COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA EDICIÓN DEL GEN TTR Y EL TRATAMIENTO DE LA AMILOIDOSIS ATTR

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad para la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/556,236, que se presentó el 29 de septiembre de 2017, y la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/671,902, que se presentó el 15 de mayo de 2018, y que se incorporan por referencia en su totalidad.

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presentó por vía electrónica en formato ASCII y se incorpora por la presente descripción como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 27 de septiembre de 2018, se llama 2018-09-27_01155-0013-PCT_ST25.txt y tiene un tamaño de 417,471 bytes.

La transtiretina (TTR) es una proteína producida por el gen *TTR* que normalmente funciona para transportar el retinol y la tiroxina por todo el cuerpo. La TTR se sintetiza predominantemente en el hígado, produciéndose pequeñas fracciones en los plexos coroideos y la retina. La TTR normalmente circula como una proteína tetramérica soluble en la sangre.

Las variantes patogénicas de la TTR, que pueden alterar la estabilidad del tetrámero, pueden codificarse por alelos mutantes del gen *TTR*. La TTR mutante puede dar como resultado una TTR mal plegada, que puede generar los amiloides (es decir, agregados de la proteína TTR mal plegada). En algunos casos, las variantes patogénicas de la TTR pueden conducir a la amiloidosis, o la enfermedad resultante de la acumulación de los amiloides. Por ejemplo, los monómeros de la TTR mal plegada pueden polimerizarse en las fibrillas amiloides dentro de los tejidos, tales como los nervios periféricos, el corazón y el tracto gastrointestinal. Las placas amiloides también pueden comprender la TTR de tipo salvaje que se ha depositado sobre la TTR mal plegada.

El plegamiento erróneo y el depósito de la TTR de tipo salvaje también se ha observado en hombres de 60 años o más y se asocia con problemas de ritmo cardíaco, insuficiencia cardíaca y túnel carpiano.

La amiloidosis caracterizada por el depósito de la TTR puede denominarse “ATTR”, “amiloidosis relacionada con TTR”, “amiloidosis TTR” o “amiloidosis ATTR”, “amiloidosis familiar ATTR” (cuando se asocia con una mutación genética en una familia), o “ATTRwt” o “ATTR de tipo salvaje” (cuando surge de un plegamiento incorrecto y el depósito de la TTR de tipo salvaje).

La ATTR puede presentarse con un amplio espectro de síntomas, y los pacientes con diferentes clases de ATTR pueden tener diferentes características y pronósticos. Algunas clases de ATTR

incluyen la polineuropatía amiloide familiar (FAP), la miocardiopatía amiloide familiar (FAC) y la amiloidosis TTR de tipo salvaje (amiloidosis wt-TTR). La FAP comúnmente se presenta con neuropatía sensitivomotora, mientras que las amiloidosis wt-TTR y FAC comúnmente se presentan con insuficiencia cardíaca congestiva. La FAP y la FAC generalmente se asocian con una mutación genética en el gen *TTR*, y más de 100 mutaciones diferentes en el gen *TTR* se han asociado con la ATTR. En contraste, la amiloidosis wt-TTR se asocia con el envejecimiento y no con una mutación genética en *TTR*. Se estima que aproximadamente 50,000 pacientes en todo el mundo pueden verse afectados por la FAP y la FAC.

Mientras que más de 100 mutaciones en *TTR* se asocian con la ATTR, ciertas mutaciones se han asociado más estrechamente con la neuropatía y/o la miocardiopatía. Por ejemplo, las mutaciones en T60 de TTR se asocian con la miocardiopatía y la neuropatía; las mutaciones en V30 se asocian más con la neuropatía; y las mutaciones en V122 se asocian más con la miocardiopatía.

Se ha estudiado una variedad de enfoques de tratamiento para el tratamiento de la ATTR, pero no hay fármacos aprobados que detengan la progresión de la enfermedad y mejoren la calidad de vida. Si bien el trasplante de hígado se ha estudiado para el tratamiento de la ATTR, su uso está disminuyendo ya que implica un riesgo significativo y la progresión de la enfermedad a veces continúa después del trasplante. Las moléculas pequeñas estabilizadoras, tales como el diflunisal y el tafamidis, parecen ralentizar la progresión de la ATTR, pero estos agentes no detienen la progresión de la enfermedad.

En la actualidad, también se están investigando los enfoques que usan la disminución del ARN pequeño de interferencia (ARNip), la disminución antisentido o un anticuerpo monoclonal dirigido a las fibrillas amiloides para la destrucción, pero aunque los resultados sobre la supresión a corto plazo de la expresión de la TTR muestran datos preliminares alentadores, existe la necesidad de tratamientos que puedan producir una supresión duradera de la TTR.

Por consiguiente, se proporcionan las siguientes modalidades. En algunas modalidades, la presente invención proporciona las composiciones y los métodos que usan un ARN de guía con un agente de unión al ADN guiado por ARN, tal como el sistema CRISPR/Cas, para reducir sustancialmente o inactivar la expresión del gen *TTR*, reduciendo o eliminando sustancialmente la producción de la proteína TTR asociada con la ATTR. La reducción o la eliminación sustancial de la producción de la proteína TTR asociada con la ATTR a través de la alteración del gen *TTR* puede ser una reducción o eliminación a largo plazo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La modalidad 1 es un método para inducir una ruptura bicatenaria (DSB) dentro del gen TTR, que comprende administrar una composición a una célula, en donde la composición comprende

a. un ARN de guía que comprende una secuencia de guía que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82;

b. un ARN de guía que comprende al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82; o

c. un ARN de guía que comprende una secuencia de guía que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82.

La modalidad 2 es un método para modificar el gen TTR que comprende administrar una composición a una célula, en donde la composición comprende (i) un agente de unión al ADN guiado por ARN o un ácido nucleico que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN y (ii) un ARN de guía que comprende:

a. una secuencia de guía que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82;

b. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82; o

c. una secuencia de guía que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82.

La modalidad 3 es un método para tratar la amiloidosis asociada con TTR (ATTR), que comprende administrar una composición a un sujeto que lo necesite, en donde la composición comprende (i) un agente de unión al ADN guiado por ARN o un ácido nucleico que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN y (ii) un ARN de guía que comprende:

a. una secuencia de guía que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82;

b. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82; o

c. una secuencia de guía que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82,

para tratar de ese modo la ATTR.

La modalidad 4 es un método para reducir la concentración sérica de la TTR, que comprende administrar una composición a un sujeto que lo necesite, en donde la composición comprende (i)

un agente de unión al ADN guiado por ARN o un ácido nucleico que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN y (ii) un ARN de guía que comprende:

a. una secuencia de guía que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82;

b. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82; o

c. una secuencia de guía que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82,

para reducir de ese modo la concentración sérica de la TTR.

La modalidad 5 es un método para reducir o prevenir la acumulación de los amiloides o las fibrillas amiloides que comprenden la TTR en un sujeto, que comprende administrar una composición a un sujeto que lo necesite, en donde la composición comprende (i) un agente de unión al ADN guiado por ARN o un nucleico ácido que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN y (ii) un ARN de guía que comprende:

a. una secuencia de guía que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82;

b. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82; o

c. una secuencia de guía que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82,

para reducir de ese modo la acumulación de los amiloides o las fibrillas amiloides.

La modalidad 6 es una composición que comprende un ARN de guía que comprende:

a. una secuencia de guía que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82;

b. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82; o

c. una secuencia de guía que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82.

La modalidad 7 es una composición que comprende un vector que codifica un ARN de guía, en donde el ARN de guía comprende:

a. una secuencia de guía que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82;

b. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82; o

c. una secuencia de guía que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82.

La modalidad 8 es la composición de la modalidad 6 o 7, para el uso en la inducción de una ruptura bicatenaria (DSB) dentro del gen TTR en una célula o sujeto.

La modalidad 9 es la composición de la modalidad 6 o 7, para el uso en la modificación del gen TTR en una célula o sujeto.

La modalidad 10 es la composición de la modalidad 6 o 7, para el uso en el tratamiento de la amiloidosis asociada con TTR (ATTR) en un sujeto.

La modalidad 11 es la composición de la modalidad 6 o 7, para el uso en la reducción de la concentración sérica de la TTR en un sujeto.

La modalidad 12 es la composición de la modalidad 6 o 7, para el uso en la reducción o prevención de la acumulación de los amiloides o las fibrillas amiloides en un sujeto.

La modalidad 13 es el método de cualquiera de las modalidades 1-5 o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 8-12, en donde la composición reduce los niveles de la TTR en suero.

La modalidad 14 es el método o la composición para el uso de la modalidad 13, en donde los niveles de la TTR en suero se reducen en al menos un 50 % en comparación con los niveles de la TTR en suero antes de la administración de la composición.

La modalidad 15 es el método o la composición para el uso de la modalidad 13, en donde los niveles de la TTR en suero se reducen en un 50-60 %, 60-70 %, 70-80 %, 80-90 %, 90-95 %, 95-98 %, 98-99 %, o 99-100 % en comparación con los niveles de la TTR en suero antes de la administración de la composición.

La modalidad 16 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-15, en donde la composición da como resultado la edición del gen TTR.

La modalidad 17 es el método o la composición para el uso de la modalidad 16, en donde la edición se calcula como un porcentaje de la población que se edita (porcentaje de edición).

La modalidad 18 es el método o la composición para el uso de la modalidad 17, en donde el porcentaje de edición está entre 30 y 99 % de la población.

La modalidad 19 es el método o la composición para el uso de la modalidad 17, en donde el porcentaje de edición está entre 30 y 35 %, 35 y 40 %, 40 y 45 %, 45 y 50 %, 50 y 55 %, 55 y 60 %, 60 y 65 %, 65 y 70 %, 70 y 75 %, 75 y 80 %, 80 y 85 %, 85 y 90 %, 90 y 95 %, o 95 y 99 % de la población.

La modalidad 20 es el método de cualquiera de las modalidades 1-5 o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 8-19, en donde la composición reduce el depósito de amiloide en al menos un tejido.

La modalidad 21 es el método o la composición para el uso de la modalidad 20, en donde al menos un tejido comprende uno o más de estómago, colon, nervio ciático o ganglio de la raíz dorsal.

La modalidad 22 es el método o la composición para el uso de la modalidad 20 o 21, en donde el depósito de amiloide se mide 8 semanas después de la administración de la composición.

La modalidad 23 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 20-22, en donde el depósito de amiloide se compara con un control negativo o un nivel medido antes de la administración de la composición.

La modalidad 24 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 20-23, en donde el depósito de amiloide se mide en una muestra de biopsia y/o por inmunotinción.

La modalidad 25 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 20-24, en donde el depósito de amiloide se reduce entre 30 y 35 %, 35 y 40 %, 40 y 45 %, 45 y 50 %, 50 y 55 %, 55 y 60 %, 60 y 65 %, 65 y 70 %, 70 y 75 %, 75 y 80 %, 80 y 85 %, 85 y 90 %, 90 y 95 %, o 95 y 99 % del depósito de amiloide observado en un control negativo.

La modalidad 26 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 20-25, en donde el depósito de amiloide se reduce entre 30 y 35 %, 35 y 40 %, 40 y 45 %, 45 y 50 %, 50 y 55 %, 55 y 60 %, 60 y 65 %, 65 y 70 %, 70 y 75 %, 75 y 80 %, 80 y 85 %, 85 y 90 %, 90 y 95 %, o 95 y 99 % del depósito de amiloide visto antes de la administración de la composición.

La modalidad 27 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-26, en donde la composición se administra o suministra al menos dos veces.

La modalidad 28 es el método o la composición para el uso de la modalidad 27, en donde la composición se administra o suministra al menos tres veces.

La modalidad 29 es el método o la composición para el uso de la modalidad 27, en donde la composición se administra o suministra al menos cuatro veces.

La modalidad 30 es el método o la composición para el uso de la modalidad 27, en donde la composición se administra o suministra hasta cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces.

La modalidad 31 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 27-30, en donde la administración o el suministro se produce en un intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 días.

La modalidad 32 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 27-30, en donde la administración o el suministro se produce en un intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 12, 13, 14 o 15 semanas.

La modalidad 33 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 27-30, en donde la administración o el suministro se produce en un intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 meses.

La modalidad 34 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la secuencia de guía se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82.

La modalidad 35 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el ARN de guía es al menos parcialmente complementario a una secuencia diana presente en el gen TTR humano.

La modalidad 36 es el método o la composición de la modalidad 35, en donde la secuencia diana está en el exón 1, 2, 3 o 4 del gen TTR humano.

La modalidad 37 es el método o la composición de la modalidad 35, en donde la secuencia diana está en el exón 1 del gen TTR humano.

La modalidad 38 es el método o la composición de la modalidad 35, en donde la secuencia diana está en el exón 2 del gen TTR humano.

La modalidad 39 es el método o la composición de la modalidad 35, en donde la secuencia diana está en el exón 3 del gen TTR humano.

La modalidad 40 es el método o la composición de la modalidad 35, en donde la secuencia diana está en el exón 4 del gen TTR humano.

La modalidad 41 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la secuencia de guía es complementaria a una secuencia diana en la cadena positiva de TTR.

La modalidad 42 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la secuencia de guía es complementaria a una secuencia diana en la cadena negativa de TTR.

La modalidad 43 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-40, en donde la primera secuencia de guía es complementaria a una primera secuencia diana en la cadena positiva del gen TTR, y en donde la composición comprende además una segunda secuencia de guía que es complementaria a una segunda secuencia diana en la cadena negativa del gen TTR.

La modalidad 44 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el ARN de guía comprende un ARNcr que comprende la secuencia de guía y comprende

además una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 126, en donde los nucleótidos de la SEQ ID NO: 126 sigue la secuencia de guía en su extremo 3'.

La modalidad 45 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el ARN de guía es uno de guía doble (ARNdg).

La modalidad 46 es el método o la composición de la modalidad 45, en donde el ARN de guía doble comprende un ARNcr que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 126, en donde los nucleótidos de la SEQ ID NO: 126 sigue la secuencia de guía en su extremo 3' y un ARNtr.

La modalidad 47 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-43, en donde el ARN de guía es uno de guía única (ARNsg).

La modalidad 48 es el método o la composición de la modalidad 47, en donde el ARNsg comprende una secuencia de guía que tiene el patrón de la SEQ ID NO: 3.

La modalidad 49 es el método o la composición de la modalidad 47, en donde el ARNsg comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3.

La modalidad 50 es el método o la composición de la modalidad 48 o 49, en donde cada N en la SEQ ID NO: 3 es cualquier nucleótido natural o no natural, en donde los N forman la secuencia de guía, y la secuencia de guía dirige a Cas9 al gen TTR.

La modalidad 51 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 47-50, en donde el ARNsg comprende cualquiera de las secuencias de guía de las SEQ ID NO: 5-82 y los nucleótidos de la SEQ ID NO: 126.

La modalidad 52 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 47-51, en donde el ARNsg comprende una secuencia de guía que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a una secuencia que se selecciona de las SEQ ID Nos: 87-124.

La modalidad 53 es el método o la composición de la modalidad 47, en donde el ARNsg comprende una secuencia que se selecciona de las SEQ ID Nos: 87-124.

La modalidad 54 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el ARN de guía comprende al menos una modificación.

La modalidad 55 es el método o la composición de la modalidad 54, en donde al menos una modificación incluye un nucleótido modificado con 2'-O-metil (2'-O-Me).

La modalidad 56 es el método o la composición de la modalidad 54 o 55, en donde al menos una modificación incluye un enlace de fosforotioato (PS) entre los nucleótidos.

La modalidad 57 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 54-56, en donde al menos una modificación incluye un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F).

La modalidad 58 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 54-57, en donde al menos una modificación incluye una modificación en uno o más de los primeros cinco nucleótidos en el extremo 5'.

La modalidad 59 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 54-58, en donde al menos una modificación incluye una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3'.

La modalidad 60 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 54-59, en donde al menos una modificación incluye enlaces PS entre los primeros cuatro nucleótidos.

La modalidad 61 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 54-60, en donde al menos una modificación incluye enlaces PS entre los últimos cuatro nucleótidos.

La modalidad 62 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 54-61, en donde al menos una modificación incluye nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5'.

La modalidad 63 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 54-62, en donde al menos una modificación incluye nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3'.

La modalidad 64 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 54-63, en donde el ARN de guía comprende los nucleótidos modificados de la SEQ ID NO: 3.

La modalidad 65 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-64, en donde la composición comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La modalidad 66 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-65, en donde el ARN de guía se asocia con una nanopartícula lipídica (LNP).

La modalidad 67 es el método o la composición de la modalidad 66, en donde la LNP comprende un lípido CCD.

La modalidad 68 es el método o la composición de la modalidad 67, en donde el lípido CCD es el lípido A o el lípido B.

La modalidad 69 es el método o la composición de la modalidad 66-68, en donde la LNP comprende un lípido neutro.

La modalidad 70 es el método o la composición de la modalidad 69, en donde el lípido neutro es DSPC.

La modalidad 71 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 66-70, en donde la LNP comprende un lípido auxiliar.

La modalidad 72 es el método o la composición de la modalidad 71, en donde el lípido auxiliar es el colesterol.

La modalidad 73 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 66-72, en donde la LNP comprende un lípido furtivo.

La modalidad 74 es el método o la composición de la modalidad 73, en donde el lípido furtivo es PEG2k-DMG.

La modalidad 75 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende además un agente de unión al ADN guiado por ARN.

La modalidad 76 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende además un ARNm que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN.

La modalidad 77 es el método o la composición de la modalidad 75 o 76, en donde el agente de unión al ADN guiado por ARN es una cleavasa Cas.

La modalidad 78 es el método o la composición de la modalidad 77, en donde el agente de unión al ADN guiado por ARN es Cas9.

La modalidad 79 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 75-78, en donde se modifica el agente de unión al ADN guiado por ARN.

La modalidad 80 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 75-79, en donde el agente de unión al ADN guiado por ARN es una nickasa.

La modalidad 81 es el método o la composición de la modalidad 79 u 80, en donde el agente de unión al ADN guiado por ARN modificado comprende una señal de localización nuclear (NLS).

La modalidad 82 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 75-81, en donde el agente de unión al ADN guiado por ARN es un Cas de un sistema CRISPR/Cas de tipo II.

La modalidad 83 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición es una formulación farmacéutica y comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

La modalidad 84 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-83, en donde la composición reduce o previene los amiloides o las fibrillas amiloides que comprenden la TTR.

La modalidad 85 es el método o la composición para el uso de la modalidad 84, en donde los amiloides o las fibrillas amiloides están en los nervios, el corazón o la vía gastrointestinal.

La modalidad 86 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-83, en donde la unión de extremos no homólogos (NHEJ) conduce a una mutación durante la reparación de una DSB en el gen TTR.

La modalidad 87 es el método o la composición para el uso de la modalidad 86, en donde la NHEJ conduce a una deleción o inserción de uno o más nucleótidos durante la reparación de una DSB en el gen TTR.

La modalidad 88 es el método o la composición para el uso de la modalidad 87, en donde la deleción o la inserción de uno o más nucleótidos induce un cambio de marco o una mutación sin sentido en el gen TTR.

La modalidad 89 es el método o la composición para el uso de la modalidad 87, en donde se induce un cambio de marco o una mutación sin sentido en el gen TTR de al menos el 50 % de las células hepáticas.

La modalidad 90 es el método o la composición para el uso de la modalidad 89, en donde se induce un cambio de marco o una mutación sin sentido en el gen TTR de 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 % u 80 %, 80 %-90 %, 90-95 %, 95 %-99 %, o 99 %-100 % de las células hepáticas.

La modalidad 91 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 87-90, en donde se produce una deleción o inserción de uno o más nucleótidos en el gen TTR al menos 50 veces o más que en los sitios fuera de la diana.

La modalidad 92 es el método o la composición para el uso de la modalidad 91, en donde la deleción o la inserción de uno o más nucleótidos se produce en el gen TTR de 50 veces a 150 veces, de 150 veces a 500 veces, de 500 veces a 1,500 veces, de 1,500 veces a 5,000 veces, de 5,000 veces a 15,000 veces, de 15,000 veces a 30,000 veces, o de 30,000 veces a 60,000 veces más que en los sitios fuera de la diana.

La modalidad 93 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 87-92, en donde la deleción o la inserción de uno o más nucleótidos ocurre en menos de, o igual a, 3, 2, 1 o 0 sitio o sitios fuera de la diana en los hepatocitos primarios humanos, opcionalmente en donde el sitio o los sitios fuera de la diana no se producen en una región de codificación de proteínas en el genoma de los hepatocitos humanos primarios.

La modalidad 94 es el método o la composición para el uso de la modalidad 93, en donde la deleción o la inserción de uno o más nucleótidos se produce en varios sitios fuera de la diana en los

hepatocitos primarios humanos, que es menor que el número de sitios fuera de la diana en los que se produce una deleción o inserción de uno o más nucleótidos en las células que sobreexpresan Cas9, opcionalmente en donde el sitio o los sitios fuera de la diana no se producen en una región de codificación de proteínas en el genoma de los hepatocitos primarios humanos.

La modalidad 95 es el método o la composición para el uso de la modalidad 94, en donde las células que sobreexpresan Cas9 son células HEK293 que expresan de manera estable Cas9.

La modalidad 96 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 93-95, en donde el número de sitios fuera de la diana en los hepatocitos primarios humanos se determina por análisis del ADN genómico de los hepatocitos primarios humanos transfectados in vitro con el ARNm de Cas9 y el ARN de guía, opcionalmente en donde el sitio o los sitios fuera de la diana no se producen en una región de codificación de proteínas en el genoma de los hepatocitos primarios humanos.

La modalidad 97 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 93-95, en donde el número de sitios fuera de la diana en los hepatocitos primarios humanos se determina mediante un ensayo de inserción de oligonucleótidos que comprende analizar el ADN genómico de los hepatocitos primarios humanos transfectados in vitro con el ARNm de Cas9, el ARN de guía y un oligonucleótido donante, opcionalmente en donde el sitio o los sitios fuera de la diana no se producen en una región de codificación de proteínas en el genoma de los hepatocitos primarios humanos.

La modalidad 98 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-43 o 47-97, en donde la secuencia del ARN de guía es:

a) SEQ ID NO: 92 o 104;

b) SEQ ID NO: 87, 89, 96, o 113;

c) SEQ ID NO: 100, 102, 106, 111, o 112; o

d) SEQ ID NO: 88, 90, 91, 93, 94, 95, 97, 101, 103, 108, o 109,

opcionalmente en donde el ARN de guía no produce indeles en el sitio o los sitios fuera de la diana que se producen en una región de codificación de proteínas en el genoma de los hepatocitos primarios humanos.

La modalidad 99 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-98, en donde la administración de la composición reduce los niveles de la TTR en el sujeto.

La modalidad 100 es el método o la composición para el uso de la modalidad 99, en donde los niveles de la TTR se reducen en al menos un 50 %.

La modalidad 101 es el método o la composición para el uso de la modalidad 100, en donde los niveles de la TTR se reducen en un 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 % u 80 %, 80 %-90 %, 90-95 %, 95 %-99 % o 99 %-100 %.

La modalidad 102 es el método o la composición para el uso de la modalidad 100 o 101, en donde los niveles de la TTR se miden en suero, plasma, sangre, líquido cefalorraquídeo o esputo.

La modalidad 103 es el método o la composición para el uso de la modalidad 100 o 101, en donde los niveles de la TTR se miden en hígado, plexos coroideos y/o retina.

La modalidad 104 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 99-103, en donde los niveles de la TTR se miden mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

La modalidad 105 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-104, en donde el sujeto tiene la ATTR.

La modalidad 106 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-105, en donde el sujeto es un ser humano.

La modalidad 107 es el método o la composición para el uso de la modalidad 105 o 106, en donde el sujeto tiene la ATTRwt.

La modalidad 108 es el método o la composición para el uso de la modalidad 105 o 106, en donde el sujeto tiene la ATTR hereditaria.

La modalidad 109 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5, 8-106 o 108, en donde el sujeto tiene antecedentes familiares de la ATTR.

La modalidad 110 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5, 8-106 o 108-109, en donde el sujeto tiene la polineuropatía amiloide familiar.

La modalidad 111 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-110, en donde el sujeto tiene solo o predominantemente síntomas nerviosos de la ATTR.

La modalidad 112 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-110, en donde el sujeto tiene la miocardiopatía amiloide familiar.

La modalidad 113 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5, 8-109 o 112, en donde el sujeto tiene síntomas cardíacos únicos o predominantemente de la ATTR.

La modalidad 114 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-113, en donde el sujeto expresa la TTR que tiene una mutación V30.

La modalidad 115 es el método o la composición para el uso de la modalidad 114, en donde la mutación V30 es V30A, V30G, V30L o V30M.

La modalidad 116 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-113, en donde el sujeto expresa la TTR que tiene una mutación T60.

La modalidad 117 es el método o la composición para el uso de la modalidad 116, en donde la mutación T60 es T60A.

La modalidad 118 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-113, en donde el sujeto expresa la TTR que tiene una mutación V122.

La modalidad 119 es el método o la composición para el uso de la modalidad 118, en donde la mutación V122 es V122A, V122I o V122(-).

La modalidad 120 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-119, en donde el sujeto expresa la TTR de tipo salvaje.

La modalidad 121 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5, 8-107 o 120, en donde el sujeto no expresa la TTR que tiene una mutación V30, T60 o V122.

La modalidad 122 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5, 8-107 o 120-121, en donde el sujeto no expresa la TTR que tiene una mutación patológica.

La modalidad 123 es el método o la composición para el uso de la modalidad 121, en donde el sujeto es homocigótico para la TTR de tipo salvaje.

La modalidad 124 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-123, en donde después de la administración el sujeto tiene una mejora, estabilización o ralentización de la evolución en los síntomas de la neuropatía sensitivomotora.

La modalidad 125 es el método o la composición para el uso de la modalidad 124, en donde la mejora, la estabilización o la ralentización de la evolución en la neuropatía sensorial se miden mediante el uso de un electromiograma, pruebas de conducción nerviosa o resultados informados por el paciente.

La modalidad 126 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-125, en donde el sujeto tiene una mejora, estabilización o ralentización de la evolución en los síntomas de la insuficiencia cardíaca congestiva.

La modalidad 127 es el método o la composición para el uso de la modalidad 126, en donde la mejora, la estabilización o la ralentización de la evolución en la insuficiencia cardíaca congestiva se miden mediante el uso de pruebas de biomarcadores cardíacos, pruebas de función pulmonar, radiografías de tórax o electrocardiografía.

La modalidad 128 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-127, en donde la composición o la formulación farmacéutica se administran a través de un vector viral.

La modalidad 129 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-127, en donde la composición o la formulación farmacéutica se administran a través de nanopartículas lipídicas.

La modalidad 130 es el método o la composición para el uso de cualquiera de las modalidades 1-5 u 8-129, en donde el sujeto se analiza para detectar mutaciones específicas en el gen TTR antes de administrar la composición o la formulación.

La modalidad 131 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 5.

La modalidad 132 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 6.

La modalidad 133 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 7.

La modalidad 134 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 8.

La modalidad 135 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 9.

La modalidad 136 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 10.

La modalidad 137 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 11.

La modalidad 138 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 12.

La modalidad 139 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 13.

La modalidad 140 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 14.

La modalidad 141 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 15.

La modalidad 142 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 16.

La modalidad 143 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 17.

La modalidad 144 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 18.

La modalidad 145 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 19.

La modalidad 146 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 20.

La modalidad 147 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 21.

La modalidad 148 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 22.

La modalidad 149 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 23.

La modalidad 150 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 24.

La modalidad 151 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 25.

La modalidad 152 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 26.

La modalidad 153 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 27.

La modalidad 154 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 28.

La modalidad 155 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 29.

La modalidad 156 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 30.

La modalidad 157 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 31.

La modalidad 158 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 32.

La modalidad 159 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 33.

La modalidad 160 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 34.

La modalidad 161 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 35.

La modalidad 162 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 36.

La modalidad 163 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 37.

La modalidad 164 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 38.

La modalidad 165 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 39.

La modalidad 166 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 40.

La modalidad 167 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 41.

La modalidad 168 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 42.

La modalidad 169 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 43.

La modalidad 170 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 44.

La modalidad 171 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 45.

La modalidad 172 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 46.

La modalidad 173 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 47.

La modalidad 174 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 48.

La modalidad 175 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 49.

La modalidad 176 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 50.

La modalidad 177 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 51.

La modalidad 178 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 52.

La modalidad 179 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 53.

La modalidad 180 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 54.

La modalidad 181 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 55.

La modalidad 182 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 56.

La modalidad 183 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 57.

La modalidad 184 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 58.

La modalidad 185 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 59.

