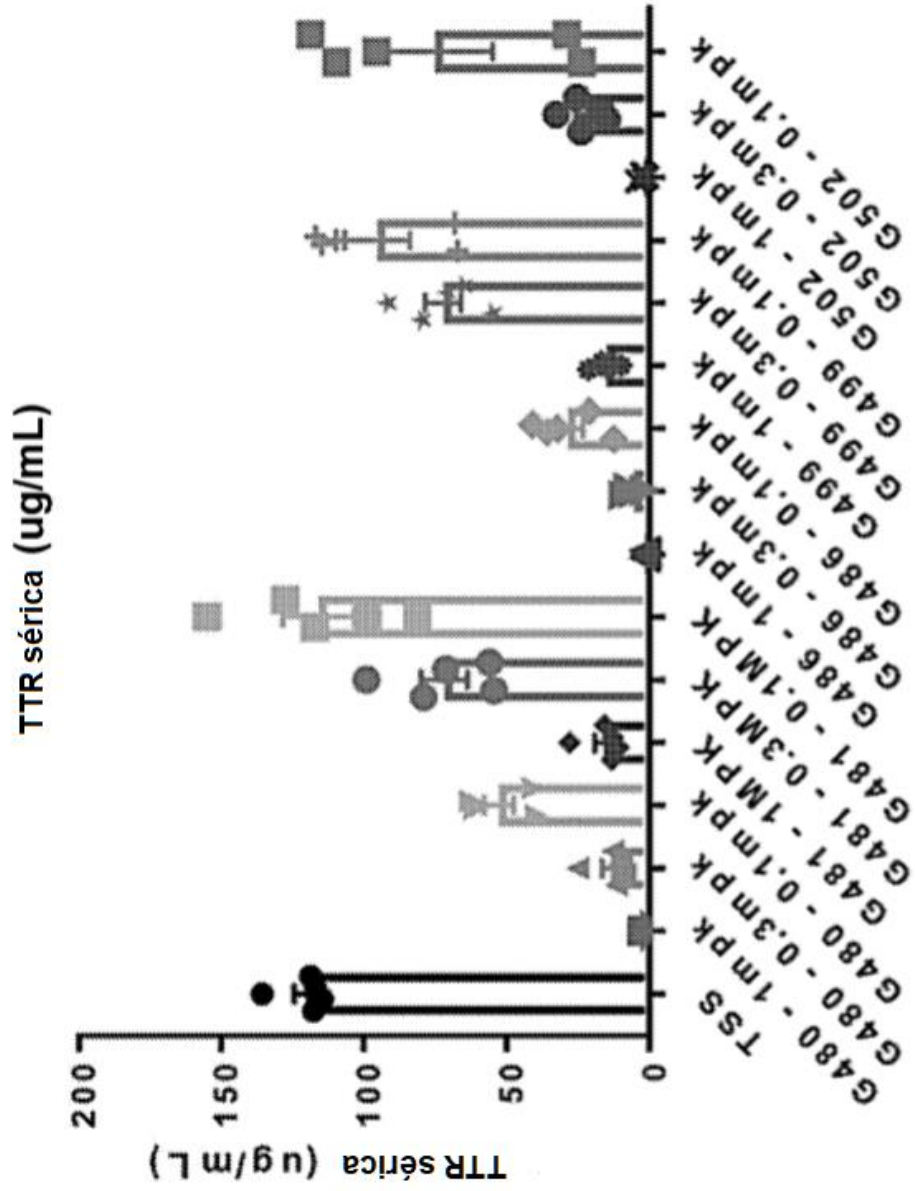


FIG. 28B

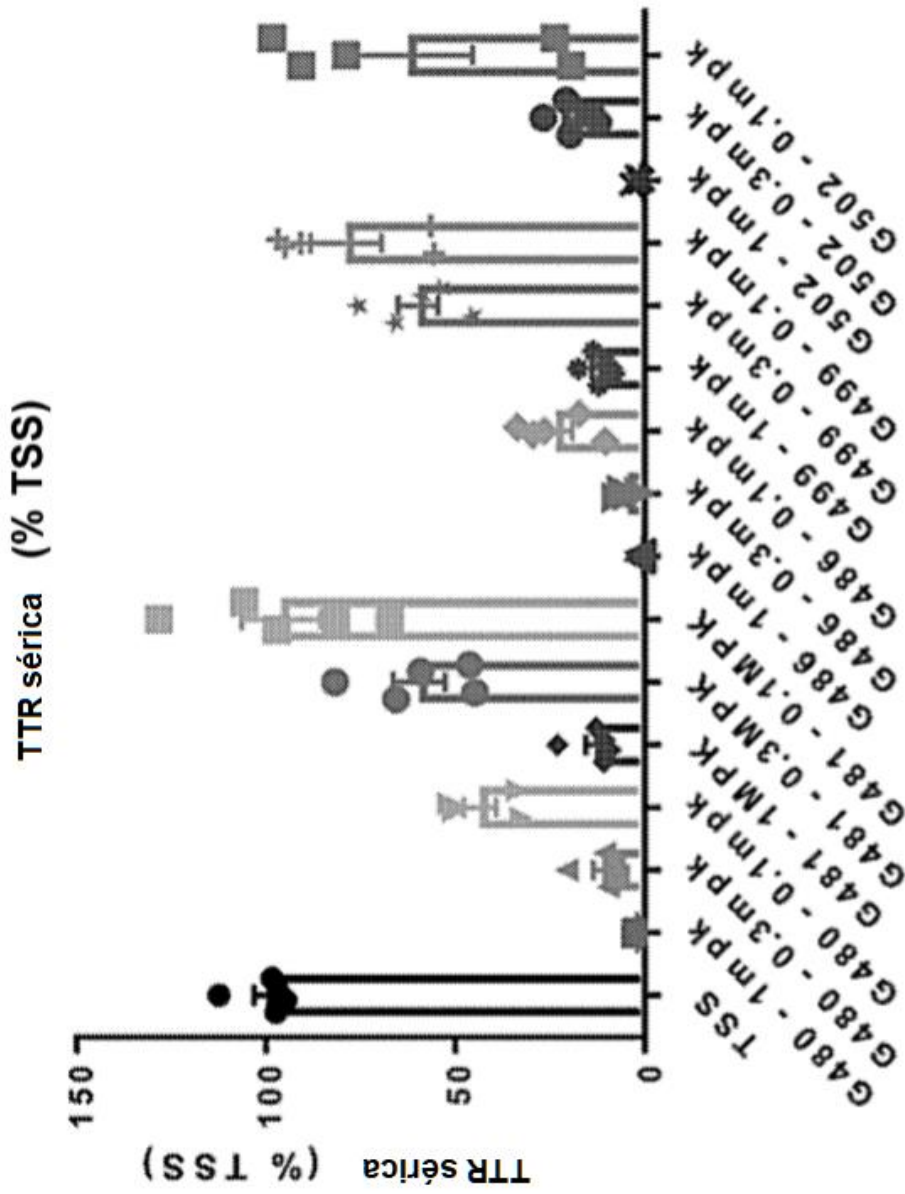


FIG. 28C

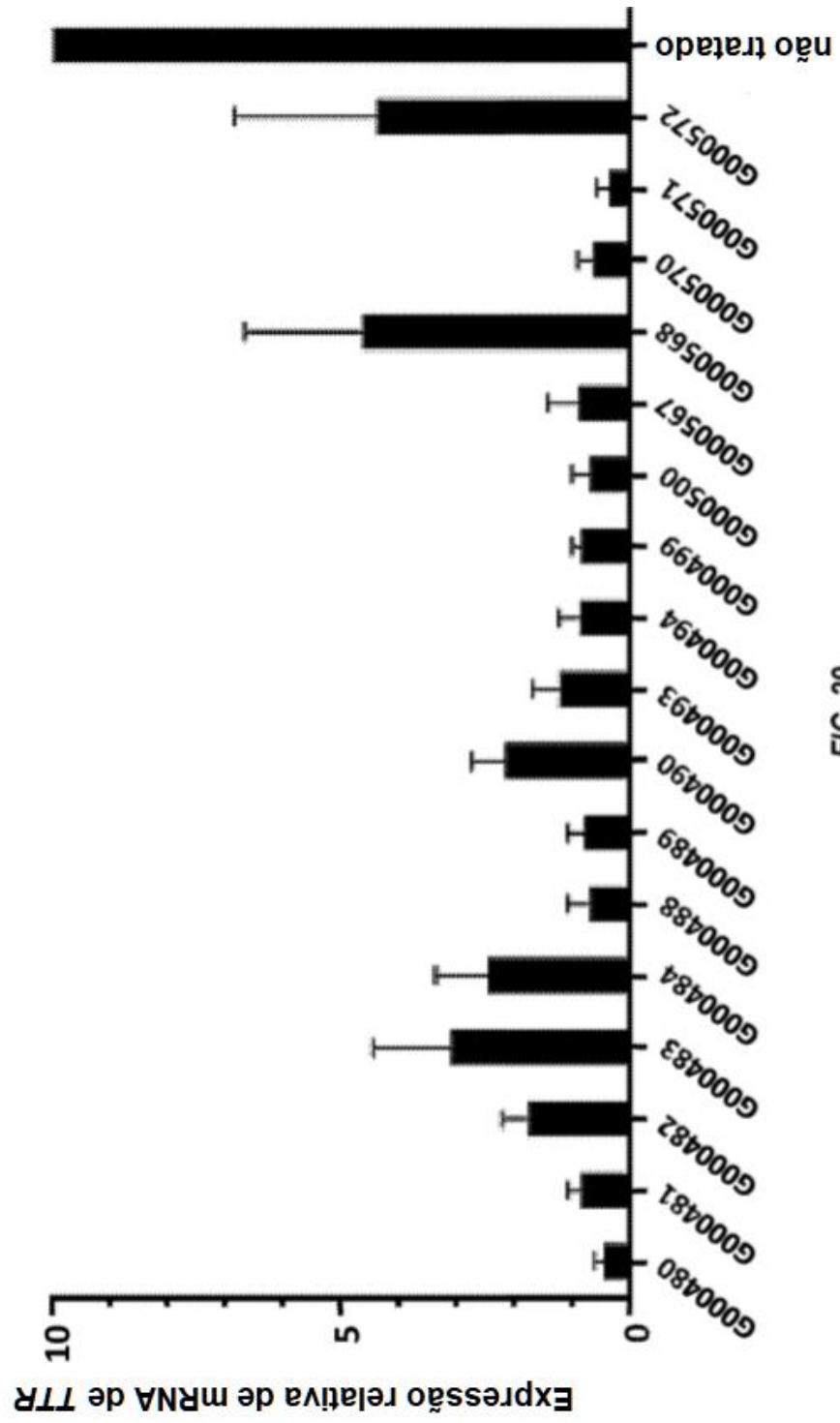


FIG. 29

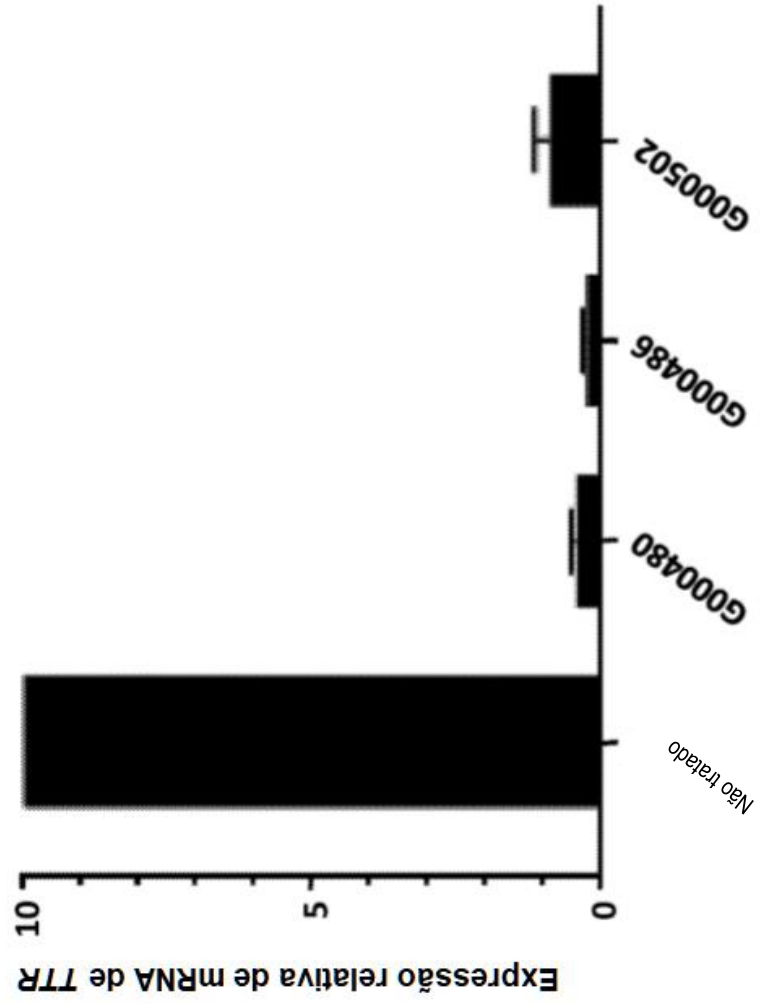


FIG. 30

## RESUMO

Patente de Invenção: “**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA EDIÇÃO DE GENE TTR E TRATAR AMILOIDOSE ATTR**”.

A presente invenção refere-se a composições e métodos para edição, por exemplo, introdução de quebras de fita dupla, dentro do gene *TTR*. São fornecidas composições e métodos para tratar sujeitos tendo amiloidose associada à transtirretina (ATTR).

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 - P246062.TXT
- Data de Geração do Código: 17/03/2020
- Hora de Geração do Código: 15:42:59
- Código de Controle:
  - Campo 1: 4FB632AFB996F5B4
  - Campo 2: C0C7C3296E4482E2