La modalidad 186 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 60.

La modalidad 187 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 61.

La modalidad 188 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 62.

La modalidad 189 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 63.

La modalidad 190 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 64.

La modalidad 191 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 65.

La modalidad 192 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 66.

La modalidad 193 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 67.

La modalidad 194 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 68.

La modalidad 195 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 69.

La modalidad 196 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 70.

La modalidad 197 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 71.

La modalidad 198 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 72.

La modalidad 199 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 73.

La modalidad 200 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 74.

La modalidad 201 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 75.

La modalidad 202 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 76.

La modalidad 203 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 77.

La modalidad 204 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 78.

La modalidad 205 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 79.

La modalidad 206 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 80.

La modalidad 207 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 81.

La modalidad 208 es el método o la composición de cualquiera de las modalidades 1-130, en donde la secuencia se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82 es la SEQ ID NO: 82.

La modalidad 209 es un uso de una composición o formulación de cualquiera de las modalidades 6-208 para la preparación de un medicamento para tratar un sujeto humano que tiene la ATTR.

También se describe el uso de una composición o formulación de cualquiera de las modalidades anteriores para la preparación de un medicamento para tratar un sujeto humano que tiene la ATTR.

También se describe cualquiera de las composiciones o las formulaciones anteriores para el uso en el tratamiento de la ATTR o para modificar (por ejemplo, formar un indel en, o formar un cambio de marco o una mutación sin sentido en) un gen *TTR*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un esquema del cromosoma 18 con las regiones del gen TTR que se dirigen por las secuencias de guía proporcionadas en la Tabla 1.

La Figura 2 muestra el análisis fuera de la diana en las células HEK293_Cas9 de ciertos ARN de guía doble dirigidos a TTR. El sitio en la diana se designa mediante un cuadrado relleno para cada ARN de guía doble probado, mientras que los círculos cerrados representan un sitio fuera de la diana potencial.

La Figura 3 muestra el análisis fuera de la diana en las células HEK_Cas9 de ciertos ARN de guía única dirigidos a TTR. El sitio en la diana se designa por un cuadrado relleno para cada ARN de guía única probado, mientras que los círculos abiertos representan un sitio fuera de la diana potencial.

La Figura 4 muestra las curvas de respuesta a la dosis de nanopartículas lipídicas formuladas con ARNsg específicos a TTR humano en los hepatocitos primarios humanos.

La Figura 5 muestra las curvas de respuesta a la dosis de nanopartículas lipídicas formuladas con ARNsg específicos a TTR humano en los hepatocitos primarios de cyno.

La Figura 6 muestra las curvas de respuesta a la dosis de nanopartículas lipídicas formuladas con ARNsg específicos a TTR de cyno en los hepatocitos primarios de cyno.

La Figura 7 muestra el porcentaje de edición (% de edición) de TTR y la reducción de la TTR secretada después de la administración del guía en secuencias de las células HUH7 proporcionadas en el eje x. Los valores se normalizan a la cantidad de proteína alfa-1-antitripsina (AAT).

La Figura 8 muestra el análisis de electrotransferencia de la TTR intracelular después de la administración de los guías dirigidos (enumerados en la Tabla 1) en las células HUH7.

La Figura 9 muestra el porcentaje de edición en el hígado de TTR observado después de la administración de las formulaciones de LNP a ratones con TTR humanizado (G481-G499) o murino (G282). Nota: los primeros tres '0' en cada ID de guía se omiten de la figura, por ejemplo, "G481" es "G000481" en las Tablas 2 y 3.

Las Figuras 10A-B muestran los niveles de la TTR en suero observados después de los regímenes de dosificación indicados en el eje horizontal como μg/ml (Figura 10A) o porcentaje de TSS control (Figura 10B). MPK = mg/kg en todo.

Las Figuras 11A-B muestran los niveles de la TTR en suero observados después de los regímenes de dosificación indicados en el eje horizontal para dosis de 1 mg/kg (Figura 11A) o 0.5 mg/kg (Figura 11B). Los datos para una dosis única de 2 mg/kg se incluyen en la columna derecha en ambos paneles.

Las Figuras 12A-B muestran el porcentaje de edición en el hígado observado después de los regímenes de dosificación indicados en el eje horizontal para dosis de 1 mg/kg (Figura 12A) o 0.5 mg/kg (Figura 12B). La Figura 12C muestra el porcentaje de edición en el hígado observado después de una dosis única a 0.5, 1 o 2 mg/kg.

La Figura 13 muestra el porcentaje de edición en el hígado observado después de la administración de las formulaciones de LNP a ratones humanizados con respecto al gen TTR. Nota: los primeros tres '0' en cada ID de guía se omiten de la figura, por ejemplo, "G481" es "G000481" en las Tablas 2 y 3.

Las Figuras 14A-B muestran que existe una correlación entre la edición en el hígado (Figura 14A) y los niveles de la TTR humana en suero (Figura 14B) después de la administración de las formulaciones de LNP a ratones humanizados con respecto al gen TTR. Nota: los primeros tres '0' en cada ID de guía se omiten de la figura, por ejemplo, "G481" es "G000481" en las Tablas 2 y 3.

Las Figuras 15A-B muestran que existe una respuesta a la dosis con respecto al porcentaje de edición (Figura 15A) y los niveles de la TTR en suero (Figura 15B) en ratones de tipo salvaje después de la administración de las formulaciones de LNP que comprenden el guía G502, que es homólogo cruzado entre ratón y cyno.

La Figura 16 muestra las curvas de respuesta a la dosis de nanopartículas lipídicas formuladas con ARNsg específicos a TTR humano en los hepatocitos primarios de cyno.

La Figura 17 muestra las curvas de respuesta a la dosis de nanopartículas lipídicas formuladas con ARNsg específicos a TTR de cyno en los hepatocitos primarios humanos.

La Figura 18 muestra las curvas de respuesta a la dosis de nanopartículas lipídicas formuladas con ARNsg específicos a TTR de cyno en los hepatocitos primarios de cyno.

Las Figuras 19A-D muestran la TTR en suero (% TSS; Figuras 19A y 19C) y los resultados de edición después de la dosificación de las formulaciones de LNP en las relaciones y las cantidades indicadas (Figuras 19B y 19D).

La Figura 20 muestra el análisis fuera de la diana de ciertos ARN de guía única en los hepatocitos primarios humanos (PHH) dirigidos a TTR. En el gráfico, los cuadrados rellenos representan la identificación del sitio de corte en la diana, mientras que los círculos abiertos representan la identificación de sitios fuera de la diana potenciales.

Las Figuras 21A-B muestran el porcentaje de edición en la diana (ONT, Figura 21A) y en dos sitios fuera de la diana (OT2 y OT4) en los hepatocitos primarios humanos después de la administración de las nanopartículas lipídicas formuladas con G000480. La Figura 21B es una versión reescalada de los datos de OT2, OT4 y control negativo (Neg Cont) en la Figura 21A.

Las Figuras 22A-B muestran el porcentaje de edición en la diana (ONT, Figura 22A) y en un sitio fuera de la diana (OT4) en los hepatocitos primarios humanos después de la administración de las nanopartículas lipídicas formuladas con G000486. La Figura 22B es una versión reescalada de los datos de OT4 y control negativo (Neg Cont) en la Figura 22A.

Las Figuras 23A-B muestran el porcentaje de edición (Figura 23A) y el número de eventos de inserción y deleción en el locus TTR (Figura 23B). La Figura 23A muestra el porcentaje de edición en el locus TTR en los grupos de control y tratamiento (dosificado con nanopartículas lipídicas formuladas con ARNsg específico a TTR). La Figura 23B muestra el número de eventos de inserción y deleción en el locus TTR cuando se observó la edición en el grupo de tratamiento de la Figura 23A.

Las Figuras 24A-B muestran los niveles de TTR en suero circulante (Figura 24A) y líquido cefalorraquídeo (CSF) (Figura 24B), respectivamente, en µg/ml para los grupos de control y tratamiento (dosificado con nanopartículas lipídicas formuladas con ARNsg específico a TTR). El tratamiento dio como resultado >99 % de disminución de los niveles de la TTR en suero.

Las Figuras 25A-D muestran las imágenes de inmunohistoquímica con tinción para la TTR en el estómago (Figura 25A), colon (Figura 25B), nervio ciático (Figura 25C) y ganglio de la raíz dorsal (DRG) (Figura 25D) de los ratones de control y tratamiento (dosificados con nanopartículas lipídicas formuladas con ARNsg específico a TTR). A la derecha, los gráficos de barras muestran una reducción en la tinción de la TTR 8 semanas después del tratamiento en los ratones tratados, medido por el porcentaje de área ocupada para cada tipo de tejido.

Las Figuras 26A-C muestran la edición de TTR en el hígado (Figura 26A) y los resultados de la TTR en suero (en μg/ml (Figura 26B) y como el porcentaje del control tratado con TSS (Figura 26C)), respectivamente, de los ratones TTR humanizados a los que se les administraron las formulaciones de LNP en un intervalo de dosis con los guías G000480, G000488, G000489 y G000502 y que contienen el ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 1) en una relación 1:1 en peso con respecto al guía.

Las Figuras 27A-C muestran la edición de TTR en el hígado (Figura 27A) y los resultados de la TTR en suero (en μg/ml (Figura 27B) y como el porcentaje del control tratado con TSS (Figura 27C)), respectivamente, de los ratones TTR humanizados a los que se les administraron las formulaciones de LNP en un intervalo de dosis con los guías G000481, G000482, G000486 y G000499 y que contienen el ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 1) en una relación 1:1 en peso con respecto al guía.

Las Figuras 28A-C muestran la edición de TTR en el hígado (Figura 28A) y los resultados de la TTR en suero (en μg/ml (Figura 28B) y como el porcentaje del control tratado con TSS (Figura 28C)), respectivamente, de los ratones TTR humanizados a los que se les administraron las formulaciones de LNP en un intervalo de dosis con los guías G000480, G000481, G000486, G000499 y G000502 y que contienen el ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 1) en una relación de 1:2 en peso con respecto al guía.

La Figura 29 muestra la expresión relativa del ARNm de TTR en los hepatocitos primarios humanos (PHH) después del tratamiento con las LNPs que comprenden el ARNm de Cas9 y un ARNg según se indica, en comparación con los controles negativos (no tratados).

La Figura 30 muestra la expresión relativa del ARNm de TTR en los hepatocitos primarios humanos (PHH) después del tratamiento con las LNPs que comprenden el ARNm de Cas9 y un ARNg según se indica, en comparación con los controles negativos (no tratados).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A continuación se hará referencia en detalle a ciertas modalidades de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. Aunque la invención se describirá en conjunto con las modalidades ilustradas, se entenderá que no se destinan a limitar la invención a esas modalidades. Por el contrario, se desea que la invención cubra todas las alternativas, las modificaciones y los equivalentes que puedan incluirse dentro de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Antes de continuar describiendo las presentes enseñanzas en detalle, debe entenderse que la descripción no se limita a las etapas del proceso o las composiciones específicas, ya que pueden variar. Debe aclararse que, como se usan en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto claramente lo indique de cualquier otra manera. Así, por ejemplo, la referencia a "un conjugado" incluye una pluralidad de conjugados y la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de células y similares.

Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Se entiende que los valores medidos y medibles son aproximados, teniendo en cuenta los dígitos significativos y el error asociado con la medición. Además, el uso de "comprenden", "comprende", "que comprende", "contienen", "contiene", "que contiene", "incluyen", "incluye" y "que incluye" no pretende ser limitantes. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada son solo ejemplares y explicativas y no son restrictivas de las enseñanzas.

A menos que se indique específicamente en la especificación anterior, las modalidades en la especificación que citan "que comprenden" varios componentes también se contemplan como "que consisten en" o "que consisten esencialmente de" los componentes citados; las modalidades en la especificación que citan "que consisten en" diversos componentes también se contemplan como "que comprenden" o "que consisten esencialmente de" los componentes citados; y las modalidades en la especificación que citan "que consisten esencialmente de" varios componentes también se contemplan como "que consisten en" o "que comprenden" los componentes citados (esta intercambiabilidad no se aplica al uso de estos términos en las reivindicaciones). El término "o" se usa en un sentido inclusivo, es decir, equivalente a "y/o", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los encabezados de sección usados en la presente descripción son solo para propósitos de organización y no deben interpretarse como limitantes del tema deseado de ninguna manera. En el

caso de que cualquier material incorporado por referencia contradiga cualquier término definido en esta especificación o cualquier otro contenido expreso de esta especificación, esta especificación controla. Si bien las presentes enseñanzas se describen junto con diversas modalidades, no se pretende que las presentes enseñanzas se limiten a tales modalidades. Por el contrario, las presentes enseñanzas abarcan diversas alternativas, modificaciones y equivalentes, como apreciarán los expertos en la técnica.

I. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases, como se usan en la presente descripción, pretenden tener los siguientes significados:

"Polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan en la presente descripción para referirse a un compuesto multimérico que comprende nucleósidos o análogos de nucleósidos que tienen bases heterocíclicas nitrogenadas o análogos de bases unidos entre sí a lo largo de una cadena principal, que incluye ARN convencional, ADN, ARN-ADN mixto y los polímeros que son análogos de estos. Una "cadena principal" de ácido nucleico puede estar compuesta por una variedad de enlaces, que incluyen uno o más enlaces de azúcar-fosfodiéster, enlaces péptido-ácido nucleico ("ácidos nucleicos peptídicos" o PNA; PCT núm. WO 95/32305), enlaces de fosforotioato, enlaces de metilfosfonato, o las combinaciones de estos. Los grupos de azúcar de un ácido nucleico pueden ser ribosa, desoxirribosa o los compuestos similares con sustituciones, por ejemplo, sustituciones de metoxi 2' o haluro 2'. Las bases nitrogenadas pueden ser bases convencionales (A, G, C, T, U), análogos de estas (por ejemplo, uridinas modificadas tales como 5-metoxiuridina, pseudouridina, o N1-metilpseudouridina, u otras); inosina; derivados de purinas o pirimidinas (por ejemplo, N^4-metildesoxiguanosina, deaza- o aza-purinas, deaza- o aza-pirimidinas, bases de pirimidina con grupos sustituyentes en la posición 5 o 6 (por ejemplo, 5-metilcitosina), bases de purina con un sustituyente en las posiciones 2, 6 u 8, 2-amino-6-metilaminopurina, O^6-metilguanina, 4-tio-pirimidinas, 4-amino-pirimidinas, 4-dimetilhidrazina-pirimidinas y O^4-alquil-pirimidinas; patente de los Estados Unidos núm. 5,378,825 y PCT núm. WO 93/13121). Para una discusión general véase*The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams y otros, ed., 11th ed., 1992). Los ácidos nucleicos pueden incluir uno o más residuos "abásicos" en los que la cadena principal no incluye una base nitrogenada para la posición o posiciones del polímero (Patente de los Estados Unidos núm. 5,585,481). Un ácido nucleico puede comprender solo azúcares, bases y enlaces de ARN o ADN convencionales, o puede incluir componentes y sustituciones convencionales (por ejemplo, bases convencionales con enlaces metoxi 2', o polímeros que contienen bases convencionales y

uno o más análogos de bases). El ácido nucleico incluye "ácido nucleico bloqueado" (LNA), un análogo que contiene uno o más monómeros de nucleótidos de LNA con una unidad de furanosa bicíclica bloqueada en una conformación de azúcar que simula el ARN, lo que mejora la afinidad de hibridación hacia las secuencias complementarias de ARN y ADN (Vester y Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41). El ARN y el ADN tienen grupos de azúcar diferentes y pueden diferir por la presencia de uracilo o análogos de este en el ARN y timina o análogos de esta en el ADN.

El "ARN de guía", el "ARNg" y el "guía" se usan en la presente descripción de manera intercambiable para referirse a un ARNcr (también conocido como ARN CRISPR), o la combinación de un ARNcr y un ARNtr (también conocido como ARNtracr). El ARNcr y el ARNtr pueden asociarse como una molécula única de ARN (ARN de guía única, ARNsg) o en dos moléculas separadas de ARN (ARN de guía doble, ARNdg). El "ARN de guía" o "ARNg" se refiere a cada tipo. El ARNtr puede ser una secuencia natural, o una secuencia de ARNtr con modificaciones o variaciones en comparación con las secuencias naturales.

Como se usa en la presente descripción, una "secuencia de guía" se refiere a una secuencia dentro de un ARN de guía que es complementaria a una secuencia diana y funciona para dirigir un ARN de guía a una secuencia diana para su unión o modificación (por ejemplo, escisión) por un agente de unión al ADN guiado por ARN. Una "secuencia de guía" también puede denominarse una "secuencia de orientación" o una "secuencia espaciadora". Una secuencia de guía puede tener 20 pares de bases de longitud, por ejemplo, en el caso de Streptococcus pyogenes (es decir, Cas9 Spy) y homólogos/ortólogos de Cas9 relacionados. Las secuencias más cortas o más largas también pueden usarse como guías, por ejemplo, de 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, en algunas modalidades, la secuencia de guía comprende al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82. En algunas modalidades, la secuencia diana está en un gen o en un cromosoma, por ejemplo, y es complementaria a la secuencia de guía. En algunas modalidades, el grado de complementariedad o identidad entre una secuencia de guía y su secuencia diana correspondiente puede ser de aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 88 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. Por ejemplo, en algunas modalidades, la secuencia de guía comprende una secuencia con aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 88 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad para al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 5-82. En algunas modalidades, la secuencia de guía y la región diana pueden

ser 100 % complementarias o idénticas. En otras modalidades, la secuencia de guía y la región diana pueden contener al menos una incompatibilidad. Por ejemplo, la secuencia de guía y la secuencia diana pueden contener 1, 2, 3 o 4 incompatibilidades, donde la longitud total de la secuencia diana es al menos 17, 18, 19, 20 o más pares de bases. En algunas modalidades, la secuencia de guía y la región diana pueden contener 1-4 incompatibilidades donde la secuencia de guía comprende al menos 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia de guía y la región diana pueden contener 1, 2, 3 o 4 incompatibilidades donde la secuencia de guía comprende 20 nucleótidos.

Las secuencias diana para las proteínas Cas incluyen tanto las cadenas positivas como las negativas del ADN genómico (es decir, la secuencia dada y el complemento inverso de la secuencia), ya que un sustrato de ácido nucleico para una proteína Cas es un ácido nucleico bicatenario. En consecuencia, cuando se dice que una secuencia de guía es "complementaria a una secuencia diana", debe entenderse que la secuencia de guía puede dirigir un ARN de guía para que se una al complemento inverso de una secuencia diana. Por lo tanto, en algunas modalidades, donde la secuencia de guía se une al complemento inverso de una secuencia diana, la secuencia de guía es idéntica a ciertos nucleótidos de la secuencia diana (por ejemplo, la secuencia diana que no incluye el PAM) excepto por la sustitución de U por T en la secuencia de guía.

Como se usa en la presente descripción, un "agente de unión al ADN guiado por ARN" significa un polipéptido o complejo de polipéptidos que tienen actividad de unión a ARN y ADN, o una subunidad de unión al ADN de dicho complejo, en donde la actividad de unión al ADN es específica a la secuencia y depende de la secuencia del ARN. Los ejemplos de los agentes de unión al ADN guiados por ARN incluyen las cleavasas/nickasas Cas y sus formas inactivadas ("agentes de unión al ADN dCas"). La "nucleasa Cas", también llamada "proteína Cas", como se usa en la presente descripción, abarca cleavasas Cas, nickasas Cas y agentes de unión al ADN dCas. Las cleavasas/nickasas Cas y los agentes de unión al ADN dCas incluyen un complejo Csm o Cmr de un sistema CRISPR tipo III, Cas10, Csm1 o la subunidad Cmr2 de este, un complejo Cascade de un sistema CRISPR tipo I, la subunidad Cas3 de este y nucleasas Cas de Clase 2. Como se usa en la presente descripción, una "nucleasa Cas de clase 2" es un polipéptido de cadena sencilla con actividad de unión al ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas9 o una nucleasa Cpf1. Las nucleasas Cas de Clase 2 incluyen las cleavasas Cas de Clase 2 y las nickasas Cas de Clase 2 (por ejemplo, variantes H840A, D10A o N863A), que además tienen actividad de nickasa o cleavasas de ADN guiadas por ARN y agentes de unión al ADN dCas de clase 2, en los cuales la actividad

de cleavasa/nickasa está inactivada. Las nucleasas Cas de clase 2 incluyen, por ejemplo, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (por ejemplo, variantes N497A, R661A, Q695A, Q926A), HypaCas9 (por ejemplo, variantes N692A, M694A, Q695A, H698A), proteínas eSPCas9(1.0) (por ejemplo, variantes K810A, K1003A, R1060A), y eSPCas9(1.1) (por ejemplo, variantes K848A, K1003A, R1060A) y las modificaciones de estas. La proteína Cpf1, Zetsche y otros, *Cell*, 163: 1-13 (2015), es homóloga a Cas9 y contiene un dominio de nucleasa de tipo RuvC. Las secuencias deCpf1 de Zetsche se incorporan por referencia en su totalidad. *Véase*, *por ejemplo*, Zetsche, Tablas S1 y S3. "Cas9" abarca Cas9 Spy, las variantes de Cas9 enumeradas en la presente descripción y los equivalentes de estas. Véase, *por ejemplo*Makarova y otros, *Nat Rev Microbiol*, 13 (11): 722-36 (2015); Shmakov y otros, *Molecular Cell,* 60:385-397 (2015).

La "uridina modificada" se usa en la presente descripción para referirse a un nucleósido distinto de timidina con los mismos aceptores de enlaces de hidrógeno que la uridina y una o más diferencias estructurales de la uridina. En algunas modalidades, una uridina modificada es una uridina sustituida, es decir, una uridina en la que uno o más sustituyentes no protónicos (por ejemplo, alcoxi, tal como metoxi) ocupan el lugar de un protón. En algunas modalidades, una uridina modificada es pseudouridina. En algunas modalidades, una uridina modificada es una pseudouridina sustituida, es decir, una pseudouridina en la que uno o más sustituyentes no protónicos (por ejemplo, alquilo, tal como metilo) toman el lugar de un protón. En algunas modalidades, una uridina modificada es cualquiera de una uridina sustituida, pseudouridina o una pseudouridina sustituida.

La "posición de uridina", como se usa en la presente descripción, se refiere a una posición en un polinucleótido ocupado por una uridina o una uridina modificada. Así, por ejemplo, un polinucleótido en el que "el 100 % de las posiciones de uridina son uridinas modificadas" contiene una uridina modificada en cada posición que sería una uridina en un ARN convencional (donde todas las bases son bases estándar A, U, C o G) de la misma secuencia. A menos que se indique lo contrario, una U en una secuencia de polinucleótidos de una tabla de secuencias o listado de secuencias en, o acompañando, esta descripción puede ser una uridina o una uridina modificada.

Como se usa en la presente descripción, se considera que una primera secuencia "comprende una secuencia con al menos X % de identidad con" una segunda secuencia si una alineación de la primera secuencia con la segunda secuencia muestra que X % o más de las posiciones de la segunda secuencia en su totalidad coinciden con la primera secuencia. Por ejemplo, la secuencia AAGA comprende una secuencia con un 100 % de identidad con la secuencia AAG porque una

alineación daría un 100 % de identidad en el sentido de que hay coincidencias con las tres posiciones de la segunda secuencia. Las diferencias entre el ARN y el ADN (generalmente el intercambio de uridina por timidina o viceversa) y la presencia de análogos de nucleósidos, como las uridinas modificadas, no contribuyen a las diferencias de identidad o complementariedad entre los polinucleótidos siempre que los nucleótidos relevantes (tales como la timidina, uridina o uridina modificada) tienen el mismo complemento (por ejemplo, adenosina para toda la timidina, uridina o uridina modificada; otro ejemplo es la citosina y la 5-metilcitosina, ambas con guanosina o guanosina modificada como complemento). Así, por ejemplo, la secuencia 5'-AXG donde X es cualquier uridina modificada, como pseudouridina, N1-metil pseudouridina o 5-metoxiuridina, se considera 100 % idéntica a AUG en que ambas son perfectamente complementarias a la misma secuencia (5'-CAU). Ejemplos de algoritmos de alineación son los algoritmos de Smith-Waterman y Needleman-Wunsch, que son bien conocidos en la técnica. Un experto en la técnica entenderá que las opciones de algoritmo y las configuraciones de parámetros son apropiadas para un par de secuencias dadas a alinear; para secuencias de longitud generalmente similar e identidad esperada >50 % para aminoácidos o >75 % para nucleótidos, el algoritmo de Needleman-Wunsch con la configuración predeterminada de la interfaz del algoritmo de Needleman-Wunsch proporcionada por el EBI en el servidor web www.ebi.ac.uk es generalmente apropiado.

El "ARNm" se usa en la presente descripción para referirse a un polinucleótido que no es ADN y comprende un marco de lectura abierto que puede traducirse en un polipéptido (es decir, puede servir como un sustrato para la traducción por un ribosoma y ARNt amino-acilado). El ARNm puede comprender una cadena principal de fosfato-azúcar que incluye residuos de ribosa o análogos de estos, por ejemplo, residuos de 2'-metoxi ribosa. En algunas modalidades, los azúcares de una cadena principal de fosfato-azúcar del ARNm consisten esencialmente en residuos de ribosa, residuos de 2'-metoxi ribosa, o una combinación de estos. En general, los ARNm no contienen una cantidad sustancial de residuos de timidina (por ejemplo, 0 residuos o menos de 30, 20, 10, 5, 4, 3 o 2 residuos de timidina; o menos del 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0.5 %, 0.2 % o 0.1 % de contenido de timidina). Un ARNm puede contener uridinas modificadas en algunas o todas sus posiciones de uridina.

Como se usa en la presente descripción, el "contenido de mínima uridina" de un marco de lectura abierto (ORF) dado es el contenido de uridina de un ORF que (a) usa un codón de mínima uridina en cada posición y (b) codifica la misma secuencia de aminoácidos que el ORF dado. El codón o los codones de mínima uridina para un aminoácido dado es el codón o son los codones con la

menor cantidad de uridinas (generalmente 0 o 1, excepto un codón para fenilalanina, donde el codón de mínima uridina tiene 2 uridinas). Los residuos de uridina modificada se consideran equivalentes a las uridinas con el fin de evaluar el contenido de mínima uridina.

Como se usa en la presente descripción, el "contenido de dinucleótidos de mínima uridina" de un marco de lectura abierto (ORF) dado es el contenido de dinucleótidos de uridina (UU) más bajo posible de un ORF que (a) usa un codón de mínima uridina (como se discutió anteriormente) en cada posición y (b) codifica la misma secuencia de aminoácidos que el ORF dado. El contenido de dinucleótidos de uridina (UU) puede expresarse en términos absolutos como la enumeración de dinucleótidos de UU en un ORF o en base a la tasa como el porcentaje de posiciones ocupadas por las uridinas de dinucleótidos de uridina (por ejemplo, AUUAU tendría un contenido de dinucleótidos de uridina del 40 % porque 2 de las 5 posiciones están ocupadas por las uridinas de un dinucleótido de uridina). Los residuos de uridina modificada se consideran equivalentes a las uridinas con el fin de evaluar el contenido de dinucleótidos de mínima uridina.

Como se usa en la presente descripción, "TTR" se refiere a la transtiretina, que es el producto génico de un gen *TTR*.

Como se usa en la presente descripción, "amiloide" se refiere a los agregados anormales de proteínas o péptidos que normalmente son solubles. Los amiloides son insolubles, y los amiloides pueden generar depósitos proteicos en órganos y tejidos. Las proteínas o los péptidos en los amiloides pueden plegarse mal en una forma que permite que muchas copias de la proteína se unan para formar las fibrillas. Mientras que algunas formas de amiloide pueden tener funciones normales en el cuerpo humano, los "amiloides", como se usa en la presente descripción, se refiere a los agregados anormales o patológicos de la proteína. Los amiloides pueden comprender una sola proteína o péptido, como la TTR, o pueden comprender múltiples proteínas o péptidos, como la TTR y proteínas adicionales.

Como se usa en la presente descripción, las "fibrillas amiloides" se refieren a las fibras insolubles de amiloide que son resistentes a la degradación. Las fibrillas amiloides pueden producir síntomas basados en la proteína o el péptido específico y el tipo de tejido y célula en el que se ha agregado.

Como se usa en la presente descripción, "amiloidosis" se refiere a una enfermedad caracterizada por síntomas causados por el depósito de amiloides o fibrillas amiloides. La amiloidosis puede afectar numerosos órganos, incluidos el corazón, los riñones, el hígado, el bazo, el sistema nervioso y la vía digestiva.

Como se usa en la presente descripción, “ATTR”, “amiloidosis relacionada con TTR”, “amiloidosis TTR”, “amiloidosis ATTR” o “amiloidosis asociada con TTR” se refiere a la amiloidosis asociada con el depósito de la TTR.

Como se usa en la presente descripción, “miocardiopatía amiloide familiar” o “FAC” se refiere a una amiloidosis transtiretina hereditaria (ATTR) caracterizada principalmente por miocardiopatía restrictiva. La insuficiencia cardíaca congestiva es común en la FAC. La edad promedio de inicio es de aproximadamente 60-70 años, con una esperanza de vida estimada de 4-5 años después del diagnóstico.

Como se usa en la presente descripción, “polineuropatía amiloide familiar” o “FAP” se refiere a una amiloidosis transtiretina hereditaria (ATTR) caracterizada principalmente por neuropatía sensitivomotora. La neuropatía autonómica es común en la FAP. Si bien la neuropatía es una característica principal, los síntomas de la FAP también pueden incluir caquexia, insuficiencia renal y enfermedad cardíaca. La edad promedio de inicio de la FAP es de aproximadamente 30-50 años, con una esperanza de vida estimada de 5-15 años después del diagnóstico.

Como se usa en la presente descripción, “ATTR de tipo salvaje” y “ATTRwt” se refieren a la ATTR no asociada con una mutación TTR patológica como T60A, V30M, V30A, V30G, V30L, V122I, V122A, o V122(-). La ATTRwt también se ha denominado amiloidosis sistémica senil. El inicio generalmente ocurre en hombres de 60 años o más, con los síntomas más comunes como insuficiencia cardíaca congestiva y ritmo cardíaco anormal, como la fibrilación auricular. Los síntomas adicionales incluyen las consecuencias de la función cardíaca deficiente, como dificultad para respirar, fatiga, mareos, hinchazón (especialmente en las piernas), náuseas, angina, sueño interrumpido y pérdida de peso. Un antecedente de síndrome del túnel carpiano indica un mayor riesgo de la ATTRwt y en algunos casos puede ser indicativo de enfermedad en etapa temprana. La ATTRwt generalmente conduce a una disminución de la función cardíaca con el tiempo, pero puede tener un mejor pronóstico que la ATTR hereditaria porque los depósitos de la TTR de tipo salvaje se acumulan más lentamente. Los tratamientos existentes son similares a las otras formas de ATTR (aparte del trasplante de hígado) y generalmente se dirigen a apoyar o mejorar la función cardíaca, que van desde diuréticos y la ingesta limitada de líquidos y sal hasta anticoagulantes y, en casos graves, trasplantes de corazón. Sin embargo, como la FAC, la ATTRwt puede provocar la muerte por insuficiencia cardíaca, a veces dentro de los 3-5 años posteriores al diagnóstico.

Las secuencias de guía útiles en las composiciones de ARN de guía y los métodos descritos en la presente descripción se muestran en la Tabla 1 y a lo largo de la solicitud.

Como se usa en la presente descripción, “ATTR hereditaria” se refiere a la ATTR que está asociada con una mutación en la secuencia del gen *TTR*. Las mutaciones conocidas en el gen *TTR* asociadas con la ATTR incluyen aquellas que resultan en la TTR con sustituciones de T60A, V30M, V30A, V30G, V30L, V122I, V122A, o V122(-).

Como se usa en la presente descripción, “indeles” se refiere a mutaciones de inserción/deleción que consisten en una serie de nucleótidos que se insertan o eliminan en el sitio de las rupturas bicatenarias (DSB) en un ácido nucleico diana.

Como se usa en la presente descripción, “disminución” se refiere a una disminución en la expresión de un producto génico particular (por ejemplo, proteína, ARNm o ambos). La disminución de una proteína puede medirse por detección de la proteína secretada por el tejido o la población de células (por ejemplo, en suero o medios celulares) o por la detección de la cantidad celular total de la proteína de un tejido o población celular de interés. Se conocen métodos para medir la disminución del ARNm, e incluyen la secuenciación del ARNm aislado de un tejido o población celular de interés. En algunas modalidades, la “disminución” puede referirse a alguna pérdida de expresión de un producto génico particular, por ejemplo, una disminución en la cantidad del ARNm transcrito o una disminución en la cantidad de proteína expresada o secretada por una población de células (que incluye poblaciones *in vivo* como las que se encuentran en los tejidos).

Como se usa en la presente descripción, “inactivación” se refiere a una pérdida de expresión de una proteína particular en una célula. La inactivación puede medirse por la detección de la cantidad de secreción de proteína de un tejido o población de células (por ejemplo, en suero o medios celulares) o por la detección de la cantidad celular total de una proteína en un tejido o una población de células. En algunas modalidades, los métodos de la descripción “inactivan” la TTR en una o más células (por ejemplo, en una población de células que incluye poblaciones *in vivo* como las que se encuentran en los tejidos). En algunas modalidades, una inactivación no es la formación de proteína TTR mutante, por ejemplo, generada por indeles, sino la pérdida completa de la expresión de la proteína TTR en una célula.

Como se usa en la presente descripción, “TTR mutante” se refiere a un producto génico de *TTR* (es decir, la proteína TTR) que tiene un cambio en la secuencia de aminoácidos de la TTR en comparación con la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de la TTR. La secuencia TTR de tipo salvaje humana está disponible en NCBI Gene ID: 7276; Ensembl: Ensembl: ENSG00000118271.

Las formas mutantes de la TTR asociadas con la ATTR, por ejemplo, en humanos, incluyen T60A, V30M, V30A, V30G, V30L, V122I, V122A, o V122(-).

Como se usa en la presente descripción, "*TTR* mutante" o "alelo *TTR* mutante" se refiere a una secuencia *TTR* que tiene un cambio en la secuencia de nucleótidos de la *TTR* en comparación con la secuencia de tipo salvaje (NCBI Gene ID: 7276; Ensembl: ENSG00000118271).

Como se usa en la presente descripción, "ribonucleoproteína" (RNP) o "complejo RNP" se refiere a un ARN de guía junto con un agente de unión al ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas, por ejemplo, una cleavasa Cas, nickasa Cas, o un agente de unión al ADN dCas (por ejemplo, Cas9). En algunas modalidades, el ARN de guía orienta el agente de unión al ADN guiado por ARN, tal como Cas9, a una secuencia diana, y el ARN de guía se hibrida con el agente y se une a la secuencia diana; en los casos en que el agente es un cleavasa o nickasa, la unión puede seguirse por la escisión o muesca.

Como se usa en la presente descripción, una "secuencia diana" se refiere a una secuencia de ácido nucleico en un gen diana que tiene complementariedad con la secuencia de guía del ARNg. La interacción de la secuencia diana y la secuencia de guía dirige a un agente de unión al ADN guiado por ARN para que se una, y potencialmente corte o escinda (dependiendo de la actividad del agente), dentro de la secuencia diana.

Como se usa en la presente descripción, "tratamiento" se refiere a cualquier administración o aplicación de un agente terapéutico para la enfermedad o el trastorno en un sujeto, e incluye inhibir la enfermedad, detener su desarrollo, aliviar uno o más síntomas de la enfermedad, curar la enfermedad o prevenir la recurrencia de uno o más síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento de la ATTR puede comprender aliviar los síntomas de la ATTR.

La "uridina modificada" se usa en la presente descripción para referirse a un nucleósido distinto de timidina con los mismos aceptores de enlaces de hidrógeno que la uridina y una o más diferencias estructurales de la uridina. En algunas modalidades, una uridina modificada es una uridina sustituida, es decir, una uridina en la que uno o más sustituyentes no protónicos (por ejemplo, alcoxi, tal como metoxi) ocupan el lugar de un protón. En algunas modalidades, una uridina modificada es pseudouridina. En algunas modalidades, una uridina modificada es una pseudouridina sustituida, es decir, una pseudouridina en la que uno o más sustituyentes no protónicos (por ejemplo, alquilo, tal como metilo) toman el lugar de un protón, por ejemplo, N1-metil pseudouridina. En algunas modalidades, una uridina modificada es cualquiera de una uridina sustituida, pseudouridina o una pseudouridina sustituida.

Como se usa en la presente descripción, se considera que una primera secuencia "comprende una secuencia con al menos X % de identidad con" una segunda secuencia si una alineación de la primera secuencia con la segunda secuencia muestra que X % o más de las posiciones de la segunda secuencia en su totalidad coinciden con la primera secuencia. Por ejemplo, la secuencia AAGA comprende una secuencia con un 100 % de identidad con la secuencia AAG porque una alineación daría un 100 % de identidad en el sentido de que hay coincidencias con las tres posiciones de la segunda secuencia. Las diferencias entre el ARN y el ADN (generalmente el intercambio de uridina por timidina o viceversa) y la presencia de análogos de nucleósidos, como las uridinas modificadas, no contribuyen a las diferencias de identidad o complementariedad entre los polinucleótidos, siempre que los nucleótidos relevantes (tales como timidina, uridina o uridina modificada) tengan el mismo complemento (por ejemplo, adenosina para toda la timidina, uridina o uridina modificada; otro ejemplo es la citosina y la 5-metilcitosina, ambas con guanosina como complemento). Así, por ejemplo, la secuencia 5'-AXG donde X es cualquier uridina modificada, como pseudouridina, N1-metil pseudouridina o 5-metoxiuridina, se considera 100 % idéntica a AUG en que ambas son perfectamente complementarias a la misma secuencia (5'-CAU). Ejemplos de algoritmos de alineación son los algoritmos de Smith-Waterman y Needleman-Wunsch, que son bien conocidos en la técnica. Un experto en la técnica entenderá que las opciones de algoritmo y las configuraciones de parámetros son apropiadas para un par de secuencias dadas a alinear; para secuencias de longitud generalmente similar e identidad esperada >50 % para aminoácidos o >75 % para nucleótidos, el algoritmo de Needleman-Wunsch con la configuración predeterminada de la interfaz del algoritmo de Needleman-Wunsch proporcionada por el EBI en el servidor web www.ebi.ac.uk es generalmente apropiado.

El término "alrededor" o "aproximadamente" significa un error aceptable para un valor particular determinado por un experto en la técnica, que depende en parte de cómo se mide o determina el valor.

II. Composiciones

A. Composiciones que comprenden ARN de guía (ARNg)

En la presente descripción se proporcionan composiciones útiles para la edición del gen *TTR*, por ejemplo, mediante el uso de un ARN de guía con un agente de unión al ADN guiado por ARN (por ejemplo, un sistema CRISPR/Cas). Las composiciones pueden administrarse a sujetos que tienen secuencias del gen *TTR* de tipo salvaje o no salvaje, tales como, por ejemplo, sujetos con ATTR,

que pueden ser ATTR wt o una forma hereditaria o familiar de ATTR. Las secuencias de guía dirigidos al gen *TTR* se muestran en la Tabla 1 en las SEQ ID Nos: 5-82.

5

Tabla 1: *Secuencias de guía dirigidas a TTR*, nomenclatura, coordenadas cromosómicas y secuencia.

SEQ ID No.	ID de guía	Descrip-ción	Especies	Localización cromosómica	Secuencias de guía*
5	CR003335	TTR (Exón 1)	Humano	chr18:31591917-31591937	CUGCUCCUCCUCUGCCUUGC
6	CR003336	TTR (Exón 1)	Humano	chr18:31591922-31591942	CCUCCUCUGCCUUGCUGGAC
7	CR003337	TTR (Exón 1)	Humano	chr18:31591925-31591945	CCAGUCCAGCAAGGCAGAGG
8	CR003338	TTR (Exón 1)	Humano	chr18:31591928-31591948	AUACCAGUCCAGCAAGGCAG
9	CR003339	TTR (Exón 1)	Humano	chr18:31591934-31591954	ACACAAAUACCAGUCCAGCA
10	CR003340	TTR (Exón 1)	Humano	chr18:31591937-31591957	UGGACUGGUAUUUGUGUCUG
11	CR003341	TTR (Exón 1)	Humano	chr18:31591941-31591961	CUGGUAUUUGUGUCUGAGGC
12	CR003342	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592880-31592900	CUUCUCUACACCCAGGGCAC
13	CR003343	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592902-31592922	CAGAGGACACUUGGAUUCAC
14	CR003344	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592911-31592931	UUUGACCAUCAGAGGACACU
15	CR003345	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592919-31592939	UCUAGAACUUUGACCAUCAG

16	CR003346	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592928-31592948	AAAGUUCUAGAUGCUGUCCG
17	CR003347	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592948-31592968	CAUUGAUGGCAGGACUGCCU
18	CR003348	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592948-31592968	AGGCAGUCCUGCCAUCAAUG
19	CR003349	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592958-31592978	UGCACGGCCACAUUGAUGGC
20	CR003350	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592962-31592982	CACAUGCACGGCCACAUUGA
21	CR003351	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592974-31592994	AGCCUUUCUGAACACAUGCA
22	CR003352	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592986-31593006	GAAAGGCUGCUGAUGACACC
23	CR003353	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592987-31593007	AAAGGCUGCUGAUGACACCU
24	CR003354	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31593003-31593023	ACCUGGGAGCCAUUUGCCUC
25	CR003355	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31593007-31593027	CCCAGAGGCAAAUGGCUCCC
26	CR003356	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31593015-31593035	GCAACUUACCCAGAGGCAAA
27	CR003357	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31593022-31593042	UUCUUUGGCAACUUACCCAG
28	CR003358	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595127-31595147	AUGCAGCUCUCCAGACUCAC
29	CR003359	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595126-31595146	AGUGAGUCUGGAGAGCUGCA
30	CR003360	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595127-31595147	GUGAGUCUGGAGAGCUGCAU
31	CR003361	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595140-31595160	GCUGCAUGGGCUCACAACUG

32	CR003362	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595143-31595163	GCAUGGGCUCACAACUGAGG
33	CR003363	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595156-31595176	ACUGAGGAGGAAUUUGUAGA
34	CR003364	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595157-31595177	CUGAGGAGGAAUUUGUAGAA
35	CR003365	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595170-31595190	UGUAGAAGGGAUAUACAAAG
36	CR003366	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595193-31595213	AAAUAGACACCAAAUCUUAC
37	CR003367	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595197-31595217	AGACACCAAAUCUUACUGGA
38	CR003368	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595205-31595225	AAGUGCCUUCCAGUAAGAUU
39	CR003369	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595235-31595255	CUCUGCAUGCUCAUGGAAUG
40	CR003370	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595236-31595256	CCUCUGCAUGCUCAUGGAAU
41	CR003371	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595237-31595257	ACCUCUGCAUGCUCAUGGAA
42	CR003372	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595242-31595262	UACUCACCUCUGCAUGCUCA
43	CR003373	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598570-31598590	GUAUUCACAGCCAACGACUC
44	CR003374	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598583-31598603	GCGGCGGGGGCCGGAGUCGU
45	CR003375	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598592-31598612	AAUGGUGUAGCGGCGGGGGC
46	CR003376	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598596-31598616	CGGCAAUGGUGUAGCGGCGG
47	CR003377	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598597-31598617	GCGGCAAUGGUGUAGCGGCG

48	CR003378	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598598-31598618	GGCGGCAAUGGUGUAGCGGC
49	CR003379	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598599-31598619	GGGCGGCAAUGGUGUAGCGG
50	CR003380	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598602-31598622	GCAGGGCGGCAAUGGUGUAG
51	CR003381	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598610-31598630	GGGGCUCAGCAGGGCGGCAA
52	CR003382	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598616-31598636	GGAGUAGGGGCUCAGCAGGG
53	CR003383	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598619-31598639	AUAGGAGUAGGGGCUCAGCA
54	CR003384	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598620-31598640	AAUAGGAGUAGGGGCUCAGC
55	CR003385	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598626-31598646	CCCCUACUCCUAUUCCACCA
56	CR003386	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598629-31598649	CCGUGGUGGAAUAGGAGUAG
57	CR003387	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598630-31598650	GCCGUGGUGGAAUAGGAGUA
58	CR003388	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598637-31598657	GACGACAGCCGUGGUGGAAU
59	CR003389	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598643-31598663	AUUGGUGACGACAGCCGUGG
60	CR003390	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598646-31598666	GGGAUUGGUGACGACAGCCG
61	CR003391	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598647-31598667	GGCUGUCGUCACCAAUCCCA
62	CR003392	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598661-31598681	AGUCCCUCAUUCCUUGGGAU
63	CR005298	TTR (Exón 1)	Humano	chr18:31591883-31591903	UCCACUCAUUCUUGGCAGGA

64	CR005299	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598631-31598651	AGCCGUGGUGGAAUAGGAGU
65	CR005300	TTR (Exón 1)	Humano	chr18:31591967-31591987	UCACAGAAACACUCACCGUA
66	CR005301	TTR (Exón 1)	Humano	chr18:31591968-31591988	GUCACAGAAACACUCACCGU
67	CR005302	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592874-31592894	ACGUGUCUUCUCUACACCCA
68	CR005303	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592903-31592923	UGAAUCCAAGUGUCCUCUGA
69	CR005304	TTR (Exón 2)	Humano	chr18:31592969-31592989	GGCCGUGCAUGUGUUCAGAA
70	CR005305	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595114-31595134	UAUAGGAAAACCAGUGAGUC
71	CR005306	TTR (Exón 3)	Humano	chr18:31595204-31595224	AAAUCUUACUGGAAGGCACU
72	CR005307	TTR (Exón 4)	Humano	chr18:31598548-31598568	UGUCUGUCUUCUCUCAUAGG
73	CR000689	TTR	Cyno	chr18:50681533-50681553	ACACAAAUACCAGUCCAGCG
74	CR005364	TTR	Cyno	chr18:50680481-50680501	AAAGGCUGCUGAUGAGACCU
75	CR005365	TTR	Cyno	chr18:50680520-50680540	CAUUGACAGCAGGACUGCCU
76	CR005366	TTR	Cyno	chr18:50681539-50681559	AUACCAGUCCAGCGAGGCAG
77	CR005367	TTR	Cyno	chr18:50681542-50681562	CCAGUCCAGCGAGGCAGAGG
78	CR005368	TTR	Cyno	chr18:50681545-50681565	CCUCCUCUGCCUCGCUGGAC
79	CR005369	TTR	Cyno	chr18:50680540-50680560	AAAGUUCUAGAUGCCGUCCG

80	CR005370	TTR	Cyno	chr18:50680594-50680614	ACUUGUCUUCUCUAUACCCA
81	CR005371	TTR	Cyno	chr18:50678216-50678236	AAGUGACUUCCAGUAAGAUU
82	CR005372	TTR	Cyno	chr18:50680482-50680502	AAAAGGCUGCUGAUGAGACC

Cada una de las secuencias de guía anteriores puede comprender además nucleótidos adicionales para formar un ARNcr, por ejemplo, con la siguiente secuencia de nucleótidos ejemplar después de la secuencia de guía en su extremo 3': GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 126). En el caso de un ARNsg, las secuencias de guía anteriores pueden comprender además nucleótidos adicionales para formar un ARNsg, por ejemplo, con la siguiente secuencia de nucleótidos ejemplar después del extremo 3' de la secuencia de guía: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 125) en orientación de 5' a 3'.

En algunas modalidades, el ARNsg está modificado. En algunas modalidades, el ARNsg comprende el patrón de modificación que se muestra a continuación en la SEQ ID NO: 3, donde N es cualquier nucleótido natural o no natural, y en donde la totalidad de los N comprenden una secuencia de guía tal como se describe en la presente descripción y el ARNsg modificado comprende la siguiente secuencia: mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 3)), donde "N" puede ser cualquier nucleótido natural o no natural. Por ejemplo, se incluye en la presente descripción la SEQ ID NO: 3, donde los N se reemplazan con cualquiera de las secuencias de guía descritas en la presente descripción. Las modificaciones permanecen como se muestra en la SEQ ID NO: 3 a pesar de la sustitución de los N por los nucleótidos de un guía. Es decir, aunque los nucleótidos del guía reemplazan los "N", los primeros tres nucleótidos se modifican con 2'OMe y hay enlaces de fosforotioato entre el primer y segundo nucleótidos, el segundo y tercer nucleótidos y el tercer y cuarto nucleótidos.

En algunas modalidades, se incluye cualquiera de las secuencias mencionadas en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencias de ARNsg dirigidas a TTR

SEQ ID No.	ID de guía	Objetivo y descripción	Especies	Secuencia
87	G000480	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
88	G000481	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mU*mC*mU*AGAACUUUGACCAUCAGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
89	G000482	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mU*mG*mU*AGAAGGGAUAUACAAAGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
90	G000483	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mU*mC*mC*ACUCAUUCUUGGCAGGAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
91	G000484	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mA*mG*mA*CACCAAAUCUUACUGGAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU

92	G000485	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mC*mC*mU*CCUCUGCCUUGCUGGACGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
93	G000486	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
94	G000487	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mU*mU*mC*UUUGGCAACUUACCCAGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
95	G000488	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCUGUCCGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
96	G000489	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mU*mU*mU*GACCAUCAGAGGACACUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
97	G000490	Secuencia modificada de ARNsg	Humano	mA*mA*mA*UAGACACCAAAUCUUACGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU

		TTR		UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
98	G000491	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mA*mU*mA*CCAGUCCAGCAAGGCAGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
99	G000492	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mC*mU*mU*CUCUACACCCAGGGCACGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
100	G000493	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mA*mA*mG*UGCCUUCCAGUAAGAUUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
101	G000494	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mG*mU*mG*AGUCUGGAGAGCUGCAUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
102	G000495	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mC*mA*mG*AGGACACUUGGAUUCACGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU

103	G000496	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mG*mG*mC*CGUGCAUGUGUUCAGAAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
104	G000497	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mC*mU*mG*CUCCUCCUCUGCCUUGCGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
105	G000498	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mA*mG*mU*GAGUCUGGAGAGCUGCAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
106	G000499	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mU*mG*mA*AUCCAAGUGUCCUCUGAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
107	G000500	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mC*mC*mA*GUCCAGCAAGGCAGAGGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
108	G000501	Secuencia modificada de ARNsg	Humano	mU*mC*mA*CAGAAACACUCACCGUAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU

		TTR		UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
109	G000567	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mG*mA*mA*AGGCUGCUGAUGACACCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
110	G000568	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mG*mG*mC*UGUCGUCACCAAUCCCAGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
111	G000570	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mC*mA*mU*UGAUGGCAGGACUGCCUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
112	G000571	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mG*mU*mC*ACAGAAACACUCACCGUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
113	G000572	Secuencia modificada de ARNsg TTR	Humano	mC*mC*mC*CUACUCCUAUUCCACCAGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU

114	G000502	Secuencia modificada de ARNsg específico a TTR de Cyno	Cyno	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
115	G000503	Secuencia modificada de ARNsg específico a TTR de Cyno	Cyno	mA*mA*mA*AGGCUGCUGAUGAGACCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
116	G000504	Secuencia modificada de ARNsg específico a TTR de Cyno	Cyno	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGAGACCUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
117	G000505	Secuencia modificada de ARNsg específico a TTR de Cyno	Cyno	mC*mA*mU*UGACAGCAGGACUGCCUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
118	G000506	Secuencia modificada de ARNsg específico a TTR de Cyno	Cyno	mA*mU*mA*CCAGUCCAGCGAGGCAGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
119	G000507	Secuencia modificada de ARNsg	Cyno	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAGAGGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU

		específico a TTR de Cyno		UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
120	G000508	Secuencia modificada de ARNsg específico a TTR de Cyno	Cyno	mC*mC*mU*CCUCUGCCUCGCUGGACGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
121	G000509	Secuencia modificada de ARNsg específico a TTR de Cyno	Cyno	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGUCCGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
122	G000510	Secuencia modificada de ARNsg específico a TTR de Cyno	Cyno	mA*mC*mU*UGUCUUCUCUAUACCCAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
123	G000511	Secuencia modificada de ARNsg específico a TTR de Cyno	Cyno	mA*mA*mG*UGACUUCCAGUAAGAUUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
124	G000282	TTR	Ratón	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU

* = Enlace PS; 'm' = nucleótido 2'-O-Me

En la Tabla 3 se proporciona un mapeo de alineación de las ID de guía con las ID de ARNsg correspondientes, así como también la homología con el ID del genoma de cyno y las ID de guía coincidentes de cyno.

Tabla 3: Mapeo ID de secuencia de guía dirigida a TTR y homología con cyno

Descripción	ID de guía doble humano	ID de guía único humano	Número de coincidencias con el genoma de Cyno	ID de ARNdg coincidente con Cyno	ID de ARNsg coincidente con 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	núm. PAM en cyno		
TTR	CR003343	G000495	núm. PAM en 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		núm. PAM en cyno		
TTR	CR003351		núm. PAM en 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	núm. PAM en 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	núm. PAM en 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		

En algunas modalidades, la invención proporciona una composición que comprende uno o más ARN de guía (ARNg) que comprenden secuencias de guía que dirigen un agente de unión al ADN guiado por ARN, que puede ser una nucleasa (por ejemplo, una nucleasa Cas como Cas9), a un secuencia de ADN diana en *TTR*. El ARNg puede comprender un ARNcr que comprende una secuencia de guía mostrada en la Tabla 1. El ARNg puede comprender un ARNcr que comprende 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de guía mostrada en la Tabla 1. En algunas modalidades, el ARNg comprende un ARNcr que comprende una secuencia con aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de guía que se muestra en la Tabla 1. En algunas modalidades, el ARNg comprende un ARNcr que comprende una secuencia con aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con una secuencia de guía mostrada en la Tabla 1. El ARNg puede comprender además un ARNtr. En cada modalidad de la composición y el método descritos en la presente descripción, el ARNcr y el ARNtr pueden asociarse como un ARN único (ARNsg) o pueden estar en ARN separados

(ARNdg). En el contexto de los ARNsg, los componentes ARNcr y ARNtr pueden unirse covalentemente, por ejemplo, a través de un enlace fosfodiéster u otro enlace covalente.

En cada una de las modalidades de la composición, el uso y el método descritos en la presente descripción, el ARN de guía puede comprender dos moléculas de ARN como un "ARN de guía doble" o "ARNdg". El ARNdg comprende una primera molécula de ARN que comprende un ARNcr que comprende, por ejemplo, una secuencia de guía mostrada en la Tabla 1, y una segunda molécula de ARN que comprende un ARNtr. La primera y la segunda moléculas de ARN pueden no unirse covalentemente, pero pueden formar un dúplex de ARN a través del apareamiento de bases entre las partes del ARNcr y el ARNtr.

En cada una de las modalidades de la composición, el uso y el método descritos en la presente descripción, el ARN de guía puede comprender una única molécula de ARN como un "ARN de guía única" o "ARNsg". El ARNsg puede comprender un ARNcr (o una parte de este) que comprende una secuencia de guía mostrada en la Tabla 1 unida covalentemente a un ARNtr. El ARNsg puede comprender 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de guía mostrada en la Tabla 1. En algunas modalidades, el ARNcr y el ARNtr se unen covalentemente a través de un conector. En algunas modalidades, el ARNsg forma una estructura de tallo-bucle a través del apareamiento de bases entre las partes del ARNcr y el ARNtr. En algunas modalidades, el ARNcr y el ARNtr se unen covalentemente a través de uno o más enlaces que no son un enlace fosfodiéster.

En algunas modalidades, el ARNtr puede comprender la totalidad o una parte de una secuencia de ARNtr derivada de un sistema CRISPR/Cas de origen natural. En algunas modalidades, el ARNtr comprende un ARNtr de tipo salvaje truncado o modificado. La longitud del ARNtr depende del sistema CRISPR/Cas usado. En algunas modalidades, el ARNtr comprende o consiste en 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 o más de 100 nucleótidos. En algunas modalidades, el ARNtr puede comprender ciertas estructuras secundarias, tales como, por ejemplo, una o más estructuras de horquilla o de tallo-bucle, o una o más estructuras abultadas.

En algunas modalidades, la invención proporciona una composición que comprende uno o más ARN de guía que comprenden una secuencia de guía de cualquiera de las SEQ ID NO: 5-82.

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un ARNg que comprende una secuencia de guía que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 5-82.

En otras modalidades, la composición comprende al menos uno, por ejemplo, al menos dos ARNg que comprenden secuencias de guía que se seleccionan de dos o más de las secuencias de guía de las SEQ ID NO: 5-82. En algunas modalidades, la composición comprende al menos dos ARNg que comprenden cada uno una secuencia de guía al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 5-82.

En algunas modalidades, el ARNg es un ARNsg que comprende cualquiera de las secuencias mostradas en la Tabla 2 (SEQ ID Nos. 87-124). En algunas modalidades, el ARNg es un ARNsg que comprende cualquiera de las secuencias mostradas en la Tabla 2 (SEQ ID Nos. 87-124, pero sin las modificaciones que se muestran (es decir, SEQ ID Nos. 87-124 sin modificar). En algunas modalidades, el ARNsg comprende una secuencia que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos de las SEQ ID Nos. 87-124. En algunas modalidades, el ARNsg comprende una secuencia que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos de las SEQ ID Nos. 87-124, pero sin las modificaciones que se muestran (es decir, SEQ ID Nos. 87-124 sin modificar). En algunas modalidades, el ARNsg comprende cualquiera de las secuencias de guía mostradas en la Tabla 1 en lugar de las secuencias de guía mostradas en las secuencias de ARNsg de la Tabla 2 en las SEQ ID Nos: 87-124, con o sin las modificaciones.

Las composiciones de ARN de guía de la presente invención se diseñan para reconocer (por ejemplo, hibridarse con) una secuencia diana en el gen *TTR*. Por ejemplo, la secuencia diana *TTR* puede reconocerse y escindirse mediante una cleavasa Cas proporcionada que comprende un ARN de guía. En algunas modalidades, un agente de unión al ADN guiado por ARN, tal como una cleavasa Cas, puede dirigirse por un ARN de guía a una secuencia diana del gen *TTR*, donde la secuencia de guía del ARN de guía se hibrida con la secuencia diana y el agente de unión al ADN guiado por ARN, como una cleavasa Cas, escinde la secuencia diana.

En algunas modalidades, la selección de uno o más ARN de guía se determina en base a las secuencias diana dentro del gen *TTR*.

Sin estar sujetos a ninguna teoría en particular, las mutaciones (por ejemplo, mutaciones de cambio de marco que resultan de los indeles como resultado de una DSB mediado por nucleasas) en ciertas regiones del gen pueden ser menos tolerables que las mutaciones en otras regiones del gen, por lo tanto, la ubicación de una DSB es un factor importante en la cantidad o el tipo de disminución de proteínas que puede resultar. En algunas modalidades, un ARNg complementario o que tiene complementariedad con una secuencia diana dentro de *TTR* se usa para dirigir el agente de unión al

ADN guiado por ARN a una ubicación particular en el gen *TTR*. En algunas modalidades, los ARNg se diseñan para tener secuencias de guía que son complementarias o tienen complementariedad con las secuencias diana en el exón 1, el exón 2, el exón 3 o el exón 4 de *TTR*. En algunas modalidades, la secuencia de guía es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a una secuencia diana presente en el gen *TTR* humano. En algunas modalidades, la secuencia diana puede ser complementaria a la secuencia de guía del ARN de guía. En algunas modalidades, el grado de complementariedad o identidad entre una secuencia de guía de un ARN de guía y su secuencia diana correspondiente puede ser al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas modalidades, la secuencia diana y la secuencia de guía del ARNg pueden ser 100 % complementarias o idénticas. En otras modalidades, la secuencia diana y la secuencia de guía del ARNg pueden contener al menos una incompatibilidad. Por ejemplo, la secuencia diana y la secuencia de guía del ARNg pueden contener 1, 2, 3 o 4 incompatibilidades, donde la longitud total de la secuencia de guía es 20. En algunas modalidades, la secuencia diana y la secuencia de guía del ARNg pueden contener 1-4 incompatibilidades donde la secuencia de guía es de 20 nucleótidos.

En algunas modalidades, una composición o formulación descrita en la presente descripción comprende un ARNm que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se proporciona, se usa o se administra un ARNm que comprende un ORF que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas.

En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN es una nucleasa Cas de clase 2. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN tiene actividad de cleavasa, que también puede denominarse actividad de endonucleasa de doble cadena. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN comprende una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas de clase 2 (que puede ser, por ejemplo, una nucleasa Cas de tipo II, V o VI). Las nucleasas Cas de clase 2 incluyen, por ejemplo, proteínas Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 y C2c3 y las modificaciones de estas. Los ejemplos de nucleasas Cas9 incluyen las de los sistemas CRISPR de tipo II de *S. pyogenes, S. aureus*y otros procariotas (véase, por ejemplo, la lista en el siguiente párrafo), y las versiones modificadas (por ejemplo, diseñadas o mutantes) de estos. Véase, por ejemplo, US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1. Otros ejemplos de nucleasas Cas incluyen un complejo Csm o Cmr de un sistema CRISPR de tipo III o Cas10, Csm1 o la subunidad Cmr2 de

este; y un complejo Cascade de un sistema CRISPR tipo I, o la subunidad Cas3 de este. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede ser de un sistema Tipo-IIA, Tipo-IIB o Tipo-IIC. Para una discusión de varios sistemas CRISPR y nucleasas Cas, véanse, por ejemplo, Makarova y otros, NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova y otros, NAT. REV. MICROBIOL, 13: 722-36 (2015); Shmakov y otros, MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015).

Las especies ejemplares no limitantes de las que puede derivarse la nucleasa Cas incluyen *Streptococcus pyogenes, Streptococcus thermophilus, Streptococcus sp., Staphylococcus aureus, Listeria innocua, Lactobacillus gasseri, Francisella novicida, Wolinella succinogenes, Sutterella wadsworthensis, Gammaproteobacteria, 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, bacterias Burkholderiales, Polaromonas naphthalenivorans, Polaromonas sp., Crocosphaera 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.*, bacteria *Lachnospiraceae* ND2006, y *Acaryochloris marina*.

En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Streptococcus thermophilus*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Neisseria meningitidis*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Staphylococcus aureus*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Francisella novicida*. En algunas

modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Acidaminococcus sp.* En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de la bacteria *Lachnospiraceae* ND2006. En modalidades adicionales, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Francisella tularensis, bacteria Lachnospiraceae, Butyrivibrio proteoclasticus, bacteria Peregrinibacteria, bacteria Parcubacteria, Smithella, Acidaminococcus, Candidatus Metanoplasma termitum, Eubacterium eligens, Moraxella bovoculi, Leptospira inadai, Disphyromonas, Porphyromonas* o *Porphyromonas macacae*. En ciertas modalidades, la nucleasa Cas es una nucleasa Cpf1 de una *Acidaminococcus* o *Lachnospiraceae*.

Cas9 de tipo salvaje tiene dos dominios de nucleasa: RuvC y HNH. El dominio RuvC escinde la cadena de ADN no diana, y el dominio HNH escinde la cadena diana del ADN. En algunas modalidades, la nucleasa Cas9 comprende más de un dominio RuvC y/o más de un dominio HNH. En algunas modalidades, la nucleasa Cas9 es una Cas9 de tipo salvaje. En algunas modalidades, Cas9 es capaz de inducir una ruptura de doble cadena en el ADN diana. En ciertas modalidades, la nucleasa Cas puede escindir ADNds, puede escindir una hebra de ADNds, o puede no tener actividad de nickasa o cleavasa de ADN. Se proporciona una secuencia de aminoácidos de Cas9 ejemplar como la SEQ ID NO: 203. Se proporciona una secuencia del ORF del ARNm de Cas9 ejemplar, que incluye codones de inicio y parada, como la SEQ ID NO: 204. Se proporciona una secuencia de codificación ejemplar del ARNm de Cas9, adecuada para su inclusión en una proteína de fusión, como la SEQ ID NO: 210.

En algunas modalidades, se usan nucleasas Cas quiméricas, donde un dominio o región de la proteína se reemplaza por una parte de una proteína diferente. En algunas modalidades, un dominio de nucleasa Cas puede reemplazarse con un dominio de una nucleasa diferente, tal como Fok1. En algunas modalidades, una nucleasa Cas puede ser una nucleasa modificada.

En otras modalidades, la nucleasa Cas puede ser de un sistema CRISPR/Cas Tipo I. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede ser un componente del complejo Cascade de un sistema CRISPR/Cas Tipo I. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede ser una proteína Cas3. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede ser de un sistema CRISPR/Cas de tipo III. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede tener una actividad de escisión del ARN.

En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN tiene una actividad de nickasa de cadena sencilla, es decir, puede cortar una cadena de ADN para producir una ruptura de cadena sencilla, también conocida como “muesca”. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN comprende una nickasa Cas. Una nickasa es una enzima que genera una

muesca en ADNds, es decir, corta una cadena pero no la otra de la doble hélice del ADN. En algunas modalidades, una nickasa Cas es una versión de una nucleasa Cas (por ejemplo, una nucleasa Cas discutida anteriormente) en la que un sitio activo endonucleolítico se inactiva, por ejemplo, por una o más alteraciones (por ejemplo, mutaciones puntuales) en un dominio catalítico. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 8,889,356 para la discusión de las nickasas Cas y las alteraciones ejemplares del dominio catalítico. En algunas modalidades, una nickasa Cas, tal como la nickasa Cas9, tiene un dominio RuvC o HNH inactivo. Se proporciona una secuencia ejemplar de aminoácidos de la nickasa Cas9 como la SEQ ID NO: 206. Se proporciona una secuencia ejemplar del ORF del ARNm de la nickasa Cas9, que incluye codones de inicio y parada, como la SEQ ID NO: 207. Se proporciona una secuencia de codificación ejemplar del ARNm de la nickasa Cas9, adecuada para su inclusión en una proteína de fusión, como la SEQ ID NO: 211.

En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN se modifica para contener solo un dominio funcional de nucleasa. Por ejemplo, la proteína agente puede modificarse de modo que uno de los dominios de nucleasa se mute o se elimine total o parcialmente para reducir su actividad de escisión del ácido nucleico. En algunas modalidades, se usa una nickasa que tiene un dominio RuvC con actividad reducida. En algunas modalidades, se usa una nickasa que tiene un dominio RuvC inactivo. En algunas modalidades, se usa una nickasa que tiene un dominio HNH con actividad reducida. En algunas modalidades, se usa una nickasa que tiene un dominio HNH inactivo.

En algunas modalidades, un aminoácido conservado dentro de un dominio de nucleasa de la proteína Cas se sustituye para reducir o alterar la actividad de nucleasa. En algunas modalidades, una nucleasa Cas puede comprender una sustitución de aminoácidos en RuvC o el dominio de nucleasa de tipo RuvC. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares en RuvC o el dominio de nucleasa de tipo RuvC incluyen D10A (basado en la proteína Cas9 de S. *pyogenes*). *Véase*, *por ejemplo*, Zetsche y otros. (2015) *Cell* Oct 22:163(3): 759-771. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede comprender una sustitución de aminoácidos en HNH o el dominio de nucleasa de tipo HNH. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares en HNH o el dominio de nucleasa de tipo HNH incluyen E762A, H840A, N863A, H983A, y D986A (basado en la proteína Cas9 de S. *pyogenes*). *Véase*, *por ejemplo*, Zetsche y otros. (2015). Otras sustituciones de aminoácidos ejemplares incluyen D917A, E1006A y D1255A (basado en la secuencia U112 Cpf1 (FnCpf1) de *Francisella novicida* (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN)).

En algunas modalidades, se proporciona un ARNm que codifica una nickasa en combinación con un par de ARN de guía que son complementarios a las cadenas sentido y antisentido de la secuencia diana, respectivamente. En esta modalidad, los ARN de guía dirigen la nickasa a una secuencia diana e introducen una DSB generando una muesca en las cadenas opuestas de la secuencia diana (es decir, doble muesca). En algunas modalidades, el uso de la doble muesca puede mejorar la especificidad y reducir los efectos fuera de la diana. En algunas modalidades, se usa una nickasa junto con dos ARN de guía separados que se dirigen a cadenas opuestas de ADN para producir una doble muesca en el ADN diana. En algunas modalidades, se usa una nickasa junto con dos ARN de guía separados que se seleccionan para estar cerca para producir una doble muesca en el ADN diana.

En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN carece de actividad de cleavasa y nickasa. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN comprende un polipéptido dCas de unión al ADN. Un polipéptido dCas tiene actividad de unión al ADN mientras que esencialmente carece de actividad catalítica (cleavasa/nickasa). En algunas modalidades, el polipéptido dCas es un polipéptido dCas9. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN que carece de actividad de cleavasa y nickasa o el polipéptido dCas de unión al ADN es una versión de una nucleasa Cas (por ejemplo, una nucleasa Cas discutida anteriormente) en la que sus sitios activos endonucleolíticos están inactivos, por ejemplo, por una o más alteraciones (por ejemplo, mutaciones puntuales) en sus dominios catalíticos. Véase, por ejemplo, US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1. Se proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar de dCas9 como la SEQ ID NO: 208. Una secuencia ejemplar del ORF del ARNm de dCas9, que incluye codones de inicio y parada, se proporciona como la SEQ ID NO: 209. Una secuencia de codificación ejemplar del ARNm de dCas9, adecuada para su inclusión en una proteína de fusión, se proporciona como la SEQ ID NO: 212.

En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN comprende uno o más dominios funcionales heterólogos (por ejemplo, es o comprende un polipéptido de fusión).

En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede facilitar el transporte del agente de unión al ADN guiado por ARN al núcleo de una célula. Por ejemplo, el dominio funcional heterólogo puede ser una señal de localización nuclear (NLS). En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con 1-10 NLS(s). En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con 1-5 NLS(s). En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con un NLS. Cuando

se usa una NLS, la NLS puede unirse en el N-terminal o el C-terminal de la secuencia del agente de unión al ADN guiado por ARN. También puede insertarse dentro de la secuencia del agente de unión al ADN guiado por ARN. En otras modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con más de una NLS. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con 2, 3, 4 o 5 NLSs. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con dos NLSs. En ciertas circunstancias, las dos NLSs pueden ser iguales (*por ejemplo*, dos NLSs de SV40) o diferentes. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN se fusiona con dos secuencias de NLS de SV40 unidas en el extremo carboxilo. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con dos NLSs, una unida en el N-terminal y otra en el C-terminal. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con 3 NLSs. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse sin NLS. En algunas modalidades, la NLS puede ser una secuencia monopartita, tal como, *por ejemplo*, NLS de SV40, PKKKRKV (SEQ ID NO: 274) o PKKKRRV (SEQ ID NO: 275). En algunas modalidades, la NLS puede ser una secuencia bipartita, tal como la NLS de nucleoplasmina, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 276). En una modalidad específica, una única NLS PKKKRKV (SEQ ID NO: 274) puede unirse en el C-terminal del agente de unión al ADN guiado por ARN. Uno o más conectores se incluyen opcionalmente en el sitio de fusión.

En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede ser capaz de modificar la vida media intracelular del agente de unión al ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, puede aumentarse la vida media del agente de unión al ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, puede reducirse la vida media del agente de unión al ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede ser capaz de aumentar la estabilidad del agente de unión al ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede ser capaz de reducir la estabilidad del agente de unión al ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede actuar como un péptido señal para la degradación de proteínas. En algunas modalidades, la degradación de proteínas puede estar mediada por enzimas proteolíticas, tales como, por ejemplo, proteasomas, proteasas lisosómicas o proteasas de calpaína. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede comprender una secuencia PEST. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede modificarse mediante la adición de ubiquitina o una cadena de poliubiquitina. En algunas modalidades, la ubiquitina puede ser una proteína similar a la ubiquitina (UBL). Los ejemplos no

limitantes de proteínas similares a la ubiquitina incluyen un pequeño modificador similar a la ubiquitina (SUMO), ubiquitina de reacción cruzada (UCRP, también conocida como gen estimulado por interferón 15 (ISG15)), ubiquitina relacionada con el modificador 1 (URM1), proteína 8 reguladora del desarrollo y expresión de la célula neuronal precursora (NEDD8, también llamada Rub1 en *S. cerevisiae*), antígeno leucocitario humano asociado a F (FAT10), autofagia-8 (ATG8) y -12 (ATG12), proteína tipo Fau ubiquitina (FUB1), UBL anclada a la membrana (MUB), ubiquitina dobladora modificadora-1 (UFM1) y la proteína similar a la ubiquitina-5 (UBL5).

En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede ser un dominio marcador. Los ejemplos no limitantes de dominios marcadores incluyen proteínas fluorescentes, marcadores de purificación, marcadores de epítopo y secuencias de genes reporteros. En algunas modalidades, el dominio marcador puede ser una proteína fluorescente. Los ejemplos no limitantes de proteínas fluorescentes adecuadas incluyen proteínas fluorescentes verdes (*por ejemplo*, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, Azami Green monomérico, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), proteínas fluorescentes amarillas (*por ejemplo*, YFP, EYFP, Citrina, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), proteínas fluorescentes azules (*por ejemplo*, EBFP, EBFP2, Azurita, mKalamal, GFPuv, Zafiro, Zafiro T,), proteínas fluorescentes cian (*por ejemplo*, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), proteínas fluorescentes rojas (*por ejemplo*, mKate, mKate2, mPlum, monómero DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-monómero, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRasberry, mStrawberry, Jred) y proteínas fluorescentes naranjas (mOrange, mKO, Kusabira-naranja, Kusabira-Orange monomérica, mTangerine, tdTomato) o cualquier otra proteína fluorescente adecuada. En otras modalidades, el dominio marcador puede ser un marcador de purificación y/o un marcador de epítopo. Los marcadores ejemplares no limitantes incluyen glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP), tioredoxina (TRX), poli(NANP), marcador de purificación de afinidad en tándem (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 portadora de biotina carboxilo (BCCP), poli-His y calmodulina. Los genes reporteros ejemplares no limitantes incluyen glutatión-S-transferasa (GST), peroxidasa de rábano picante (HRP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, luciferasa o proteínas fluorescentes.

En modalidades adicionales, el dominio funcional heterólogo puede dirigir el agente de unión al ADN guiado por ARN a un orgánulo, tipo de célula, tejido u órgano específico. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede dirigir el agente de unión al ADN guiado por ARN a las mitocondrias.

En modalidades adicionales, el dominio funcional heterólogo puede ser un dominio efector. Cuando el agente de unión al ADN guiado por ARN se dirige a su secuencia diana, *por ejemplo*, cuando una nucleasa Cas se dirige a una secuencia diana mediante un ARNg, el dominio efector puede modificar o afectar la secuencia diana. En algunas modalidades, el dominio efector puede elegirse entre un dominio de unión a ácido nucleico, un dominio de nucleasa (por ejemplo, un dominio de nucleasa no Cas), un dominio de modificación epigenética, un dominio de activación transcripcional o un dominio represor transcripcional. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo es una nucleasa, tal como una nucleasa FokI. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 9,023,649. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo es un activador o represor transcripcional. Véase, por ejemplo, Qi y otros, "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression," *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera y otros, "RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors," *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali y otros, "CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering," *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert y otros, "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes," *Cell* 154:442-51 (2013). Como tal, el agente de unión al ADN guiado por ARN se convierte esencialmente en un factor de transcripción que puede dirigirse para unirse a una secuencia diana deseada mediante el uso de un ARN de guía.

B. ARNm y ARNg modificados

En algunas modalidades, el ARNg se modifica químicamente. Un ARNg que comprende uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados se denomina ARNg "modificado" o ARNg "modificado químicamente", para describir la presencia de uno o más componentes o configuraciones de origen no natural y/o natural que se usan en lugar de, o en adición a, los residuos canónicos A, G, C y U. En algunas modalidades, un ARNg modificado se sintetiza con un nucleósido o nucleótido no canónico, aquí se denomina "modificado". Los nucleósidos y nucleótidos modificados pueden incluir uno o más de: (i) alteración, *por ejemplo*, reemplazo, de uno o ambos de los oxígenos de fosfato que no se unen y/o de uno o más de los oxígenos de fosfato

que se unen en el enlace de la cadena principal del fosfodiéster (una modificación ejemplar de la cadena principal); (ii) alteración, *por ejemplo*, reemplazo, de un componente del azúcar ribosa, *por ejemplo*, del 2' hidroxilo en el azúcar ribosa (una modificación de azúcar ejemplar); (iii) reemplazo total del grupo fosfato con conectores "defosfo" (una modificación ejemplar de la cadena principal); (iv) modificación o reemplazo de una nucleobase natural, incluido con una nucleobase no canónica (una modificación de base ejemplar); (v) reemplazo o modificación de la cadena principal de ribosa-fosfato (una modificación ejemplar de la cadena principal); (vi) modificación del extremo 3' o el extremo 5' del oligonucleótido, *por ejemplo*, eliminación, modificación o reemplazo de un grupo fosfato terminal o conjugación de un grupo, caperuza o conector (tales modificaciones en la caperuza 3' o 5' pueden comprender una modificación de azúcar y/o de la cadena principal); y (vii) modificación o reemplazo del azúcar (una modificación de azúcar ejemplar).

Como se señaló anteriormente, en algunas modalidades, una composición o formulación descrita en la presente descripción comprende un ARNm que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se proporciona, se usa o se administra un ARNm que comprende un ORF que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas. En algunas modalidades, el ORF que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN es un "ORF de agente de unión al ADN guiado por ARN modificado" o simplemente un "ORF modificado", que se usa como abreviatura para indicar que el ORF se modifica en una o más de las siguientes formas: (1) el ORF modificado tiene un contenido de uridina que varía desde su contenido de mínima uridina hasta el 150 % del contenido de mínima uridina; (2) el ORF modificado tiene un contenido de dinucleótidos de uridina que varía desde su contenido de dinucleótidos de mínima uridina hasta el 150 % del contenido de dinucleótidos de mínima uridina; (3) el ORF modificado tiene al menos un 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 201, 204, 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265, o 266; (4) el ORF modificado consiste en un conjunto de codones de los cuales al menos el 75 % de los codones son codones enumerados en la Tabla 3A de los codones de mínima uridina; o (5) el ORF modificado comprende al menos una uridina modificada. En algunas modalidades, el ORF modificado se modifica en al menos dos, tres o cuatro de las formas anteriores. En algunas modalidades, el ORF

modificado comprende al menos una uridina modificada y se modifica en al menos uno, dos, tres o todos los de (1)-(4) anteriores.

Tabla 3A de codones de mínima uridina

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

En cualquiera de las modalidades anteriores, el ORF modificado puede consistir en un conjunto de codones de los cuales al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de los codones son codones enumerados en la Tabla 3A que muestra los codones de mínima uridina.

En cualquiera de las modalidades anteriores, el ORF modificado puede comprender una secuencia con al menos 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 201, 204, 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265, o 266.

En cualquiera de las modalidades anteriores, el ORF modificado puede tener un contenido de uridina que varía desde su contenido de mínima uridina hasta 150 %, 145 %, 140 %, 135 %, 130 %, 125 %, 120 %, 115 %, 110 %, 105 %, 104 %, 103 %, 102 % o 101 % del contenido de mínima uridina.

En cualquiera de las modalidades anteriores, el ORF modificado puede tener un contenido de dinucleótidos de uridina que varía desde su contenido de dinucleótidos de mínima uridina hasta 150 %, 145 %, 140 %, 135 %, 130 %, 125 %, 120 %, 115 %, 110 %, 105 %, 104 %, 103 %, 102 % o 101 % del contenido de dinucleótidos de mínima uridina.

En cualquiera de las modalidades anteriores, el ORF modificado puede comprender una uridina modificada al menos en una, una pluralidad de, o todas las posiciones de uridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una uridina modificada en la posición 5, por ejemplo, con un halógeno, metilo o etilo. En algunas modalidades, la uridina modificada es una pseudouridina modificada en la posición 1, por ejemplo, con un halógeno, metilo o etilo. La uridina modificada puede ser, por ejemplo, pseudouridina, N1-metil-pseudouridina, 5-metoxiuridina, 5-yodouridina, o una combinación de estas. En algunas modalidades, la uridina modificada es 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es 5-yodouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es pseudouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es N1-metil-pseudouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y N1-metil-pseudouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de N1-metil pseudouridina y 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de 5-yodouridina y N1-metil-pseudouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y 5-yodouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de 5-yodouridina y 5-metoxiuridina.

En algunas modalidades, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de las posiciones de uridina en un ARNm de acuerdo con la descripción son uridinas modificadas. En algunas modalidades, 10 %-25 %, 15-25 %, 25-35 %, 35-45 %, 45-55 %, 55-65 %, 65-75 %, 75-85 %, 85-95 %, o 90-100 % de las posiciones de uridina en un ARNm de acuerdo con la descripción son uridinas modificadas, por ejemplo, 5-metoxiuridina, 5-yodouridina, N1-metil pseudouridina, pseudouridina o una combinación de estas. En algunas modalidades, 10 %-25 %, 15-25 %, 25-35

%, 35-45 %, 45-55 %, 55-65 %, 65-75 %, 75-85 %, 85-95 %, o 90-100 % de las posiciones de uridina en un ARNm de acuerdo con la descripción son 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, 10 %-25 %, 15-25 %, 25-35 %, 35-45 %, 45-55 %, 55-65 %, 65-75 %, 75-85 %, 85-95 %, o 90-100 % de las posiciones de uridina en un ARNm de acuerdo con la descripción son pseudouridina. En algunas modalidades, 10 %-25%, 15-25 %, 25-35 %, 35-45 %, 45-55 %, 55-65 %, 65-75 %, 75-85 %, 85-95 %, o 90-100 % de las posiciones de uridina en un ARNm de acuerdo con la descripción son N1-metil pseudouridina. En algunas modalidades, 10 %-25 %, 15-25 %, 25-35 %, 35-45 %, 45-55 %, 55-65 %, 65-75 %, 75-85 %, 85-95 %, o 90-100 % de las posiciones de uridina en un ARNm de acuerdo con la descripción son 5-yodouridina. En algunas modalidades, 10 %-25 %, 15-25 %, 25-35 %, 35-45 %, 45-55 %, 55-65 %, 65-75 %, 75-85 %, 85-95 %, o 90-100 % de las posiciones de uridina en un ARNm de acuerdo con la descripción son 5-metoxiuridina, y el resto son N1-metil pseudouridina. En algunas modalidades, 10 %-25 %, 15-25 %, 25-35 %, 35-45 %, 45-55 %, 55-65 %, 65-75 %, 75-85 %, 85-95 %, o 90-100 % de las posiciones de uridina en un ARNm de acuerdo con la descripción son 5-yodouridina, y el resto son N1-metil pseudouridina.

En algunas modalidades, el ARNm comprende al menos una UTR de un ARNm expresado de mamífero, tal como un ARNm expresado constitutivamente. Un ARNm se considera expresado constitutivamente en un mamífero si se transcribe continuamente en al menos un tejido de un mamífero adulto sano. En algunas modalidades, el ARNm comprende una 5' UTR, 3' UTR o 5' y 3' UTRs de un ARN expresado de mamífero, tal como un ARNm expresado constitutivamente de mamífero. El ARNm de actina es un ejemplo de ARNm expresado constitutivamente.

En algunas modalidades, el ARNm comprende al menos una UTR de hidroxiesteroide 17-beta deshidrogenasa 4 (HSD17B4 o HSD), por ejemplo, una 5' UTR de HSD. En algunas modalidades, el ARNm comprende al menos una UTR de un ARNm de globina, por ejemplo, ARNm de alfa globina humana (HBA), ARNm de beta globina humana (HBB) o ARNm de beta globina (XBG) de Xenopus laevis. En algunas modalidades, el ARNm comprende una 5' UTR, 3' UTR, o 5' y 3' UTRs de un ARNm de globina, tal como HBA, HBB o XBG. En algunas modalidades, el ARNm comprende una UTR 5' de hormona de crecimiento bovina, citomegalovirus (CMV), Hba-a1 de ratón, HSD, un gen de albúmina, HBA, HBB o XBG. En algunas modalidades, el ARNm comprende una 3' UTR de hormona de crecimiento bovina, citomegalovirus, Hba-a1 de ratón, HSD, un gen de albúmina, HBA, HBB o XBG. En algunas modalidades, el ARNm comprende 5' y 3' UTRs de hormona de crecimiento bovina, citomegalovirus, Hba-a1 de ratón, HSD, un gen de albúmina, HBA, HBB, XBG, proteína de choque térmico 90 (Hsp90), gliceraldehído 3-fosfato

deshidrogenasa (GAPDH), beta-actina, alfa-tubulina, proteína tumoral (p53) o receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

En algunas modalidades, el ARNm comprende 5' y 3' UTRs que provienen de la misma fuente, por ejemplo, un ARNm expresado constitutivamente como actina, albúmina o una globina como HBA, HBB o XBG.

En algunas modalidades, el ARNm no comprende una 5' UTR, por ejemplo, no hay nucleótidos adicionales entre la caperuza 5' y el codón de inicio. En algunas modalidades, el ARNm comprende una secuencia de Kozak (descrita a continuación) entre la caperuza 5' y el codón de inicio, pero no tiene ninguna 5' UTR adicional. En algunas modalidades, el ARNm no comprende una 3' UTR, por ejemplo, no hay nucleótidos adicionales entre el codón de parada y la cola poli-A.

En algunas modalidades, el ARNm comprende una secuencia de Kozak. La secuencia de Kozak puede afectar el inicio de la traducción y el rendimiento global de un polipéptido traducido de un ARNm. Una secuencia de Kozak incluye un codón de metionina que puede funcionar como el codón de inicio. Una secuencia de Kozak mínima es NNNRUGN en donde al menos uno de los siguientes es verdadero: el primer N es A o G y el segundo N es G. En el contexto de una secuencia de nucleótidos, R significa una purina (A o G). En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es RNNRUGN, NNNRUGG, RNNRUGG, RNNAUGN, NNNAUGG, o RNNAUGG. En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es rccRUGg con cero incompatibilidades o con hasta una o dos incompatibilidades en las posiciones en minúsculas. En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es rccAUGg con cero incompatibilidades o con hasta una o dos incompatibilidades en las posiciones en minúsculas. En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es gccRccAUGG (SEQ ID NO: 277) con cero incompatibilidades o con hasta una, dos o tres incompatibilidades en las posiciones en minúsculas. En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es gccAccAUG con cero incompatibilidades o con hasta una, dos, tres o cuatro incompatibilidades en las posiciones en minúsculas. En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es GCCACCAUG. En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es gccgccRccAUGG (SEQ ID NO: 278) con cero incompatibilidades o con hasta una, dos, tres o cuatro incompatibilidades en las posiciones en minúsculas.

En algunas modalidades, el ARNm que comprende un ORF que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en donde el ORF de la SEQ ID NO: 1 (es decir, SEQ ID NO: 204)

se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de la SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265, o 266.

En algunas modalidades, el ARNm que comprende un ORF que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 244, opcionalmente en donde el ORF de la SEQ ID NO: 244 (es decir, SEQ ID NO: 204) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de la SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265, o 266.

En algunas modalidades, el ARNm que comprende un ORF que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 256, opcionalmente en donde el ORF de la SEQ ID NO: 256 (es decir, SEQ ID NO: 204) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de la SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265, o 266.

En algunas modalidades, el ARNm que comprende un ORF que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 257, opcionalmente en donde el ORF de la SEQ ID NO: 257 (es decir, SEQ ID NO: 204) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de la SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265, o 266.

En algunas modalidades, el ARNm que comprende un ORF que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 257, opcionalmente en donde el ORF de la SEQ ID NO: 258 (es decir, SEQ ID NO: 204) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de la SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265, o 266.

En algunas modalidades, el ARNm que comprende un ORF que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 259, opcionalmente en donde el ORF de la SEQ ID NO: 259 (es decir, SEQ ID NO: 204) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de la SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265, o 266.

En algunas modalidades, el ARNm que comprende un ORF que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 260, opcionalmente en donde el ORF de la SEQ ID NO: 260 (es decir, SEQ ID NO: 204) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de la SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265, o 266.

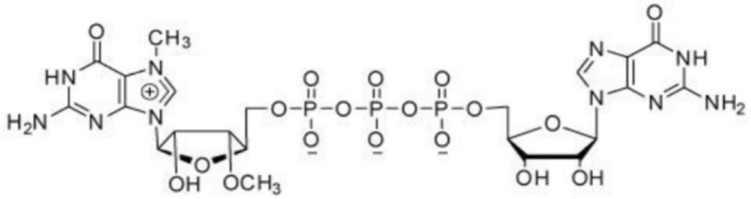
En algunas modalidades, el ARNm que comprende un ORF que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 261, opcionalmente en donde el ORF de la SEQ ID NO: 261 (es decir, SEQ ID NO: 204) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de la SEQ ID NO: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265, o 266.

En algunas modalidades, el grado de identidad con las secuencias opcionalmente sustituidas de las SEQ ID NO 243, 244 o 256-261 es del 95 %. En algunas modalidades, el grado de identidad con las secuencias opcionalmente sustituidas de las SEQ ID NO 243, 244 o 256-261 es del 98 %. En algunas modalidades, el grado de identidad con las secuencias opcionalmente sustituidas de las SEQ ID NO 243, 244 o 256-261 es del 99 %. En algunas modalidades, el grado de identidad con las secuencias opcionalmente sustituidas de las SEQ ID NO 243, 244 o 256-261 es del 100 %.

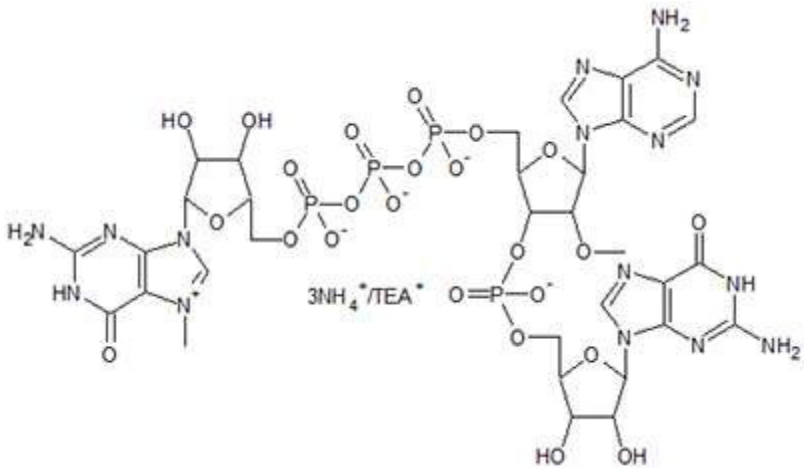
En algunas modalidades, un ARNm descrito en la presente descripción comprende una caperuza 5', tal como una Cap0, Cap1 o Cap2. Una caperuza 5' es generalmente un ribonucleótido de 7-metilguanina (que puede modificarse adicionalmente, como se discute a continuación, por ejemplo, con respecto a ARCA) unido a través de un 5'-trifosfato a la posición 5' del primer nucleótido de la cadena 5'-a-3' del ARNm, es decir, el primer nucleótido proximal de la caperuza. En Cap0, las ribosas del primer y segundo nucleótidos proximales a la caperuza del ARNm comprenden un 2'-hidroxilo. En Cap1, las ribosas del primer y segundo nucleótidos transcritos del ARNm comprenden un 2'-metoxi y un 2'-hidroxilo, respectivamente. En Cap2, las ribosas del primer y segundo nucleótidos proximales a la caperuza del ARNm comprenden un 2'-metoxi. Véase, por ejemplo, Katibah y otros, (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30; Abbas y otros, (2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115. La mayoría de los ARNm endógenos de eucariotas superiores, incluidos los ARNm de mamíferos tales como los ARNm humanos, comprenden Cap1 o Cap2. Cap0 y otras estructuras de la caperuza que difieren de Cap1 y Cap2 pueden ser inmunogénicas en mamíferos, como los humanos, debido al reconocimiento como "no propio" por los componentes del sistema inmunitario innato como IFIT-1 e IFIT-5, lo que puede resultar en niveles elevados de citoquinas, incluido el interferón tipo I. Los componentes del sistema inmunitario innato, como IFIT-1 e IFIT-5, también pueden competir con eIF4E por la unión de un ARNm con una caperuza distinta de Cap1 o Cap2, lo que potencialmente inhibe la traducción del ARNm.

Puede incluirse una caperuza cotranscripcionalmente. Por ejemplo, ARCA (análogo de caperuza anti-inverso; Thermo Fisher Scientific Cat. núm. AM8045) es un análogo de caperuza que

comprende un 7-metilguanina 3’-metoxi-5’-trifosfato unido a la posición 5’ de un ribonucleótido de guanina que puede incorporarse in vitro en un transcrito al inicio. ARCA da como resultado una caperuza Cap0 en la que la posición 2’ del primer nucleótido proximal de la caperuza es hidroxilo. Véase, por ejemplo, Stepinski y otros, (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. La estructura de ARCA se muestra a continuación.



CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies Cat. núm. N-7113) o CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies Cat. núm. N-7133) puede usarse para proporcionar una estructura Cap1 cotranscripcionalmente. Las versiones 3’-O-metiladas de CleanCap™ AG y CleanCap™ GG también están disponibles en TriLink Biotechnologies como Cat. núms. N-7413 y N-7433, respectivamente. La estructura de CleanCap™ AG se muestra a continuación.



Alternativamente, puede añadirse una caperuza a un ARN post-transcripcionalmente. Por ejemplo, la enzima de capping Vaccinia está disponible comercialmente (New England Biolabs Cat. núm. M2080S) y tiene actividades de ARN trifosfatasa y guanililtransferasa, proporcionadas por su subunidad D1, y guanina metiltransferasa, proporcionadas por su subunidad D12. Como tal, puede añadirse una 7-metilguanina a un ARN, para dar Cap0, en presencia de S-adenosil metionina y GTP. Véanse, por ejemplo, Guo, P. y Moss, B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci*. *USA* 87, 4023-4027; Mao, X. y Shuman, S. (1994) *J. Biol. Chem*. 269, 24472-24479. Para una discusión adicional sobre los enfoques de caperuzas y capping, véase, por ejemplo, el documento WO2017/053297 e Ishikawa y otros, *Nucl. Acids. Symp. Ser*. (2009) No. 53, 129-130.

En algunas modalidades, el ARNm comprende además una cola poli-adenilada (poli-A). En algunas modalidades, la cola poli-A comprende al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 adeninas, opcionalmente hasta 300 adeninas. En algunas modalidades, la cola poli-A comprende 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de adenina. En algunos casos, la cola poli-A está "interrumpida" con uno o más "anclajes" de nucleótidos no adenina en uno o más lugares dentro de la cola poli-A. Las colas poli-A pueden comprender al menos 8 nucleótidos de adenina consecutivos, pero también comprenden uno o más nucleótidos no adenina. Como se usa en la presente descripción, los "nucleótidos no adenina" se refieren a cualquier nucleótido natural o no natural que no comprende adenina. Los nucleótidos de guanina, timina y citosina son ejemplos de nucleótidos no adenina. Por lo tanto, las colas poli-A en el ARNm descrito en la presente descripción pueden comprender nucleótidos de adenina consecutivos ubicados en 3' a nucleótidos que codifican un agente de unión al ADN guiado por ARN o una secuencia de interés. En algunos casos, las colas poli-A en el ARNm comprenden nucleótidos de adenina no consecutivos ubicados en 3' a nucleótidos que codifican un agente de unión al ADN guiado por ARN o una secuencia de interés, en donde los nucleótidos no adenina interrumpen los nucleótidos de adenina en intervalos espaciados regular o irregularmente.

En algunas modalidades, el o los nucleótidos no adenina se colocan para interrumpir los nucleótidos de adenina consecutivos de modo que una proteína de unión a poli(A) pueda unirse a un tramo de nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, uno o más nucleótidos no adenina se encuentran después de al menos 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, el o los nucleótidos no adenina se localizan después de al menos 8-50 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, el o los nucleótidos no

adenina se localizan después de al menos 8-100 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, el nucleótido no adenina está después de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete nucleótidos de adenina y es seguido por al menos 8 nucleótidos de adenina consecutivos.

La cola poli-A puede comprender una secuencia de nucleótidos de adenina consecutivos seguidos de uno o más nucleótidos no adenina, opcionalmente seguidos de nucleótidos de adenina adicionales.

En algunas modalidades, la cola poli-A comprende o contiene un nucleótido no adenina o un tramo consecutivo de 2-10 nucleótidos no adenina. En algunas modalidades, el o los nucleótidos no adenina se localizan después de al menos 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunos casos, el o los nucleótidos no adenina se localizan después de al menos 8-50 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, el o los nucleótidos no adenina se localizan después de al 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, o 50 nucleótidos de adenina consecutivos.

En algunas modalidades, el nucleótido no adenina es guanina, citosina o timina. En algunos casos, el nucleótido no adenina es un nucleótido de guanina. En algunas modalidades, el nucleótido no adenina es un nucleótido de citosina. En algunas modalidades, el nucleótido no adenina es un nucleótido de timina. En algunos casos, donde está presente más de un nucleótido no adenina, el nucleótido no adenina puede seleccionarse de: a) nucleótidos de guanina y timina; b) nucleótidos de guanina y citosina; c) nucleótidos de timina y citosina; o d) nucleótidos de guanina, timina y citosina. Una cola poli-A ejemplar que comprende nucleótidos no adenina se proporciona como la SEQ ID NO: 4.

En algunas modalidades, el ARNm comprende además una cola poli-adenilada (poli-A). En algunos casos, la cola poli-A está “interrumpida” con uno o más “anclajes” de nucleótidos no adenina en uno o más lugares dentro de la cola poli-A. Las colas poli-A pueden comprender al menos 8 nucleótidos de adenina consecutivos, pero también comprenden uno o más nucleótidos no adenina. Como se usa en la presente descripción, los “nucleótidos no adenina” se refieren a cualquier nucleótido natural o no natural que no comprende adenina. Los nucleótidos de guanina, timina y citosina son ejemplos de nucleótidos no adenina. Por lo tanto, las colas poli-A en el ARNm descrito en la presente descripción pueden comprender nucleótidos de adenina consecutivos ubicados en 3’ a nucleótidos que codifican un agente de unión al ADN guiado por ARN o una secuencia de interés. En algunos casos, las colas poli-A en el ARNm comprenden

nucleótidos de adenina no consecutivos ubicados en 3' a nucleótidos que codifican un agente de unión al ADN guiado por ARN o una secuencia de interés, en donde los nucleótidos no adenina interrumpen los nucleótidos de adenina en intervalos espaciados regular o irregularmente.

En algunas modalidades, el o los nucleótidos no adenina se colocan para interrumpir los nucleótidos de adenina consecutivos de modo que una proteína de unión a poli(A) pueda unirse a un tramo de nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, uno o más nucleótidos no adenina se encuentran después de al menos 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, el o los nucleótidos no adenina se localizan después de al menos 8-50 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, el o los nucleótidos no adenina se localizan después de al menos 8-100 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, el nucleótido no adenina está después de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete nucleótidos de adenina y es seguido por al menos 8 nucleótidos de adenina consecutivos.

La cola poli-A de la presente invención puede comprender una secuencia de nucleótidos de adenina consecutivos seguidos de uno o más nucleótidos no adenina, opcionalmente seguidos de nucleótidos de adenina adicionales.

En algunas modalidades, la cola poli-A comprende o contiene un nucleótido no adenina o un tramo consecutivo de 2-10 nucleótidos no adenina. En algunas modalidades, el o los nucleótidos no adenina se localizan después de al menos 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunos casos, el o los nucleótidos no adenina se localizan después de al menos 8-50 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, el o los nucleótidos no adenina se localizan después de al 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, o 50 nucleótidos de adenina consecutivos.

En algunas modalidades, el nucleótido no adenina es guanina, citosina o timina. En algunos casos, el nucleótido no adenina es un nucleótido de guanina. En algunas modalidades, el nucleótido no adenina es un nucleótido de citosina. En algunas modalidades, el nucleótido no adenina es un nucleótido de timina. En algunos casos, donde está presente más de un nucleótido no adenina, el nucleótido no adenina puede seleccionarse de: a) nucleótidos de guanina y timina; b) nucleótidos de guanina y citosina; c) nucleótidos de timina y citosina; o d) nucleótidos de guanina, timina y citosina. Una cola poli-A ejemplar que comprende nucleótidos no adenina se proporciona como la SEQ ID NO: 4:

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAACCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.

Las modificaciones químicas como las enumeradas anteriormente pueden combinarse para proporcionar ARNm y/o ARNg modificados que comprenden nucleósidos y nucleótidos (colectivamente "residuos") que pueden tener dos, tres, cuatro o más modificaciones. Por ejemplo, un residuo modificado puede tener un azúcar modificado y una nucleobase modificada. En algunas modalidades, se modifica cada base de un ARNg, *por ejemplo*, todas las bases tienen un grupo fosfato modificado, como un grupo fosforotioato. En ciertas modalidades, todos, o sustancialmente todos, los grupos fosfato de una molécula de ARNg se reemplazan con grupos fosforotioato. En algunas modalidades, los ARNg modificados comprenden al menos un residuo modificado en, o cerca del, extremo 5' del ARN. En algunas modalidades, los ARNg modificados comprenden al menos un residuo modificado en, o cerca del, extremo 3' del ARN.

En algunas modalidades, el ARNg comprende uno, dos, tres o más residuos modificados. En algunas modalidades, al menos 5 % (*por ejemplo*, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 %) de las posiciones en un ARNg modificado son nucleósidos o nucleótidos modificados.

Los ácidos nucleicos no modificados pueden ser propensos a la degradación por, *por ejemplo*, nucleasas intracelulares o las que se encuentran en el suero. Por ejemplo, las nucleasas pueden hidrolizar enlaces fosfodiéster del ácido nucleico. Por consiguiente, en un aspecto, los ARNg descritos en la presente descripción pueden contener uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados, *por ejemplo*, para introducir estabilidad hacia las nucleasas intracelulares o del suero. En algunas modalidades, las moléculas de ARNg modificadas descritas en la presente descripción pueden exhibir una respuesta inmunitaria innata reducida cuando se introducen en una población de células, *in vivo* y *ex vivo*. El término "respuesta inmunitaria innata" incluye una respuesta celular a los ácidos nucleicos exógenos, que incluye los ácidos nucleicos monocatenarios, que implica la inducción de la expresión y liberación de citocinas, particularmente los interferones, y la muerte celular.

En algunas modalidades de una modificación de la cadena principal, el grupo fosfato de un residuo modificado puede modificarse por el reemplazo de uno o más de los oxígenos con un sustituyente

diferente. Además, el residuo modificado, *por ejemplo*, el residuo modificado presente en un ácido nucleico modificado, puede incluir el reemplazo total de un grupo fosfato no modificado con un grupo fosfato modificado como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, la modificación de la cadena principal de la cadena principal de fosfato puede incluir alteraciones que resultan en un conector sin carga o un conector cargado con distribución de carga asimétrica.

Los ejemplos de los grupos fosfato modificados incluyen fosforotioato, fosforoselenatos, fosfatos de borano, ésteres de fosfato de borano, fosfonatos de hidrógeno, fosforamidatos, fosfonatos de alquilo o arilo y fosfotriésteres. El átomo de fósforo en un grupo fosfato no modificado es aquiral. Sin embargo, el reemplazo de uno de los oxígenos que no forman puentes con uno de los átomos o grupos de átomos anteriores puede hacer que el átomo de fósforo sea quiral. El átomo de fósforo estereogénico puede poseer la configuración "R" (en la presente descripción Rp) o la configuración "S" (en la presente descripción Sp). La cadena principal también puede modificarse mediante la sustitución de un oxígeno que forma puentes, (*es decir*, el oxígeno que une el fosfato al nucleósido), con nitrógeno (fosforamidatos puenteados), azufre (fosforotioatos puenteados) y carbono (metilenfosfonatos puenteados). El reemplazo puede ocurrir en el oxígeno del enlace o en los dos oxígenos del enlace.

El grupo fosfato puede reemplazarse por conectores que no contienen fósforo en ciertas modificaciones de la cadena principal. En algunas modalidades, el grupo fosfato cargado puede reemplazarse por un grupo neutro. Los ejemplos de los grupos que pueden reemplazar al grupo fosfato pueden incluir, sin limitarse a, *por ejemplo*, fosfonato de metilo, hidroxilamino, siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, conector de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilenometilimino, metilenhidrazo, metilendimetilhidrazo y metilenoximetilimino.

Los andamios que pueden imitar los ácidos nucleicos también pueden construirse en donde el conector de fosfato y el azúcar ribosa se reemplazan por sustitutos de nucleótidos o nucleósidos resistentes a nucleasas. Dichas modificaciones pueden comprender modificaciones de la cadena principal y del azúcar. En algunas modalidades, las nucleobases pueden estar atadas por una cadena principal sustituta. Los ejemplos pueden incluir, sin limitarse a, los sustitutos de nucleósidos de morfolino, ciclobutilo, pirrolidina y ácido nucleico peptídico (PNA).

Los nucleósidos modificados y los nucleótidos modificados pueden incluir una o más modificaciones al grupo de azúcar, *es decir* a la modificación del azúcar. Por ejemplo, el grupo 2'

hidroxilo (OH) puede modificarse, *por ejemplo* reemplazarse con un número de diferentes sustituyentes “oxi” o “desoxi”. En algunas modalidades, las modificaciones al grupo 2' hidroxilo pueden mejorar la estabilidad del ácido nucleico ya que el hidroxilo ya no puede protonarse para formar un ion 2'-alcóxido.

Los ejemplos de las modificaciones del grupo 2' hidroxilo pueden incluir alcoxi o ariloxi (OR, en donde “R” puede ser, *por ejemplo*, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o un azúcar); polietilenglicoles (PEG), O $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ en donde R puede ser, *por ejemplo*, H o alquilo opcionalmente sustituido, y n puede ser un número entero de 0 a 20 (*por ejemplo*, 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 y de 4 a 20). En algunas modalidades, la modificación del grupo 2' hidroxilo puede ser 2'-O-Me. En algunas modalidades, la modificación del grupo 2' hidroxilo puede ser una modificación 2'-fluoro, que reemplaza el grupo 2' hidroxilo con un fluoruro. En algunas modalidades, la modificación del grupo 2' hidroxilo puede incluir ácidos nucleicos “bloqueados” (LNA) en los que puede conectarse el 2' hidroxilo, *por ejemplo*, por un puente C_{1-6} alquileno o C_{1-6} heteroalquileno, al carbono 4' del mismo azúcar ribosa, donde los puentes ejemplares pueden incluir puentes metileno, propileno, éter o amino; O-amino (en donde el amino puede ser, *por ejemplo* NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina o poliamino) y aminoalcoxi, O $(CH_2)_n$-amino, (en donde el amino puede ser, *por ejemplo* NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina o poliamino). En algunas modalidades, la modificación del grupo 2' hidroxilo puede incluir ácidos nucleicos "desbloqueados" (UNA) en los que el anillo de ribosa carece del enlace C2'-C3'. En algunas modalidades, la modificación del grupo 2' hidroxilo puede incluir el grupo metoxietilo (MOE), ($OCH_2CH_2OCH_3$, *por ejemplo*, un derivado de PEG).

Las modificaciones 2' “desoxi” pueden incluir hidrógeno (*es decir* azúcares desoxirribosa, *por ejemplo*, en las partes salientes del ARNds parcialmente); halo (*por ejemplo*, bromo, cloro, flúor o yodo); amino (en donde el amino puede ser, *por ejemplo* NH_2; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH2CH_2$-amino (en donde el amino puede ser, *por ejemplo*, como se describe en la presente descripción), -NHC(O)R (en donde R puede ser, *por ejemplo*, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquiltioalquilo; tioalcoxi; y alquilo,

cicloalquilo, arilo, alquenilo y alquinilo, que pueden sustituirse opcionalmente con *por ejemplo*, un amino como se describe en la presente descripción.

La modificación del azúcar puede comprender un grupo de azúcar que también puede contener uno o más carbonos que poseen la configuración estereoquímica opuesta a la del carbono correspondiente en la ribosa. Por lo tanto, un ácido nucleico modificado puede incluir nucleótidos que contienen *por ejemplo*, arabinosa como azúcar. Los ácidos nucleicos modificados también pueden incluir azúcares abásicos. Estos azúcares abásicos también pueden modificarse en uno o más de los átomos de azúcar constituyentes. Los ácidos nucleicos modificados también pueden incluir uno o más azúcares que están en forma L, *por ejemplo* L-nucleósidos.

Los nucleósidos modificados y los nucleótidos modificados descritos en la presente descripción, que pueden incorporarse a un ácido nucleico modificado, pueden incluir una base modificada, también denominada nucleobase. Los ejemplos de las nucleobases incluyen, entre otros, adenina (A), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U). Estas nucleobases pueden modificarse o reemplazarse completamente para proporcionar los residuos modificados que pueden incorporarse en los ácidos nucleicos modificados. La nucleobase del nucleótido puede seleccionarse independientemente de una purina, una pirimidina, un análogo de purina o un análogo de pirimidina. En algunas modalidades, la nucleobase puede incluir, por ejemplo, derivados naturales y sintéticos de una base.

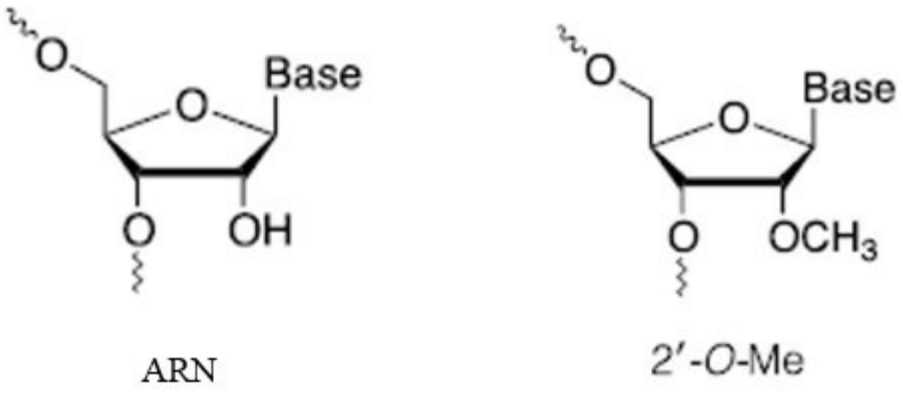
En las modalidades que emplean un ARN de guía doble, cada uno de ARNcr y ARNtr pueden contener modificaciones. Dichas modificaciones pueden estar en uno o ambos extremos de ARNcr y/o ARNtr. En las modalidades que comprenden un ARNsg, uno o más residuos en uno o ambos extremos del ARNsg pueden modificarse químicamente, o el ARNsg completo puede modificarse químicamente. Ciertas modalidades comprenden una modificación del extremo 5'. Ciertas modalidades comprenden una modificación del extremo 3'. En ciertas modalidades, uno o más o todos los nucleótidos en el saliente monocatenario de una molécula de ARN de guía son desoxinucleótidos.

En algunas modalidades, los ARN de guía descritos en la presente descripción comprenden uno de los patrones de modificación descritos en el documento US 62/431,756, presentado el 8 de diciembre de 2016, titulado “Chemically Modified Guide RNAs”, cuyo contenido se incorpora por la presente descripción como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, la invención comprende un ARNg que comprende una o más modificaciones. En algunas modalidades, la modificación comprende un nucleótido modificado 2'-O-metil (2'-O-Me). En algunas modalidades, la modificación comprende un enlace de fosforotioato (PS) entre los nucleótidos.

Los términos “mA”, “mC”, “mU” o “mG” pueden usarse para denotar un nucleótido que se ha modificado con 2'-O-Me.

La modificación de 2'-*O*-metilo puede representarse de la siguiente manera:

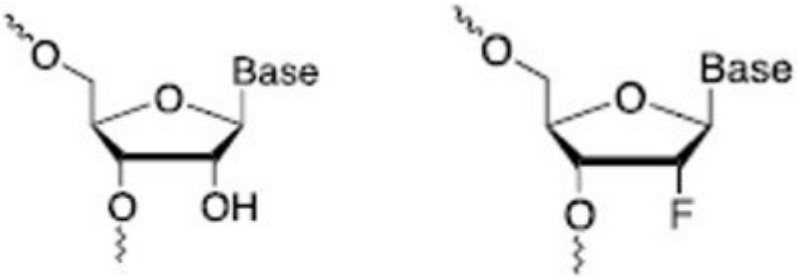


ARN 2′-*O*-Me

Otra modificación química que se ha demostrado que influye en los anillos de azúcares de los nucleótidos es la sustitución de halógenos. Por ejemplo, la sustitución de 2’-fluoro (2’-F) en los anillos de azúcares de los nucleótidos puede aumentar la afinidad de unión a los oligonucleótidos y la estabilidad de la nucleasa.

En esta solicitud, los términos “fA,” “fC,” “fU,” o “fG” pueden usarse para denotar un nucleótido que se ha sustituido con 2’-F.

La sustitución de 2’-F puede representarse de la siguiente manera:



ARN 2′-F-ARN

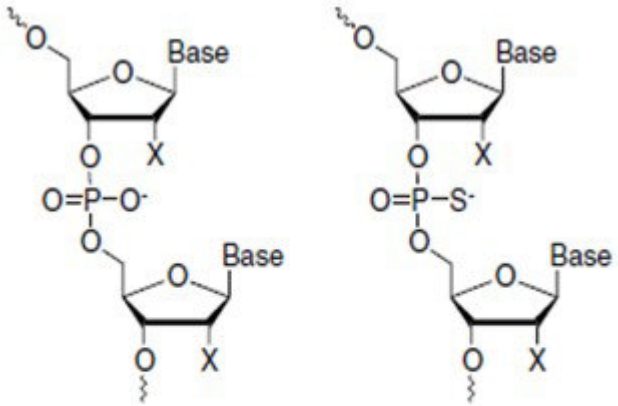
Composición natural de ARN Sustitución 2'F

La unión o el enlace de fosforotioato (PS) se refiere a un enlace en el que un azufre se sustituye por un oxígeno fosfato que no forma puentes en un enlace fosfodiéster, por ejemplo en los enlaces entre las bases de los nucleótidos. Cuando se usan fosforotioatos para generar oligonucleótidos, los oligonucleótidos modificados también pueden denominarse S-oligos.

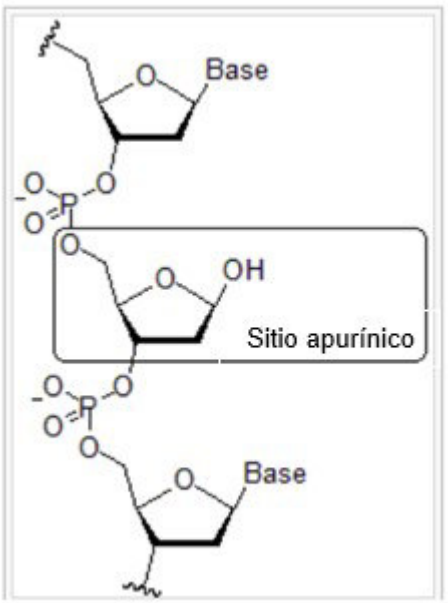
Puede usarse un "*" para representar una modificación de PS. En esta solicitud, los términos A*, C*, U* o G* pueden usarse para denotar un nucleótido que se une al siguiente (por ejemplo, 3') nucleótido con un enlace PS.

En esta solicitud, los términos "mA*," "mC*," "mU*," o "mG*" pueden usarse para denotar un nucleótido que se ha sustituido con 2'-O-Me y que se une al siguiente (por ejemplo, 3') nucleótido con un enlace PS.

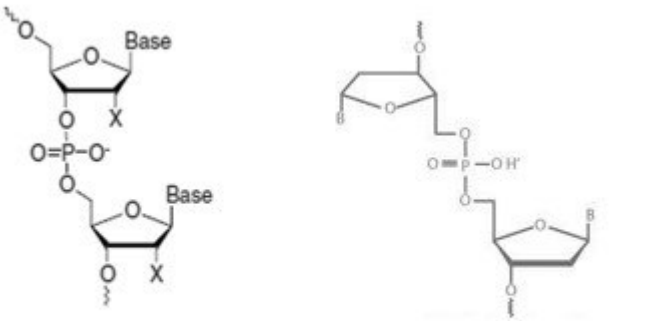
El siguiente diagrama muestra la sustitución de S- en un oxígeno fosfato que no forma puentes, generando un enlace PS en lugar de un enlace fosfodiéster:



Los nucleótidos at enadas. La siguiente figura muestra un omo apurínico) que carece de una base:



Las bases invertidas se refieren a aquellas con enlaces que se invierten del enlace 5’ a 3’ normal (es decir, un enlace 5’ a 5’ o un enlace 3’ a 3’). Por ejemplo:



Enlace oligonucleótido normal

Enlace oligonucleótido invertido

Un nucleótido abásico puede unirse con un enlace invertido. Por ejemplo, un nucleótido abásico puede unirse al nucleótido 5’ terminal a través de un enlace 5’ a 5’, o un nucleótido básico puede unirse al nucleótido 3’ terminal a través de un enlace 3’ a 3’. Un nucleótido abásico invertido, ya sea en el nucleótido 3’ o 5’ terminal, también puede denominarse una caperuza terminal abásica invertida.

En algunas modalidades, se modifican uno o más de los primeros tres, cuatro o cinco nucleótidos en el 5’ terminal, y uno o más de los últimos tres, cuatro o cinco nucleótidos en el 3’ terminal. En algunas modalidades, la modificación es un 2’-O-Me, 2’-F, nucleótido abásico invertido, enlace PS u otra modificación de nucleótidos bien conocida en la técnica para aumentar la estabilidad y/o el rendimiento.

En algunas modalidades, los primeros cuatro nucleótidos en el 5' terminal y los últimos cuatro nucleótidos en el 3' terminal se unen con enlaces de fosforotioato (PS).

En algunas modalidades, los primeros tres nucleótidos en el 5' terminal y los últimos tres nucleótidos en el 3' terminal comprenden un nucleótido modificado 2'-O-metil (2'-O-Me). En algunas modalidades, los primeros tres nucleótidos en el 5' terminal y los últimos tres nucleótidos en el 3' terminal comprenden un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F). En algunas modalidades, los primeros tres nucleótidos en el 5' terminal y los últimos tres nucleótidos en el 3' terminal comprenden un nucleótido abásico invertido.

En algunas modalidades, el ARN de guía comprende un ARNsg modificado. En algunas modalidades, el ARNsg comprende el patrón de modificación que se muestra en la SEQ ID No: 3, donde N es cualquier nucleótido natural o no natural, y donde la totalidad de los N comprende una secuencia de guía que dirige una nucleasa a una secuencia diana.

En algunas modalidades, el ARN de guía comprende un ARNsg mostrado en cualquiera de las SEQ ID No: 87-124. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende un ARNsg que comprende cualquiera de las secuencias de guía de las SEQ ID No: 5-82 y los nucleótidos de la SEQ ID No: 125, en donde los nucleótidos de la SEQ ID No: 125 están en el extremo 3' de la secuencia de guía, y en donde la secuencia de guía puede modificarse como se muestra en la SEQ ID No: 3.

C. Complejo de ribonucleoproteína

En algunas modalidades, se abarca una composición que comprende uno o más ARNg que comprenden una o más secuencias de guía de la Tabla 1 o uno o más ARNsg de la Tabla 2 y un agente de unión al ADN guiado por ARN, por ejemplo, una nucleasa, tal como una nucleasa Cas, como Cas9. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN codificado tiene actividad de cleavasa, que también puede denominarse actividad de endonucleasa de doble cadena. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN comprende una nucleasa Cas. Los ejemplos de nucleasas Cas9 incluyen las de los sistemas CRISPR de tipo II de *S. pyogenes, S. aureus*y otros procariotas (véase, por ejemplo, la lista en el siguiente párrafo), y las

versiones modificadas (por ejemplo, diseñadas o mutantes) de estos. Véase, por ejemplo, US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1. Otros ejemplos de nucleasas Cas incluyen un complejo Csm o Cmr de un sistema CRISPR de tipo III o Cas10, Csm1 o la subunidad Cmr2 de este; y un complejo Cascade de un sistema CRISPR tipo I, o la subunidad Cas3 de este. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede ser de un sistema Tipo-IIA, Tipo-IIB o Tipo-IIC. Para una discusión de varios sistemas CRISPR y nucleasas Cas, véanse, por ejemplo, Makarova y otros, NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova y otros, NAT. REV. MICROBIOL, 13: 722-36 (2015); Shmakov y otros, MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015).

Las especies ejemplares no limitantes de las que puede derivarse la nucleasa Cas incluyen *Streptococcus pyogenes, Streptococcus thermophilus, Streptococcus sp., Staphylococcus aureus, Listeria innocua, Lactobacillus gasseri, Francisella novicida, Wolinella succinogenes, Sutterella wadsworthensis, Gammaproteobacteria, 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, bacterias Burkholderiales, Polaromonas naphthalenivorans, Polaromonas sp., Crocosphaera 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.*, bacteria *Lachnospiraceae* ND2006, y *Acaryochloris marina*.

En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Streptococcus thermophilus*. En

algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Neisseria meningitidis*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Staphylococcus aureus*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Francisella novicida*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Acidaminococcus sp.* En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de la bacteria *Lachnospiraceae* ND2006. En modalidades adicionales, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Francisella tularensis, bacteria Lachnospiraceae, Butyrivibrio proteoclasticus, bacteria Peregrinibacteria, bacteria Parcubacteria, Smithella, Acidaminococcus, Candidatus Metanoplasma termitum, Eubacterium eligens, Moraxella bovoculi, Leptospira inadai, Disphyromonas, Porphyromonas* o *Porphyromonas macacae*. En ciertas modalidades, la nucleasa Cas es una nucleasa Cpf1 de una *Acidaminococcus* o *Lachnospiraceae*.

En algunas modalidades, el ARNg junto con un agente de unión al ADN guiado por ARN se denomina complejo de ribonucleoproteína (RNP). En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN es una nucleasa Cas. En algunas modalidades, el ARNg junto con una nucleasa Cas se denomina RNP Cas. En algunas modalidades, el RNP comprende componentes de Tipo I, Tipo II o Tipo III. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la proteína Cas9 del sistema CRISPR/Cas de tipo II. En alguna modalidad, el ARNg junto con Cas9 se denomina RNP Cas9.

Cas9 de tipo salvaje tiene dos dominios de nucleasa: RuvC y HNH. El dominio RuvC escinde la cadena de ADN no diana, y el dominio HNH escinde la cadena diana del ADN. En algunas modalidades, la proteína Cas9 comprende más de un dominio RuvC y/o más de un dominio HNH. En algunas modalidades, la proteína Cas9 es una Cas9 de tipo salvaje. En cada una de las modalidades de la composición, el uso y el método, Cas induce una ruptura de doble cadena en el ADN diana.

Cas9 de tipo salvaje tiene dos dominios de nucleasa: RuvC y HNH. El dominio RuvC escinde la cadena de ADN no diana, y el dominio HNH escinde la cadena diana del ADN. En algunas modalidades, la nucleasa Cas9 comprende más de un dominio RuvC y/o más de un dominio HNH. En algunas modalidades, la nucleasa Cas9 es una Cas9 de tipo salvaje. En algunas modalidades, Cas9 es capaz de inducir una ruptura de doble cadena en el ADN diana. En ciertas modalidades, la nucleasa Cas puede escindir ADNds, puede escindir una hebra de ADNds, o puede no tener actividad de nickasa o cleavasa de ADN. Se proporciona una secuencia de aminoácidos de Cas9 ejemplar como la SEQ ID NO: 203. Se proporciona una secuencia del ORF del ARNm de Cas9 ejemplar, que incluye codones de inicio y parada, como la SEQ ID NO: 204. Se proporciona una

secuencia de codificación ejemplar del ARNm de Cas9, adecuada para su inclusión en una proteína de fusión, como la SEQ ID NO: 210.

En algunas modalidades, se usan nucleasas Cas quiméricas, donde un dominio o región de la proteína se reemplaza por una parte de una proteína diferente. En algunas modalidades, un dominio de nucleasa Cas puede reemplazarse con un dominio de una nucleasa diferente, tal como Fok1. En algunas modalidades, una nucleasa Cas puede ser una nucleasa modificada.

En otras modalidades, la nucleasa Cas puede ser de un sistema CRISPR/Cas Tipo I. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede ser un componente del complejo Cascade de un sistema CRISPR/Cas Tipo I. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede ser una proteína Cas3. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede ser de un sistema CRISPR/Cas de tipo III. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede tener una actividad de escisión del ARN.

En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN tiene una actividad de nickasa de cadena sencilla, es decir, puede cortar una cadena de ADN para producir una ruptura de cadena sencilla, también conocida como “muesca”. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN comprende una nickasa Cas. Una nickasa es una enzima que genera una muesca en ADNds, es decir, corta una cadena pero no la otra de la doble hélice del ADN. En algunas modalidades, una nickasa Cas es una versión de una nucleasa Cas (por ejemplo, una nucleasa Cas discutida anteriormente) en la que un sitio activo endonucleolítico se inactiva, por ejemplo, por una o más alteraciones (por ejemplo, mutaciones puntuales) en un dominio catalítico. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 8,889,356 para la discusión de las nickasas Cas y las alteraciones ejemplares del dominio catalítico. En algunas modalidades, una nickasa Cas, tal como la nickasa Cas9, tiene un dominio RuvC o HNH inactivo. Se proporciona una secuencia ejemplar de aminoácidos de la nickasa Cas9 como la SEQ ID NO: 206. Se proporciona una secuencia ejemplar del ORF del ARNm de la nickasa Cas9, que incluye codones de inicio y parada, como la SEQ ID NO: 207. Se proporciona una secuencia de codificación ejemplar del ARNm de la nickasa Cas9, adecuada para su inclusión en una proteína de fusión, como la SEQ ID NO: 211.

En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN se modifica para contener solo un dominio funcional de nucleasa. Por ejemplo, la proteína agente puede modificarse de modo que uno de los dominios de nucleasa se mute o se elimine total o parcialmente para reducir su actividad de escisión del ácido nucleico. En algunas modalidades, se usa una nickasa que tiene un dominio RuvC con actividad reducida. En algunas modalidades, se usa una nickasa que tiene un

dominio RuvC inactivo. En algunas modalidades, se usa una nickasa que tiene un dominio HNH con actividad reducida. En algunas modalidades, se usa una nickasa que tiene un dominio HNH inactivo.

En algunas modalidades, un aminoácido conservado dentro de un dominio de nucleasa de la proteína Cas se sustituye para reducir o alterar la actividad de nucleasa. En algunas modalidades, una nucleasa Cas puede comprender una sustitución de aminoácidos en RuvC o el dominio de nucleasa de tipo RuvC. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares en RuvC o el dominio de nucleasa de tipo RuvC incluyen D10A (basado en la proteína Cas9 de S. *pyogenes*). *Véase*, *por ejemplo*, Zetsche y otros. (2015) *Cell* Oct 22:163(3): 759-771. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede comprender una sustitución de aminoácidos en HNH o el dominio de nucleasa de tipo HNH. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares en HNH o el dominio de nucleasa de tipo HNH incluyen E762A, H840A, N863A, H983A, y D986A (basado en la proteína Cas9 de S. *pyogenes*). *Véase*, *por ejemplo*, Zetsche y otros. (2015). Otras sustituciones de aminoácidos ejemplares incluyen D917A, E1006A y D1255A (basado en la secuencia U112 Cpf1 (FnCpf1) de *Francisella novicida* (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN)).

En algunas modalidades, se proporciona un ARNm que codifica una nickasa en combinación con un par de ARN de guía que son complementarios a las cadenas sentido y antisentido de la secuencia diana, respectivamente. En esta modalidad, los ARN de guía dirigen la nickasa a una secuencia diana e introducen una DSB generando una muesca en las cadenas opuestas de la secuencia diana (es decir, doble muesca). En algunas modalidades, el uso de la doble muesca puede mejorar la especificidad y reducir los efectos fuera de la diana. En algunas modalidades, se usa una nickasa junto con dos ARN de guía separados que se dirigen a cadenas opuestas de ADN para producir una doble muesca en el ADN diana. En algunas modalidades, se usa una nickasa junto con dos ARN de guía separados que se seleccionan para estar cerca para producir una doble muesca en el ADN diana.

En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN carece de actividad de cleavasa y nickasa. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN comprende un polipéptido dCas de unión al ADN. Un polipéptido dCas tiene actividad de unión al ADN mientras que esencialmente carece de actividad catalítica (cleavasa/nickasa). En algunas modalidades, el polipéptido dCas es un polipéptido dCas9. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN que carece de actividad de cleavasa y nickasa o el polipéptido dCas de unión al ADN es una versión de una nucleasa Cas (por ejemplo, una nucleasa Cas discutida

anteriormente) en la que sus sitios activos endonucleolíticos están inactivos, por ejemplo, por una o más alteraciones (por ejemplo, mutaciones puntuales) en sus dominios catalíticos. Véase, por ejemplo, US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1. Se proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar de dCas9 como la SEQ ID NO: 208. Se proporciona una secuencia del ORF del ARNm de Cas9 ejemplar, que incluye codones de inicio y parada, como la SEQ ID NO: 209. Se proporciona una secuencia de codificación ejemplar del ARNm de Cas9, adecuada para su inclusión en una proteína de fusión, como la SEQ ID NO: 212.

En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN comprende uno o más dominios funcionales heterólogos (por ejemplo, es o comprende un polipéptido de fusión).

En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede facilitar el transporte del agente de unión al ADN guiado por ARN al núcleo de una célula. Por ejemplo, el dominio funcional heterólogo puede ser una señal de localización nuclear (NLS). En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con 1-10 NLS(s). En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con 1-5 NLS(s). En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con un NLS. Cuando se usa una NLS, la NLS puede unirse en el N-terminal o el C-terminal de la secuencia del agente de unión al ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse C-terminalmente al menos a una NLS. También puede insertarse una NLS dentro de la secuencia del agente de unión al ADN guiado por ARN. En otras modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con más de una NLS. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con 2, 3, 4 o 5 NLSs. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con dos NLSs. En ciertas circunstancias, las dos NLSs pueden ser iguales (*por ejemplo*, dos NLSs de SV40) o diferentes. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN se fusiona con dos secuencias de NLS de SV40 unidas en el extremo carboxilo. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con dos NLSs, una unida en el N-terminal y otra en el C-terminal. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse con 3 NLSs. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede fusionarse sin NLS. En algunas modalidades, la NLS puede ser una secuencia monopartita, tal como, *por ejemplo*, NLS de SV40, PKKKRKV (SEQ ID NO: 274) o PKKKRRV (SEQ ID NO: 275). En algunas modalidades, la NLS puede ser una secuencia bipartita, tal como la NLS de nucleoplasmina, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 276). En

una modalidad específica, una única NLS PKKKRKV (SEQ ID NO: 274) puede unirse en el C-terminal del agente de unión al ADN guiado por ARN. Uno o más conectores se incluyen opcionalmente en el sitio de fusión. En algunas modalidades, una o más NLS(s) de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores están presentes en el agente de unión al ADN guiado por ARN en combinación con uno o más dominios funcionales heterólogos adicionales, tales como cualquiera de los dominios funcionales heterólogos descritos a continuación.

En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede ser capaz de modificar la vida media intracelular del agente de unión al ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, puede aumentarse la vida media del agente de unión al ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, puede reducirse la vida media del agente de unión al ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede ser capaz de aumentar la estabilidad del agente de unión al ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede ser capaz de reducir la estabilidad del agente de unión al ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede actuar como un péptido señal para la degradación de proteínas. En algunas modalidades, la degradación de proteínas puede estar mediada por enzimas proteolíticas, tales como, por ejemplo, proteasomas, proteasas lisosómicas o proteasas de calpaína. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede comprender una secuencia PEST. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN puede modificarse mediante la adición de ubiquitina o una cadena de poliubiquitina. En algunas modalidades, la ubiquitina puede ser una proteína similar a la ubiquitina (UBL). Los ejemplos no limitantes de proteínas similares a la ubiquitina incluyen un pequeño modificador similar a la ubiquitina (SUMO), ubiquitina de reacción cruzada (UCRP, también conocida como gen estimulado por interferón 15 (ISG15)), ubiquitina relacionada con el modificador 1 (URM1), proteína 8 reguladora del desarrollo y expresión de la célula neuronal precursora (NEDD8, también llamada Rub1 en *S. cerevisiae*), antígeno leucocitario humano asociado a F (FAT10), autofagia-8 (ATG8) y -12 (ATG12), proteína tipo Fau ubiquitina (FUB1), UBL anclada a la membrana (MUB), ubiquitina dobladora modificadora-1 (UFM1) y la proteína similar a la ubiquitina-5 (UBL5).

En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede ser un dominio marcador. Los ejemplos no limitantes de dominios marcadores incluyen proteínas fluorescentes, marcadores de purificación, marcadores de epítopo y secuencias de genes reporteros. En algunas modalidades, el dominio marcador puede ser una proteína fluorescente. Los ejemplos no limitantes de proteínas

fluorescentes adecuadas incluyen proteínas fluorescentes verdes (*por ejemplo*, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, Azami Green monomérico, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), proteínas fluorescentes amarillas (*por ejemplo*, YFP, EYFP, Citrina, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), proteínas fluorescentes azules (*por ejemplo*, EBFP, EBFP2, Azurita, mKalamal, GFPuv, Zafiro, Zafiro T,), proteínas fluorescentes cian (*por ejemplo*, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), proteínas fluorescentes rojas (*por ejemplo*, mKate, mKate2, mPlum, monómero DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-monómero, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRasberry, mStrawberry, Jred) y proteínas fluorescentes naranjas (mOrange, mKO, Kusabira-naranja, Kusabira-Orange monomérica, mTangerine, tdTomato) o cualquier otra proteína fluorescente adecuada. En otras modalidades, el dominio marcador puede ser un marcador de purificación y/o un marcador de epítopo. Los marcadores ejemplares no limitantes incluyen glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP), tioredoxina (TRX), poli(NANP), marcador de purificación de afinidad en tándem (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 portadora de biotina carboxilo (BCCP), poli-His y calmodulina. Los genes reporteros ejemplares no limitantes incluyen glutatión-S-transferasa (GST), peroxidasa de rábano picante (HRP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, luciferasa o proteínas fluorescentes.

En modalidades adicionales, el dominio funcional heterólogo puede dirigir el agente de unión al ADN guiado por ARN a un orgánulo, tipo de célula, tejido u órgano específico. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede dirigir el agente de unión al ADN guiado por ARN a las mitocondrias.

En modalidades adicionales, el dominio funcional heterólogo puede ser un dominio efector. Cuando el agente de unión al ADN guiado por ARN se dirige a su secuencia diana, *por ejemplo*, cuando una nucleasa Cas se dirige a una secuencia diana mediante un ARNg, el dominio efector puede modificar o afectar la secuencia diana. En algunas modalidades, el dominio efector puede elegirse entre un dominio de unión a ácido nucleico, un dominio de nucleasa (por ejemplo, un dominio de nucleasa no Cas), un dominio de modificación epigenética, un dominio de activación transcripcional o un dominio represor transcripcional. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo es una nucleasa, tal como una nucleasa FokI. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 9,023,649. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo

es un activador o represor transcripcional. Véase, por ejemplo, Qi y otros, "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression," *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera y otros, "RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors," *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali y otros, "CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering," *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert y otros, "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes," *Cell* 154:442-51 (2013). Como tal, el agente de unión al ADN guiado por ARN se convierte esencialmente en un factor de transcripción que puede dirigirse para unirse a una secuencia diana deseada mediante el uso de un ARN de guía.

D. Determinación de la eficacia de los ARNg

En algunas modalidades, la eficacia de un ARNg se determina cuando se suministra o expresa junto con otros componentes que forman un RNP. En algunas modalidades, el ARNg se expresa junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una proteína Cas. En algunas modalidades, el ARNg se suministra o expresa en una línea celular que ya expresa de manera estable una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una proteína Cas. En algunas modalidades, el ARNg se suministra a una célula como parte de un RNP. En algunas modalidades, el ARNg se suministra a una célula junto con un ARNm que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas.

Como se describe en la presente descripción, el uso de una nucleasa de ADN guiada por ARN y un ARN de guía descrito en la presente descripción puede conducir a rupturas bicatenarias en el ADN que pueden producir errores en forma de mutaciones de inserción/deleción (indel) tras la reparación por la maquinaria celular. Muchas mutaciones debidas a indeles alteran el marco de lectura o introducen codones de parada prematuros y, por lo tanto, producen una proteína no funcional.

En algunas modalidades, la eficacia de los ARNg particulares se determina sobre la base de modelos *in vitro*. En algunas modalidades, el modelo *in vitro* es células HEK293 que expresan establemente Cas9 (HEK293_Cas9). En algunas modalidades, el modelo *in vitro* es células de hepatocarcinoma humano HUH7. En algunas modalidades, el modelo *in vitro* es células HepG2. En algunas modalidades, el modelo *in vitro* es hepatocitos primarios humanos. En algunas modalidades, el modelo *in vitro* es hepatocitos primarios de cynomolgus. Con respecto al uso de hepatocitos primarios humanos, pueden usarse hepatocitos primarios humanos disponibles comercialmente para proporcionar una mayor consistencia entre los experimentos. En algunas

modalidades, se determina el número de sitios fuera de la diana en los que se produce una deleción o inserción en un modelo in vitro (por ejemplo, en hepatocitos primarios humanos), por ejemplo, mediante el análisis del ADN genómico de los hepatocitos primarios humanos transfectados in vitro con el ARNm de Cas9 y el ARN de guía. En algunas modalidades, dicha determinación comprende analizar el ADN genómico de los hepatocitos primarios humanos transfectados in vitro con el ARNm de Cas9, el ARN de guía y un oligonucleótido donador. En los ejemplos de trabajo a continuación se proporcionan los procedimientos ejemplares para tales determinaciones.

En algunas modalidades, la eficacia de los ARNg particulares se determina a través de múltiples modelos celulares *in vitro* para un proceso de selección de ARNg. En algunas modalidades, se realiza una comparación de línea celular de los datos con los ARNg seleccionados. En algunas modalidades, se realiza la selección cruzada en múltiples modelos celulares.

En algunas modalidades, la eficacia de los ARNg particulares se determina sobre la base de modelos *in vivo*. En algunas modalidades, el modelo *in vivo* es un modelo de roedor. En algunas modalidades, el modelo de roedor es un ratón que expresa un gen *TTR* humano, que puede ser un gen *TTR* humano mutante. En algunas modalidades, el modelo *in vivo* es un primate no humano, por ejemplo, el mono cynomolgus.

En algunas modalidades, la eficacia de un ARN de guía se mide mediante el porcentaje de edición de *TTR*. En algunas modalidades, el porcentaje de edición de *TTR* se compara con el porcentaje de edición necesario para lograr la disminución de la proteína TTR, por ejemplo, en el medio de cultivo celular en el caso de un modelo *in vitro* o en suero o tejido en el caso de un modelo *in vivo*.

En algunas modalidades, la eficacia de un ARN de guía se mide por el número y/o frecuencia de los indeles en las secuencias fuera de la diana dentro del genoma del tipo de célula diana. En algunas modalidades, se proporcionan los ARN de guía eficaces que producen los indeles en los sitios fuera de la diana a frecuencias muy bajas (por ejemplo, <5 %) en una población celular y/o en relación con la frecuencia de generación de los indeles en el sitio diana. Por lo tanto, la descripción proporciona los ARN de guía que no exhiben formación de indeles fuera de la diana en el tipo de célula diana (por ejemplo, un hepatocito), o que producen una frecuencia de formación de indeles fuera de la diana de <5 % en una población celular y/o en relación con la frecuencia de generación del indel en el sitio diana. En algunas modalidades, la descripción proporciona los ARN de guía que no exhiben ninguna formación de indeles fuera de la diana en el tipo de célula diana (por ejemplo, hepatocito). En algunas modalidades, se proporcionan los ARN de guía que producen indeles en menos de 5 sitios fuera de la diana, por ejemplo, según se evalúa mediante uno

o más métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, se proporcionan los ARN de guía que producen indeles en menos de, o igual a, 4, 3, 2 o 1 sitio fuera de la diana, por ejemplo, según se evalúa mediante uno o más métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, el sitio o los sitios fuera de la diana no se producen en una región de codificación de proteínas en el genoma de la célula diana (por ejemplo, hepatocito).

En algunas modalidades, la detección de los eventos de edición génica, tales como la formación de mutaciones de inserción/deleción ("indel") y los eventos de reparación dirigida por homología (HDR) en el ADN diana usan la amplificación lineal con un cebador marcado y el aislamiento de los productos de amplificación marcados (en la presente descripción en adelante denominado "LAM-PCR" o método de "Amplificación lineal (LA)").

En algunas modalidades, el método comprende aislar el ADN celular de una célula que se ha inducido a tener una ruptura de doble cadena (DSB) y opcionalmente que se ha provisto con un molde HDR para reparar la DSB; realizar al menos un ciclo de amplificación lineal del ADN con un cebador marcado; aislar los productos de la amplificación lineal que comprenden el marcador, descartando así cualquier producto de amplificación que se amplificó con un cebador no marcado; opcionalmente amplificar aún más los productos aislados; y analizar los productos de la amplificación lineal, o los productos amplificados adicionales, para determinar la presencia o ausencia de un evento de edición como, por ejemplo, una ruptura de doble cadena, una inserción, deleción, o secuencia del molde HDR en el ADN diana. En algunos casos, el evento de edición puede cuantificarse. La cuantificación y similares tal como se usan en la presente descripción (incluso en el contexto de los eventos de edición HDR y no HDR, tales como los indeles) incluyen la detección de la frecuencia y/o tipo(s) de eventos de edición en una población.

En algunas modalidades, solo se realiza un ciclo de amplificación lineal.

En algunos casos, el cebador marcado comprende un código de barras molecular. En algunas modalidades, el cebador marcado comprende un código de barras molecular, y solo se realiza un ciclo de amplificación lineal.

En algunas modalidades, la etapa de análisis comprende secuenciar los productos amplificados lineales o los productos amplificados adicionales. La secuenciación puede comprender cualquier método conocido por los expertos en la técnica, incluidas la secuenciación de próxima generación y la clonación de los productos de la amplificación lineal o los productos amplificados adicionales en un plásmido y la secuenciación del plásmido o una parte del plásmido. En otros aspectos, la etapa de análisis comprende realizar PCR digital (dPCR) o PCR digital en gotas (ddPCR) en los

productos amplificados lineales o en los productos amplificados adicionales. En otros casos, la etapa de análisis comprende poner en contacto los productos amplificados lineales o los productos amplificados adicionales con una sonda de ácido nucleico diseñada para identificar el ADN que comprende la secuencia del molde HDR y detectar las sondas que se han unido al producto o productos amplificados lineales o al producto o productos amplificados adicionales. En algunas modalidades, el método comprende además determinar la ubicación del molde HDR en el ADN diana.

En ciertas modalidades, el método comprende además determinar la secuencia de un sitio de inserción en el ADN diana, en donde el sitio de inserción es la ubicación donde el molde HDR se incorpora al ADN diana, y en donde el sitio de inserción puede incluir alguna secuencia del ADN diana y alguna secuencia del molde HDR.

En algunas modalidades, la amplificación lineal del ADN diana con un cebador marcado se realiza durante 1-50 ciclos, 1-60 ciclos, 1-70 ciclos, 1-80 ciclos, 1-90 ciclos o 1-100 ciclos.

En algunas modalidades, la amplificación lineal del ADN diana con un cebador marcado comprende una etapa de desnaturalización para separar los dúplex de ADN, una etapa de hibridación para permitir la unión del cebador y un paso de elongación. En algunas modalidades, la amplificación lineal es isotérmica (no requiere un cambio de temperatura). En algunas modalidades, la amplificación lineal isotérmica es una amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), una amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), una amplificación dependiente de helicasa o una reacción de amplificación de enzima de corte.

En algunas modalidades, el cebador marcado se hibrida al ADN diana en al menos 50, en al menos 60, en al menos 70, en al menos 80, en al menos 90, en al menos 100, en al menos 110, en al menos 120, en al menos 130, en al menos 140, en al menos 150, en al menos 160, en al menos 170, en al menos 180, en al menos 190, en al menos 200, en al menos 210, en al menos 220, en al menos 230, en al menos 240, en al menos 250, en al menos 260, en al menos 270, en al menos 280, en al menos 290, en al menos 300, en al menos 1,000, en al menos 5,000, o en al menos 10,000 nucleótidos lejos de la ubicación del evento de edición esperado, por ejemplo, la inserción, la deleción, o el sitio de inserción del molde.

En algunas modalidades, el cebador marcado comprende un código de barras molecular. En algunas modalidades, el código de barras molecular comprende una secuencia que no es complementaria al ADN diana. En algunas modalidades, el código de barras molecular comprende 6, 8, 10 o 12 nucleótidos.

En algunas modalidades, el marcador en el cebador es biotina, estreptavidina, digoxigenina, una secuencia de ADN o isotiocianato de fluoresceína (FITC).

En algunas modalidades, el producto o los productos de amplificación lineal se aíslan mediante el uso de un reactivo de captura específico para el marcador en el cebador. En algunas modalidades, el reactivo de captura está en una perla, soporte sólido, matriz o columna. En algunas modalidades, la etapa de aislamiento comprende poner en contacto el producto o los productos de amplificación lineal con un reactivo de captura específico para el marcador en el cebador. En algunas modalidades, el reactivo de captura es biotina, estreptavidina, digoxigenina, una secuencia de ADN o isotiocianato de fluoresceína (FITC).

En algunas modalidades, el marcador es biotina y el reactivo de captura es estreptavidina. En algunas modalidades, el marcador es estreptavidina y el reactivo de captura es biotina. En algunas modalidades, el marcador está en el 5' terminal del cebador, el 3' terminal del cebador, o interno al cebador. En algunas modalidades, el marcador y/o el reactivo de captura se eliminan después de la etapa de aislamiento. En algunas modalidades, el marcador y/o el reactivo de captura no se eliminan, y las etapas adicionales de amplificación y análisis se realizan en presencia del marcador y/o el reactivo de captura.

En algunas modalidades, la amplificación adicional es no lineal. En algunas modalidades, la amplificación adicional es PCR digital, qPCR o RT-PCR. En algunas modalidades, la secuenciación es la secuenciación de próxima generación (NGS).

En algunas modalidades, el ADN diana es genómico o mitocondrial. En algunas modalidades, el ADN diana es el ADN genómico de una célula procariota o eucariota. En algunas modalidades, el ADN diana es de mamífero. El ADN diana puede ser de una célula que no se divide o de una célula que se divide. En algunas modalidades, el ADN diana puede ser de una célula primaria. En algunas modalidades, el ADN diana es de una célula replicante.

En algunos casos, el ADN celular se corta antes de la amplificación lineal. En algunas modalidades, el ADN cortado tiene un tamaño promedio entre 0.5 kb y 20 kb. En algunos casos, el ADN celular se corta a un tamaño promedio 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, 9.0, 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, 15.0, 15.25, 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, o

20.0 kb. En algunos casos, el ADN celular se corta a un tamaño promedio de aproximadamente 1.5 kb.

En algunas modalidades, la eficacia de un ARN de guía se mide mediante la secreción de la TTR. En algunas modalidades, la secreción de la TTR se mide mediante el uso de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con medios de cultivo celular o suero. En algunas modalidades, la secreción de la TTR se mide en los mismos sistemas o modelos *in vitro* o *in vivo* usados para medir la edición. En algunas modalidades, la secreción de la TTR se mide en los hepatocitos primarios humanos. En algunas modalidades, la secreción de la TTR se mide en las células HUH7. En algunas modalidades, la secreción de la TTR se mide en las células HepG2.

Los ensayos ELISA son generalmente conocidos por el experto en la técnica y pueden diseñarse para determinar los niveles de la TTR en suero. En una modalidad ejemplar, se recoge sangre y se separa el suero. Los niveles séricos totales de la TTR pueden determinarse mediante el uso de un kit Mouse Prealbumin (Transthyretin) ELISA (Aviva Systems Biology, Cat. OKIA00111) o un kit similar para medir la TTR humana. Si no hay un kit disponible, puede desarrollarse un ELISA mediante el uso de placas que se recubren previamente con un anticuerpo de captura específico para la TTR a medir. La placa se incuba luego a temperatura ambiente durante un período de tiempo antes del lavado. El conjugado anticuerpo anti-TTR-enzima se añade y se incuba. El conjugado de anticuerpo no unido se elimina y la placa se lava antes de la adición de la solución de sustrato cromogénico que reacciona con la enzima. La placa se lee en un lector de placas apropiado con una absorbancia específica para la enzima y el sustrato usados.

En algunas modalidades, la cantidad de la TTR en las células (incluidas las del tejido) mide la eficacia de un ARNg. En algunas modalidades, la cantidad de la TTR en las células se mide mediante el uso de la electrotransferencia. En algunas modalidades, la célula usada es la célula HUH7. En algunas modalidades, la célula usada es un hepatocito primario humano. En algunas modalidades, la célula usada es una célula primaria obtenida de un animal. En algunas modalidades, la cantidad de la TTR se compara con la cantidad de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa GAPDH (un gen de mantenimiento) para controlar los cambios en el número de células.

III. Formulaciones de LNP y tratamiento de la ATTR

En algunas modalidades, se proporciona un método para inducir una ruptura bicatenaria (DSB) dentro del gen *TTR*, que comprende administrar una composición que comprende un ARN de guía que comprende cualquiera o más de las secuencias de guía de las SEQ ID Nos: 5-82, o cualquiera o

más de los ARNsg de las SEQ ID Nos: 87-124. En algunas modalidades, los ARNg que comprenden cualquiera o más de las secuencias de guía de las SEQ ID NO: 5-82 se administran para inducir una DSB en el gen *TTR*. Los ARN de guía pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9), o un ARNm o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

En algunas modalidades, se proporciona un método para modificar el gen *TTR* que comprende administrar una composición que comprende un ARN de guía que comprende cualquiera o más de las secuencias de guía de las SEQ ID Nos: 5-82, o cualquiera o más de los ARNsg de las SEQ ID Nos: 87-124. En algunas modalidades, los ARNg que comprenden cualquiera o más de las secuencias de guía de las SEQ ID NO: 5-82, o cualquiera o más de los ARNsg de las SEQ ID Nos: 87-124, se administran para modificar el gen *TTR*. Los ARN de guía pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9), o un ARNm o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

En algunas modalidades, se proporciona un método para tratar la ATTR que comprende administrar una composición que comprende un ARN de guía que comprende cualquiera o más de las secuencias de guía de las SEQ ID NO: 5-82, o cualquiera o más de los ARNsg de las SEQ ID Nos: 87-124. En algunas modalidades, los ARNg que comprenden cualquiera o más de las secuencias de guía de las SEQ ID NO: 5-82, o cualquiera o más de los ARNsg de las SEQ ID Nos: 87-124 se administran para tratar la ATTR. Los ARN de guía pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9), o un ARNm o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

En algunas modalidades, se proporciona un método para reducir la concentración sérica de la TTR que comprende administrar un ARN de guía que comprende cualquiera o más de las secuencias de guía de las SEQ ID NO: 5-82, o cualquiera o más de los ARNsg de las SEQ ID Nos: 87-124. En algunas modalidades, los ARNg que comprenden cualquiera o más de las secuencias de guía de las SEQ ID NO: 5-82 o cualquiera o más de los ARNsg de las SEQ ID Nos: 87-124 se administran para reducir o prevenir la acumulación de la TTR en los amiloides o las fibrillas amiloides. Los ARNg pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una

nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9), o un ARNm o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

En algunas modalidades, se proporciona un método para reducir o prevenir la acumulación de la TTR en los amiloides o las fibrillas amiloides de un sujeto, que comprende administrar una composición que comprende un ARN de guía que comprende cualquiera o más de las secuencias de guía de las SEQ ID NO: 5-82, o cualquiera o más de los ARNsg de las SEQ ID Nos: 87-124. En algunas modalidades, se proporciona un método para reducir o prevenir la acumulación de la TTR en los amiloides o las fibrillas amiloides de un sujeto, que comprende administrar una composición que comprende cualquiera o más de los ARNsg de las SEQ ID Nos: 87-113. En algunas modalidades, los ARNg que comprenden cualquiera o más de las secuencias de guía de las SEQ ID NO: 5-82 o cualquiera o más de los ARNsg de las SEQ ID Nos: 87-124 se administran para reducir o prevenir la acumulación de la TTR en los amiloides o las fibrillas amiloides. Los ARNg pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9), o un ARNm o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

En algunas modalidades, los ARNg que comprenden las secuencias de guía de la Tabla 1 o uno o más ARNsg de la Tabla 2, junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas, inducen DSBs, y la unión de extremos no homólogos (NHEJ) durante la reparación conduce a una mutación en el gen *TTR*. En algunas modalidades, la NHEJ conduce a una deleción o inserción de uno o más nucleótidos, lo que induce un cambio de marco o una mutación sin sentido en el gen *TTR*.

En algunas modalidades, la administración de los ARN de guía de la invención (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente descripción) reduce los niveles (por ejemplo, niveles séricos) de la TTR en el sujeto y, por lo tanto, evita la acumulación y la agregación de la TTR en los amiloides o las fibrillas amiloides.

En algunas modalidades, reducir o prevenir la acumulación de la TTR en los amiloides o las fibrillas amiloides de un sujeto comprende reducir o prevenir el depósito de la TTR en uno o más tejidos del sujeto, tales como estómago, colon o tejido nervioso. En algunas modalidades, el tejido nervioso comprende el nervio ciático o el ganglio de la raíz dorsal. En algunas modalidades, el depósito de la TTR se reduce en dos, tres o cuatro del estómago, el colon, el ganglio de la raíz dorsal y el nervio ciático. El nivel de depósito en un tejido dado puede determinarse mediante el uso de una muestra de biopsia, por ejemplo, mediante el uso de la inmunotinción. En algunas

modalidades, reducir o prevenir la acumulación de la TTR en los amiloides o las fibrillas amiloides de un sujeto y/o reducir o prevenir el depósito de la TTR se deduce en base a la reducción de los niveles de la TTR en suero durante un período de tiempo. Como se discutió en los ejemplos, se ha encontrado que la reducción de los niveles de la TTR en suero de acuerdo con los métodos y los usos proporcionados en la presente descripción puede dar como resultado el aclaramiento de la TTR depositada de los tejidos como los discutidos anteriormente y en los ejemplos, por ejemplo, medido 8 semanas después de la administración de la composición.

En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano. En algunas modalidades, el sujeto es vaca, cerdo, mono, oveja, perro, gato, pescado o aves de corral.

En algunas modalidades, se proporciona el uso de un ARN de guía que comprende cualquiera o más de las secuencias de guía en la Tabla 1 o uno o más ARNsg de la Tabla 2 (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente descripción) para la preparación de un medicamento para tratar un sujeto humano que tiene la ATTR.

En algunas modalidades, los ARN de guía, las composiciones y las formulaciones se administran por vía intravenosa. En algunas modalidades, los ARN de guía, las composiciones y las formulaciones se administran en la circulación hepática.

En algunas modalidades, una administración única de una composición que comprende un ARN de guía proporcionado en la presente descripción es suficiente para disminuir la expresión de la proteína mutante. En algunas modalidades, una administración única de una composición que comprende un ARN de guía proporcionado en la presente descripción es suficiente para inactivar la expresión de la proteína mutante en una población de células. En otras modalidades, más de una administración de una composición que comprende un ARN de guía proporcionado en la presente descripción puede ser beneficiosa para maximizar la edición mediante efectos acumulativos. Por ejemplo, una composición proporcionada en la presente descripción puede administrarse 2, 3, 4, 5 o más veces, tal como 2 veces. Las administraciones pueden separarse por un período de tiempo que varía, por ejemplo, de 1 día a 2 años, tales como de 1 a 7 días, de 7 a 14 días, de 14 días a 30 días, de 30 días a 60 días, de 60 días a 120 días, de 120 días a 183 días, de 183 días a 274 días, de 274 días a 366 días, o de 366 días a 2 años.

En algunas modalidades, una composición se administra en una cantidad efectiva en el intervalo de 0.01 a 10 mg/kg (mpk), por ejemplo, de 0.01 a 0.1 mpk, de 0.1 a 0.3 mpk, de 0.3 a 0.5 mpk, de 0.5

a 1 mpk, de 1 a 2 mpk, de 2 a 3 mpk, de 3 a 5 mpk, de 5 a 10 mpk, o 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 5 o 10 mpk.

En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento con las composiciones de la invención se observa al 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años o 10 años después del suministro. En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento con las composiciones de la invención se evalúa midiendo los niveles séricos de la TTR antes y después del tratamiento. En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento con las composiciones evaluadas mediante una reducción de los niveles séricos de la TTR se observa a la 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 o a los 11 meses.

En algunas modalidades, el tratamiento ralentiza o detiene la progresión de la enfermedad.

En algunas modalidades, el tratamiento ralentiza o detiene la progresión de la FAP. En algunas modalidades, el tratamiento da como resultado una mejora, estabilización o ralentización de la evolución en los síntomas de la neuropatía sensitivomotora o la neuropatía autonómica.

En algunas modalidades, el tratamiento da como resultado la mejora, la estabilización o la ralentización de la evolución en los síntomas de la FAC. En algunas modalidades, el tratamiento da como resultado la mejora, la estabilización o la ralentización de los síntomas de la evolución de la miocardiopatía restrictiva o la insuficiencia cardíaca congestiva.

En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento se mide por el aumento del tiempo de supervivencia del sujeto.

En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento se mide mediante la mejora o la ralentización de la progresión en los síntomas de la neuropatía sensitivomotora o autonómica. En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento se mide por un aumento o una ralentización de la disminución de la capacidad para mover un área del cuerpo o para sentir en cualquier área del cuerpo. En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento se mide por la mejora o una ralentización de la disminución en la capacidad de tragar; respirar; usar brazos, manos, piernas o pies; o caminar. En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento se mide por la mejora o la ralentización de la progresión de la neuralgia. En algunas modalidades, la neuralgia se caracteriza por dolor, ardor, hormigueo o sensación anormal. En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento se mide por la mejora o la ralentización del aumento en la hipotensión postural, mareos, dismotilidad gastrointestinal, disfunción de la vejiga o disfunción sexual. En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento se mide por la mejora o la ralentización de la progresión

de la debilidad. En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento se mide mediante el uso de electromiograma, pruebas de conducción nerviosa o resultados informados por el paciente.

En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento se mide mediante la mejora o la ralentización de la progresión de los síntomas de la insuficiencia cardíaca congestiva o la CHF. En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento se mide por una disminución o una ralentización del aumento de la respiración entrecortada, dificultad para respirar, fatiga o hinchazón en los tobillos, pies, piernas, abdomen o venas del cuello. En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento se mide por la mejora o la ralentización de la progresión de la acumulación de líquido en el cuerpo, que puede evaluarse mediante medidas tales como aumento de peso, micción frecuente o tos nocturna. En algunas modalidades, la eficacia del tratamiento se mide mediante el uso de pruebas de biomarcadores cardíacos (como el péptido natriurético tipo B [BNP] o el N-terminal del pro-péptido natriurético tipo b [NT-proBNP]), pruebas de función pulmonar, radiografías de tórax, o electrocardiografía.

A. Terapia de Combinación

En algunas modalidades, la invención comprende terapias de combinación que comprenden cualquiera de los ARNg que comprenden una o más de las secuencias de guía descritas en la Tabla 1 o cualquiera o más de los ARNsg en la Tabla 2 (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente descripción) junto con una terapia adicional adecuada para aliviar los síntomas de la ATTR.

En algunas modalidades, la terapia adicional para la ATTR es un tratamiento para la neuropatía sensitivomotora o autonómica. En algunas modalidades, el tratamiento para la neuropatía sensitivomotora o autonómica es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, antidepresivo, anticonvulsivo, antiarrítmico o narcótico. En algunas modalidades, el antidepresivo es un agente tricílico o un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina. En algunas modalidades, el antidepresivo es amitriptilina, duloxetina o venlafaxina. En algunas modalidades, el agente anticonvulsivo es gabapentina, pregabalina, topiramato o carbamazepina. En algunas modalidades, la terapia adicional para la neuropatía sensitivomotora es la estimulación nerviosa eléctrica transcutánea.

En algunas modalidades, la terapia adicional para la ATTR es un tratamiento para la miocardiopatía restrictiva o la insuficiencia cardíaca congestiva (CHF). En algunas modalidades, el tratamiento para la CHF es un inhibidor de la ACE, antagonista de la aldosterona, bloqueador del receptor de angiotensina, beta bloqueador, digoxina, diurético o dinitrato de isosorbida/clorhidrato

de hidralazina. En algunas modalidades, el inhibidor de la ACE es enalapril, captopril, ramipril, perindopril, imidapril o quinapril. En algunas modalidades, el antagonista de la aldosterona es eplerenona o espironolactona. En algunas modalidades, el bloqueador del receptor de angiotensina es azilsartán, cadesartán, eprosartán, irbesartán, losartán, olmesartán, telmisartán o valsartán. En algunas modalidades, el beta bloqueador es acebutolol, atenolol, bisoprolol, metoprolol, nadolol, nebivolol o propranolol. En algunas modalidades, el diurético es clorotiazida, clortalidona, hidroclorotiazida, indapamida, metolazona, bumetanida, furosemida, torsemida, amilorida o triametereno.

En algunas modalidades, la terapia de combinación comprende cualquiera de los ARNg que comprenden una o más de las secuencias de guía descritas en la Tabla 1 o cualquiera o más de los ARNsg en la Tabla 2 (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente descripción) junto con un ARNip que se dirige a TTR o TTR mutante. En algunas modalidades, el ARNip es cualquier ARNip capaz de reducir o eliminar adicionalmente la expresión de TTR de tipo salvaje o mutante. En algunas modalidades, el ARNip es el fármaco Patisiran (ALN-TTR02) o ALN-TTRsc02. En algunas modalidades, el ARNip se administra después de cualquiera de los ARNg que comprenden cualquiera o más de las secuencias de guía descritas en la Tabla 1 o cualquiera o más de los ARNsg en la Tabla 2 (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente descripción). En algunas modalidades, el ARNip se administra de forma regular después del tratamiento con cualquiera de las composiciones de ARNg proporcionadas en la presente descripción.

En algunas modalidades, la terapia de combinación comprende cualquiera de los ARNg que comprende cualquiera o más de las secuencias de guía descritas en la Tabla 1 o cualquiera o más de los ARNsg en la Tabla 2 (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente descripción) junto con nucleótido antisentido que se dirige a TTR o TTR mutante. En algunas modalidades, el nucleótido antisentido es cualquier nucleótido antisentido capaz de reducir o eliminar adicionalmente la expresión de TTR de tipo salvaje o mutante. En algunas modalidades, el nucleótido antisentido es el fármaco Inotersen (IONS-TTR_{Rx}). En algunas modalidades, el nucleótido antisentido se administra después de cualquiera de los ARNg que comprenden una o más de las secuencias de guía descritas en la Tabla 1 o cualquiera o más de los ARNsg en la Tabla 2 (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente descripción). En algunas modalidades, el nucleótido antisentido se administra de forma regular después del tratamiento con cualquiera de las composiciones de ARNg proporcionadas en la presente descripción.

En algunas modalidades, la terapia de combinación comprende cualquiera de los ARNg que comprenden cualquiera o más de las secuencias de guía descritas en la Tabla 1 o cualquiera o más de los ARNsg en la Tabla 2 (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente descripción) junto con una molécula pequeña estabilizadora que promueve la estabilización cinética de la forma tetramérica correctamente plegada de la TTR. En algunas modalidades, la molécula pequeña estabilizadora es el fármaco tafamidis (Vyndaqel®) o diflunisal. En algunas modalidades, la molécula pequeña estabilizadora se administra después de cualquiera de los ARNg que comprenden una o más de las secuencias de guía descritas en la Tabla 1 o cualquiera o más de los ARNsg en la Tabla 2 (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente descripción). En algunas modalidades, la molécula pequeña estabilizadora se administra de forma regular después del tratamiento con cualquiera de las composiciones de ARNg proporcionadas en la presente descripción.

B. Suministro de las composiciones de ARNg

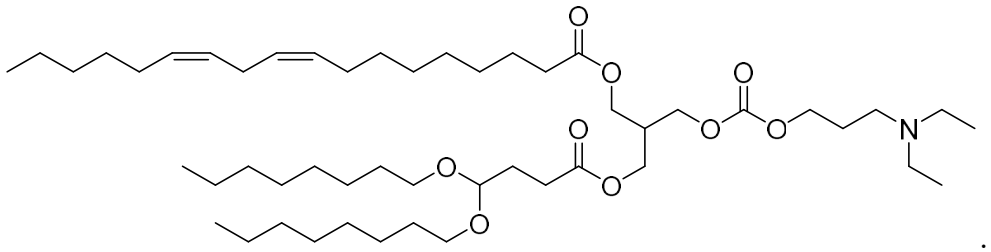
En algunas modalidades, las composiciones de ARN de guía descritas en la presente descripción, solas o codificadas en uno o más vectores, se formulan o administran a través de una nanopartícula lipídica; véase, por ejemplo, el documento PCT/US2017/024973, presentado el 30 de marzo de 2017 titulado "LIPID NANOPARTICLE FORMULATIONS FOR CRISPR/CAS COMPONENTS", cuyo contenido se incorpora por referencia en su totalidad. Cualquier nanopartícula lipídica (LNP) conocida por los expertos en la técnica que sea capaz de suministrar los nucleótidos a los sujetos puede usarse con los ARN de guía descritos en la presente descripción, así como también con el ARNm que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, tales como Cas o Cas9, o una nucleasa de ADN guiada por ARN, tales como la propia proteína Cas o Cas9.

En la presente descripción se describen diversas modalidades de las formulaciones de LNP para los ARN, que incluyen cargas de CRISPR/Cas. Dichas formulaciones de LNP pueden incluir (i) un lípido CCD, tal como un lípido de amina, (ii) un lípido neutro, (iii) un lípido auxiliar y (iv) un lípido furtivo, tal como un lípido de PEG. Algunas modalidades de las formulaciones de LNP incluyen un "lípido de amina", junto con un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido furtivo tal como un lípido de PEG. Por "nanopartícula lipídica" se entiende una partícula que comprende una pluralidad de (es decir, más de una) moléculas lipídicas físicamente asociadas entre sí por fuerzas intermoleculares.

Lípidos CCD

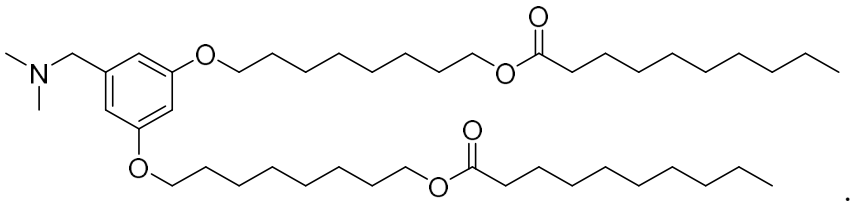
Las composiciones lipídicas para el suministro del ARNm de CRISPR/Cas y los componentes del ARN de guía a una célula hepática comprenden un lípido CCD.

En algunas modalidades, el lípido CCD es el lípido A, que es (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato, también llamado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato. El lípido A puede representarse como:



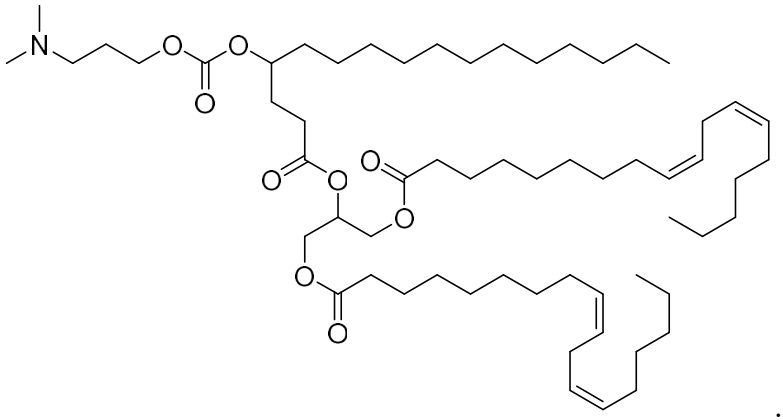
El lípido A puede sintetizarse de acuerdo con el documento WO2015/095340 (por ejemplo, páginas 84-86).

En algunas modalidades, el lípido CCD es el lípido B, que es ((5-((dimetilamino)metil)-1,3-fenileno)bis(oxi))bis(octano-8,1-diil)bis(decanoato), también llamado ((5-((dimetilamino)metil)-1,3-fenileno)bis(oxi))bis(octano-8,1-diil) bis(decanoato). El lípido B puede representarse como:



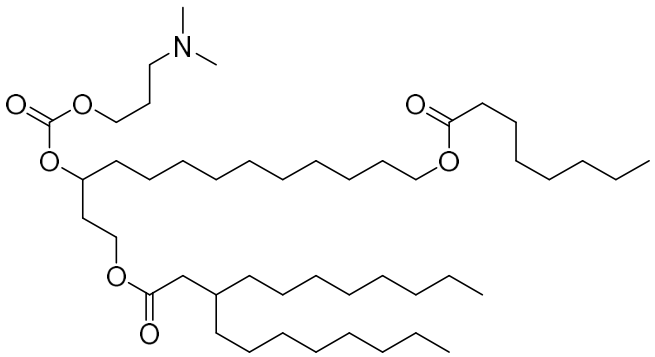
El lípido B puede sintetizarse de acuerdo con el documento WO2014/136086 (por ejemplo, páginas 107-09).

En algunas modalidades, el lípido CCD es el lípido C, que es 2-((4-((((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)hexadecanoil)oxi)propano-1,3-diil (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-bis (octadeca-9,12-dienoato). El lípido C puede representarse como:



En algunas modalidades, el lípido CCD es el lípido D, que es 3-((((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)-13-(octanoiloxi)tridecil 3-octilundecanoato.

El lípido D puede representarse como:



El lípido C y el lípido D pueden sintetizarse de acuerdo con el documento WO2015/095340.

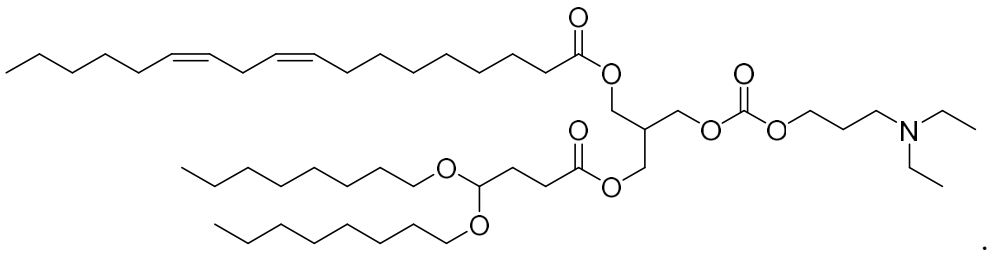
El lípido CCD también puede ser equivalente al lípido A, lípido B, lípido C o lípido D. En ciertas modalidades, el lípido CCD es un equivalente al lípido A, un equivalente al lípido B, un equivalente al lípido C, o un equivalente al lípido D.

Lípidos de amina

En algunas modalidades, las composiciones de LNP para el suministro de los agentes biológicamente activos comprenden un "lípido de amina", que se define como el lípido A, el lípido B, el lípido C, el lípido D o los equivalentes del lípido A (incluidos los análogos acetal del lípido A), los equivalentes del lípido B, los equivalentes del lípido C y los equivalentes del lípido D.

En algunas modalidades, el lípido de amina es el lípido A, que es (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-

dienoato, también llamado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato. El lípido A puede representarse como:



El lípido A puede sintetizarse de acuerdo con el documento WO2015/095340 (por ejemplo, páginas 84-86). En ciertas modalidades, el lípido de amina es un equivalente al lípido A.

En ciertas modalidades, un lípido de amina es un análogo del lípido A. En ciertas modalidades, un análogo del lípido A es un análogo acetal del lípido A. En composiciones de LNP particulares, el análogo acetal es un análogo acetal C4-C12. En algunas modalidades, el análogo acetal es un análogo acetal C5-C12. En modalidades adicionales, el análogo acetal es un análogo acetal C5-C10. En modalidades adicionales, el análogo acetal se elige entre un análogo acetal C4, C5, C6, C7, C9, C10, C11 y C12.

Los lípidos de amina adecuados para el uso en las LNPs descritas en la presente descripción son biodegradables in vivo. Los lípidos de amina tienen baja toxicidad (por ejemplo, se toleran en modelos animales sin efecto adverso en cantidades superiores o iguales a 10 mg/kg). En ciertas modalidades, las LNPs que comprenden un lípido de amina incluyen aquellas en las que al menos el 75 % del lípido de amina se elimina del plasma en 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7 o 10 días. En ciertas modalidades, las LNPs que comprenden un lípido de amina incluyen aquellos en los que al menos el 50 % del ARNm o el ARNg se elimina del plasma en 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7, o 10 días. En ciertas modalidades, las LNPs que comprenden un lípido de amina incluyen aquellas en las que al menos el 50 % de la LNP se elimina del plasma en 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7 o 10 días, por ejemplo mediante la medición de un lípido (por ejemplo, un lípido de amina), el ARN (por ejemplo, ARNm) u otro componente. En ciertas modalidades, se mide el componente ácido nucleico, ARN, lípido libre frente a encapsulados por lípidos de la LNP. El aclaramiento de los lípidos puede medirse como se describe en la literatura. Véase Maier, M.A., y otros, Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic

Delivery of RNAi Therapeutics. Mol. Ther. 2013, 21(8), 1570-78 ("Maier"). Por ejemplo, en Maier, los sistemas LNP-ARNip que contienen el ARNip dirigido-luciferasas se administraron a ratones C57Bl/6 machos de seis a ocho semanas de edad a 0.3 mg/kg mediante inyección intravenosa en bolo a través de la vena lateral de la cola. Se recogieron muestras de sangre, hígado y bazo a las 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 y 168 horas después de la dosis. Los ratones se perfundieron con solución salina antes de la recolección del tejido y las muestras de sangre se procesaron para obtener el plasma. Todas las muestras se procesaron y se analizaron por LC-MS. Además, Maier describe un procedimiento para evaluar la toxicidad después de la administración de las formulaciones de LNP-ARNip. Por ejemplo, se administró un ARNip dirigido-luciferasa a 0, 1, 3, 5 y 10 mg/kg (5 animales/grupo) mediante inyección intravenosa única en bolo con un volumen de dosis de 5 ml/kg a ratas machos Sprague-Dawley. Después de 24 horas, se obtuvo aproximadamente 1 ml de sangre de la vena yugular de los animales conscientes y se aisló el suero. A las 72 horas después de la dosis, todos los animales se sacrificaron por necropsia. Se realizó una evaluación de los signos clínicos, el peso corporal, la química del suero, el peso de los órganos y la histopatología. Aunque Maier describe los métodos para evaluar las formulaciones de LNP-ARNip, estos métodos pueden aplicarse para evaluar el aclaramiento, la farmacocinética y la toxicidad de la administración de las composiciones de LNP de la presente descripción.

Los lípidos de amina conducen a una mayor velocidad de aclaramiento. En algunas modalidades, la velocidad de aclaramiento es una velocidad de aclaramiento de lípidos, por ejemplo, la velocidad a la que se elimina un lípido de amina de la sangre, suero o plasma. En algunas modalidades, la velocidad de aclaramiento es una velocidad de aclaramiento del ARN, por ejemplo, la velocidad a la que un ARNm o un ARNg se eliminan de la sangre, suero o plasma. En algunas modalidades, la velocidad de aclaramiento es la velocidad a la que se elimina la LNP de la sangre, suero o plasma. En algunas modalidades, la velocidad de aclaramiento es la velocidad a la que se elimina la LNP de un tejido, tal como tejido de hígado o tejido de bazo. En ciertas modalidades, una alta velocidad de aclaramiento conduce a un perfil de seguridad sin efectos adversos sustanciales. Los lípidos de amina reducen la acumulación de la LNP en la circulación y en los tejidos. En algunas modalidades, una reducción en la acumulación de la LNP en la circulación y en los tejidos conduce a un perfil de seguridad sin efectos adversos sustanciales.

Los lípidos de amina de la presente descripción pueden ser ionizables dependiendo del pH del medio en el que se encuentran. Por ejemplo, en un medio ligeramente ácido, los lípidos de amina

pueden protonarse y, por lo tanto, tener una carga positiva. Por el contrario, en un medio ligeramente básico, como, por ejemplo, la sangre donde el pH es aproximadamente 7.35, los lípidos de amina pueden no protonarse y, por lo tanto, no tienen carga. En algunas modalidades, los lípidos de amina de la presente descripción pueden protonarse a un pH de al menos aproximadamente 9. En algunas modalidades, los lípidos de amina de la presente descripción pueden protonarse a un pH de al menos aproximadamente 9. En algunas modalidades, los lípidos de amina de la presente descripción pueden protonarse a un pH de al menos aproximadamente 10.

La capacidad de un lípido de amina para soportar una carga se relaciona con su pKa intrínseco. Por ejemplo, los lípidos de amina de la presente descripción pueden tener cada uno, independientemente, un pKa en el intervalo de aproximadamente 5.8 a aproximadamente 6.2. Por ejemplo, los lípidos de amina de la presente descripción pueden tener cada uno, independientemente, un pKa en el intervalo de aproximadamente 5.8 a aproximadamente 6.5. Esto puede ser ventajoso ya que se ha encontrado que los lípidos catiónicos, con un pKa que varía de aproximadamente 5.1 a aproximadamente 7.4, son efectivos para el suministro de la carga in vivo, por ejemplo, al hígado. Además, se ha encontrado que los lípidos catiónicos, con un pKa que varía de aproximadamente 5.3 a aproximadamente 6.4, son efectivos para el suministro in vivo, por ejemplo, a tumores. Véase, por ejemplo, el documento WO2014/136086.

Lípidos adicionales

Los “lípidos neutros” adecuados para el uso en una composición lipídica de la descripción incluyen, por ejemplo, una variedad de lípidos neutros, no cargados o zwitteriónicos. Los ejemplos de los fosfolípidos neutros adecuados para el uso en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, 5-heptadecilbenceno-1,3-diol (resorcinol), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfocolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), fosfatidilcolina (PLPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), dilauriloilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 1-miristoil-2-palmitoil fosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitoil-2-miristoil fosfatidilcolina (PMPC), 1-palmitoil-2-estearoil fosfatidilcolina (PSPC), 1,2-diaraquidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DBPC), 1-estearoil-2-palmitoil fosfatidilcolina (SPPC), 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC), palmitoiloleoil fosfatidilcolina (POPC), lisofosfatidil colina, dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), dilinoleoilfosfatidilcolina diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE),

palmitoiloleoil fosfatidiletanolamina (POPE), lisofosfatidiletanolamina y las combinaciones de estos. En una modalidad, el fosfolípido neutro puede seleccionarse del grupo que consiste en diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) y dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPE). En otra modalidad, el fosfolípido neutro puede ser diestearoilfosfatidilcolina (DSPC).

Los "lípidos auxiliares" incluyen esteroides, esteroles y resorcinoles de alquilo. Los lípidos auxiliares adecuados para el uso en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, colesterol, 5-heptadecilresorcinol y hemisuccinato de colesterol. En una modalidad, el lípido auxiliar puede ser colesterol. En una modalidad, el lípido auxiliar puede ser hemisuccinato de colesterol.

Los "lípidos furtivos" son lípidos que alteran el período de tiempo en que las nanopartículas pueden existir in vivo (por ejemplo, en la sangre). Los lípidos furtivos pueden ayudar en el proceso de formulación, por ejemplo, reduciendo la agregación de las partículas y controlando el tamaño de las partículas. Los lípidos furtivos usados en la presente descripción pueden modular las propiedades farmacocinéticas de la LNP. Los lípidos furtivos adecuados para el uso en una composición lipídica de la descripción incluyen, pero no se limitan a, lípidos furtivos que tienen un grupo de cabeza hidrófilo unido a un grupo lipídico. Los lípidos furtivos adecuados para el uso en una composición lipídica de la presente descripción y la información sobre la bioquímica de dichos lípidos pueden encontrarse en Romberg y otros, Pharmaceutical Research, Vol. 25, núm. 1, 2008, pg. 55-71 y Hoekstra y otros, Biochimica et Biophysica Acta 1660 (2004) 41-52. Se describen lípidos de PEG adecuados adicionales, por ejemplo, en el documento WO 2006/007712.

En una modalidad, el grupo de cabeza hidrofílica del lípido furtivo comprende un grupo polimérico que se selecciona de los polímeros basados en PEG. Los lípidos furtivos pueden comprender un grupo lipídico. En algunas modalidades, el lípido furtivo es un lípido de PEG.

En una modalidad, un lípido furtivo comprende un grupo polimérico que se selecciona de los polímeros basados en PEG (a veces denominado poli(óxido de etileno)), poli(oxazolina), poli(alcohol vinílico), poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poliaminoácidos y poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida].

En una modalidad, el lípido de PEG comprende un grupo polimérico basado en PEG (a veces denominado poli(óxido de etileno)).

El lípido de PEG comprende además un grupo lipídico. En algunas modalidades, el grupo lipídico puede derivarse del diacilglicerol o la diacilglucamida, incluidos los que comprenden un grupo

dialquilglicerol o dialquilglucamida que tiene una longitud de cadena de alquilo que comprende independientemente de aproximadamente C4 a aproximadamente C40 átomos de carbono saturados o insaturados, en donde la cadena puede comprender uno o más grupos funcionales tales como, por ejemplo, una amida o un éster. En algunas modalidades, la longitud de la cadena de alquilo comprende aproximadamente C10 a C20. El grupo dialquilglicerol o dialquilglucamida puede comprender además uno o más grupos alquilo sustituidos. Las longitudes de la cadena pueden ser simétricas o asimétricas.

A menos que se indique lo contrario, el término "PEG", como se usa en la presente descripción, significa cualquier polietilenglicol u otro polímero de éter de polialquileno. En una modalidad, el PEG es un polímero lineal o ramificado opcionalmente sustituido de etilenglicol u óxido de etileno. En una modalidad, el PEG no se sustituye. En una modalidad, el PEG se sustituye, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, alcoxi, acilo, hidroxi o arilo. En una modalidad, el término incluye copolímeros de PEG tales como PEG-poliuretano o PEG-polipropileno (véase, por ejemplo, J. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992)); en otra modalidad, el término no incluye copolímeros de PEG. En una modalidad, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 130 a aproximadamente 50,000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 30,000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 20,000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 15,000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 10,000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 6,000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 5,000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 4,000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 3,000, en una submodalidad, de aproximadamente 300 a aproximadamente 3,000, en una submodalidad, de aproximadamente 1,000 a aproximadamente 3,000, y en una submodalidad, de aproximadamente 1,500 a aproximadamente 2,500.

En ciertas modalidades, el PEG (por ejemplo, conjugado con un grupo lipídico o lípido, tal como un lípido furtivo), es un "PEG-2K", también denominado "PEG 2000", que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2,000 Dalton. El PEG-2K se representa en la presente descripción por la siguiente fórmula (I), en donde n es 45, lo que significa que el grado promedio de polimerización en número comprende aproximadamente 45 subunidades. Sin embargo, pueden usarse otras modalidades de PEG conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, aquellas en

las que el grado promedio de polimerización en número comprende aproximadamente 23 subunidades (n=23), y/o 68 subunidades (n=68). En algunas modalidades, n puede variar de aproximadamente 30 a aproximadamente 60. En algunas modalidades, n puede variar de aproximadamente 35 a aproximadamente 55. En algunas modalidades, n puede variar de aproximadamente 40 a aproximadamente 50. En algunas modalidades, n puede variar de aproximadamente 42 a aproximadamente 48. En algunas modalidades, n puede ser 45. En algunas modalidades, R puede seleccionarse de H, alquilo sustituido y alquilo no sustituido. En algunas modalidades, R puede ser alquilo no sustituido. En algunas modalidades, R puede ser metilo.

En cualquiera de las modalidades descritas en la presente descripción, el lípido de PEG puede seleccionarse de PEG-dilauroilglicerol, PEG-dimiristoilglicerol (PEG-DMG) (catálogo # GM-020 de NOF, Tokio, Japón), PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-diestearoilglicerol (PEG-DSPE) (catálogo # DSPE-020CN, NOF, Tokio, Japón), PEG-dilaurilglucamida, PEG-dimiristilglucamida, PEG-dipalmitoilglucamida, y PEG-diestearoilglucamida, PEG-colesterol (1-[8'-(colest-5-en-3[beta]-oxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil-[omega]-metil-poli(etilenglicol), PEG-DMB (3,4-ditetradecoxilbencil-[omega]-metil-poli(etilenglicol)éter), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DMG) (cat. #880150P de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DSPE) (cat. #880120C de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA), 1,2-diestearoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol (PEG2k-DSG; GS-020, NOF Tokio, Japón), poli(etilenglicol)-2000-dimetacrilato (PEG2k-DMA), y 1,2-diestеariloxipropil-3-amina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DSA). En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-DMG. En algunas modalidades, el lípido de PEG puede ser PEG2k-DSG. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-DSPE. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-DMA. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C-DMA. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser el compuesto S027, descrito en el documento WO2016/010840 (párrafos [00240] a [00244]). En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-DSA. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C11. En algunas modalidades, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C14. En algunas modalidades, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C16. En algunas modalidades, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C18.

Formulaciones de LNP

La LNP puede contener (i) un lípido de amina para la encapsulación y el escape endosómico, (ii) un lípido neutro para la estabilización, (iii) un lípido auxiliar, también para la estabilización, y (iv) un lípido furtivo, tal como un lípido de PEG.

En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un componente de ARN que incluye uno o más de un agente de unión al ADN guiado por ARN, un ARNm de nucleasa Cas, un ARNm de nucleasa Cas de Clase 2, un ARNm de Cas9 y un ARNg. En algunas modalidades, una composición de LNP puede incluir una nucleasa Cas de clase 2 y un ARNg como componente de ARN. En ciertas modalidades, una composición de LNP puede comprender el componente de ARN, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido furtivo. En ciertas composiciones de LNP, el lípido auxiliar es el colesterol. En otras composiciones, el lípido neutro es DSPC. En modalidades adicionales, el lípido furtivo es PEG2k-DMG o PEG2k-C11. En ciertas modalidades, la composición de LNP comprende el lípido A o un equivalente del lípido A; un lípido auxiliar; un lípido neutro; un lípido furtivo; y un ARN de guía. En ciertas composiciones, el lípido de amina es el lípido A. En ciertas composiciones, el lípido de amina es el lípido A o un análogo acetal de este; el lípido auxiliar es el colesterol; el lípido neutro es DSPC; y el lípido furtivo es PEG2k-DMG.

En ciertas modalidades, las composiciones lipídicas se describen de acuerdo con las relaciones molares respectivas de los lípidos componentes en la formulación. Las modalidades de la presente descripción proporcionan las composiciones lipídicas descritas de acuerdo con las relaciones molares respectivas de los lípidos componentes en la formulación. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de aproximadamente 30 % molar a aproximadamente 60 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de aproximadamente 40 % molar a aproximadamente 60 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de aproximadamente 45 % molar a aproximadamente 60 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de aproximadamente 50 % molar a aproximadamente 60 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de aproximadamente 55 % molar a aproximadamente 60 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de aproximadamente 50 % molar a aproximadamente 55 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser aproximadamente el 50 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser aproximadamente el 55 % molar. En algunas modalidades, el % molar del lípido de amina del lote de la LNP será ±30 %, ±25 %, ±20 %, ±15 %, ±10 %, ±5 % o ±2.5 %

del % molar diana. En algunas modalidades, el % molar del lípido de amina del lote de la LNP será ±4 % molar, ±3 % molar, ± 2 % molar, ±1,5 % molar, ±1 % molar, ±0.5 % molar, o ±0.25 % molar del % molar diana. Todos los números de % molar se dan como una fracción del componente lipídico de las composiciones de LNP. En ciertas modalidades, la variabilidad entre los lotes de la LNP del % molar del lípido de amina será inferior al 15 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

En una modalidad, el % molar del lípido neutro puede ser de aproximadamente 5 % molar a aproximadamente 15 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro puede ser de aproximadamente 7 % molar a aproximadamente 12 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro puede ser aproximadamente el 9 % molar. En algunas modalidades, el % molar del lípido neutro del lote de la LNP será ±30 %, ±25 %, ±20 %, ±15 %, ±10 %, ±5 % o ±2.5 % molar del lípido neutro diana. En ciertas modalidades, la variabilidad entre los lotes de la LNP será inferior al 15 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar puede ser de aproximadamente 20 % molar a aproximadamente 60 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar puede ser de aproximadamente 25 % molar a aproximadamente 55 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar puede ser de aproximadamente 25 % molar a aproximadamente 50 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar puede ser de aproximadamente 25 % molar a aproximadamente 40 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar puede ser de aproximadamente 30 % molar a aproximadamente 50 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar puede ser de aproximadamente 30 % molar a aproximadamente 40 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar se ajusta en base a las concentraciones del lípido de amina, lípido neutro y lípido de PEG para llevar el componente lipídico a 100 % molar. En algunas modalidades, el % molar del lípido auxiliar del lote de la LNP será ±30 %, ±25 %, ±20 %, ±15 %, ±10 %, ±5 % o ±2.5 % del % molar diana. En ciertas modalidades, la variabilidad entre los lotes de la LNP será inferior al 15 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

En una modalidad, el % molar del lípido de PEG puede ser de aproximadamente 1 % molar a aproximadamente 10 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de PEG puede ser de aproximadamente 2 % molar a aproximadamente 10 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de PEG puede ser de aproximadamente 2 % molar a aproximadamente 8 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de PEG puede ser de aproximadamente 2 % molar a aproximadamente 4 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de PEG puede ser de

aproximadamente 2.5 % molar a aproximadamente 4 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de PEG puede ser de aproximadamente el 3 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de PEG puede ser aproximadamente el 2.5 % molar. En algunas modalidades, el % molar del lípido de PEG del lote de la LNP será ±30 %, ±25 %, ±20 %, ±15 %, ±10 %, ±5 % o ±2.5 % del % molar del lípido de PEG diana. En ciertas modalidades, la variabilidad entre los lotes de la LNP será inferior al 15 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

En ciertas modalidades, la carga incluye un ARNm que codifica un agente de unión al ADN guiado por ARN (por ejemplo, una nucleasa Cas, una nucleasa Cas de clase 2 o Cas9), y un ARNg o un ácido nucleico que codifica un ARNg, o una combinación de ARNm y ARNg. En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un lípido A o sus equivalentes. En algunos aspectos, el lípido de amina es el lípido A. En algunos aspectos, el lípido de amina es un equivalente del lípido A, por ejemplo, un análogo del lípido A. En ciertos aspectos, el lípido de amina es un análogo acetal del lípido A. En diversas modalidades, una composición de LNP comprende un lípido de amina, un lípido neutro, un lípido auxiliar y un lípido de PEG. En ciertas modalidades, el lípido auxiliar es el colesterol. En ciertas modalidades, el lípido neutro es DSPC. En modalidades específicas, el lípido de PEG es PEG2k-DMG. En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un lípido A, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En algunas modalidades, una composición de LNP comprende un lípido de amina, DSPC, colesterol y un lípido de PEG. En algunas modalidades, la composición de LNP comprende un lípido de PEG que comprende DMG. En ciertas modalidades, el lípido de amina se selecciona del lípido A, y un equivalente del lípido A, que incluye un análogo acetal del lípido A. En modalidades adicionales, una composición de LNP comprende lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG.

Las modalidades de la presente descripción también proporcionan composiciones lipídicas descritas de acuerdo con la relación molar entre los grupos amino cargados positivamente del lípido de amina (N) y los grupos fosfato cargados negativamente (P) del ácido nucleico a encapsular. Esto puede representarse matemáticamente por la ecuación N/P. En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un componente lipídico que comprende un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido auxiliar; y un componente de ácido nucleico, en donde la relación N/P es de aproximadamente 3 a 10. En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un componente lipídico que comprende un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido auxiliar; y un componente de ARN, en donde

la relación N/P es de aproximadamente 3 a 10. En una modalidad, la relación N/P puede ser de aproximadamente 5-7. En una modalidad, la relación N/P puede ser de aproximadamente 4.5-8. En una modalidad, la relación N/P puede ser de aproximadamente 6. En una modalidad, la relación N/P puede ser de aproximadamente 6 ±1. En una modalidad, la relación N/P puede ser de aproximadamente 6 ± 0.5. En algunas modalidades, la relación N/P será ±30 %, ±25 %, ±20 %, ±15 %, ±10 %, ±5 % o ±2.5 % de la relación N/P diana. En ciertas modalidades, la variabilidad entre los lotes de la LNP será inferior al 15 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

En algunas modalidades, el componente de ARN puede comprender un ARNm, tal como un ARNm descrito en la presente descripción, por ejemplo, que codifica una nucleasa Cas. En una modalidad, el componente de ARN puede comprender un ARNm de Cas9. En algunas composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas, la LNP comprende además un ácido nucleico de ARNg, tal como un ARNg. En algunas modalidades, el componente de ARN comprende un ARNm de nucleasa Cas y un ARNg. En algunas modalidades, el componente de ARN comprende un ARNm de nucleasa Cas de Clase 2 y un ARNg.

En ciertas modalidades, una composición de LNP puede comprender un ARNm descrito en la presente descripción, por ejemplo, que codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas de clase 2, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En ciertas composiciones de LNP que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas de Clase 2, el lípido auxiliar es el colesterol. En otras composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas de Clase 2, el lípido neutro es DSPC. En modalidades adicionales que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas de Clase 2, el lípido de PEG es PEG2k-DMG o PEG2k-C11. En composiciones específicas que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas de clase 2, el lípido de amina se selecciona del lípido A y sus equivalentes, tal como un análogo acetal del lípido A.

En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un ARNg. En ciertas modalidades, una composición de LNP puede comprender un lípido de amina, un ARNg, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En ciertas composiciones de LNP que comprenden un ARNg, el lípido auxiliar es el colesterol. En algunas composiciones que comprenden un ARNg, el lípido neutro es DSPC. En modalidades adicionales que comprenden un ARNg, el lípido de PEG

es PEG2k-DMG o PEG2k-C11. En ciertas modalidades, el lípido de amina se selecciona del lípido A y sus equivalentes, tal como un análogo acetal del lípido A.

En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un ARNsg. En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un ARNsg de Cas9. En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un ARNsg de Cpf1. En algunas composiciones que comprenden un ARNsg, la LNP incluye un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En ciertas composiciones que comprenden un ARNsg, el lípido auxiliar es el colesterol. En otras composiciones que comprenden un ARNsg, el lípido neutro es DSPC. En modalidades adicionales que comprenden un ARNsg, el lípido de PEG es PEG2k-DMG o PEG2k-C11. En ciertas modalidades, el lípido de amina se selecciona del lípido A y sus equivalentes, tales como los análogos acetal del lípido A.

En ciertas modalidades, una composición de LNP comprende un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg, que puede ser un ARNsg. En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un lípido de amina, un ARNm que codifica una nucleasa Cas, un ARNg, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En ciertas composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg, el lípido auxiliar es el colesterol. En algunas composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg, el lípido neutro es DSPC. En modalidades adicionales que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg, el lípido de PEG es PEG2k-DMG o PEG2k-C11. En ciertas modalidades, el lípido de amina se selecciona del lípido A y sus equivalentes, tales como los análogos acetal del lípido A.

En ciertas modalidades, las composiciones de LNP incluyen un ARNm de nucleasa Cas, tal como un ARNm de Cas de Clase 2, y al menos un ARNg. En ciertas modalidades, la composición de LNP incluye una relación de ARNg a ARNm de nucleasa Cas, tal como ARNm de nucleasa Cas de Clase 2, de aproximadamente 25:1 a aproximadamente 1:25. En ciertas modalidades, la formulación de LNP incluye una relación de ARNg a ARNm de nucleasa Cas, tal como ARNm de nucleasa Cas de Clase 2, de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10. En ciertas modalidades, la formulación de LNP incluye una relación de ARNg a ARNm de nucleasa Cas, tal como ARNm de nucleasa Cas de Clase 2, de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 1:8. Como se mide en la presente descripción, las relaciones son en peso. En algunas modalidades, la formulación de LNP incluye una relación de ARNg a ARNm de nucleasa Cas, tal como ARNm de

Cas de Clase 2, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5. En algunas modalidades, el intervalo de relación es de aproximadamente 3:1 a 1:3, de aproximadamente 2:1 a 1:2, de aproximadamente 5:1 a 1:2, de aproximadamente 5:1 a 1:1, de aproximadamente 3:1 a 1:2, de aproximadamente 3:1 a 1:1, de aproximadamente 3:1, de aproximadamente 2:1 a 1:1. En algunas modalidades, la relación de ARNg a ARNm es de aproximadamente 3:1 o de aproximadamente 2:1. En algunas modalidades, la relación de ARNg a ARNm de nucleasa Cas, tal como la nucleasa Cas de Clase 2, es de aproximadamente 1:1. La relación puede ser de aproximadamente 25:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:10 o 1:25.

Las composiciones de LNP descritas en la presente descripción pueden incluir un ácido nucleico molde. El ácido nucleico molde puede formularse conjuntamente con un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como un ARNm de nucleasa Cas de Clase 2. En algunas modalidades, el ácido nucleico molde puede formularse conjuntamente con un ARN de guía. En algunas modalidades, el ácido nucleico molde puede formularse conjuntamente con un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARN de guía. En algunas modalidades, el ácido nucleico molde puede formularse por separado de un ARNm que codifica una nucleasa Cas o un ARN de guía. El ácido nucleico molde puede suministrarse con, o por separado de, las composiciones de LNP. En algunas modalidades, el ácido nucleico molde puede ser monocatenario o bicatenario, dependiendo del mecanismo de reparación deseado. El molde puede tener regiones de homología con el ADN diana o con las secuencias adyacentes al ADN diana.

En algunas modalidades, las LNPs se forman al mezclar una solución acuosa de ARN con una solución lipídica a base de disolvente orgánico, por ejemplo, etanol al 100 %. Las soluciones o disolventes adecuados incluyen o pueden contener: agua, PBS, amortiguador Tris, NaCl, amortiguador citrato, etanol, cloroformo, éter dietílico, ciclohexano, tetrahidrofurano, metanol, isopropanol. Puede usarse un amortiguador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, para la administración in vivo de las LNPs. En ciertas modalidades, se usa un amortiguador para mantener el pH de la composición que comprende las LNPs a pH 6.5 o superior. En ciertas modalidades, se usa un amortiguador para mantener el pH de la composición que comprende las LNPs a pH 7.0 o superior. En ciertas modalidades, la composición tiene un pH que varía de aproximadamente 7.2 a aproximadamente 7.7. En modalidades adicionales, la composición tiene un pH que varía de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 7.7 o que varía de aproximadamente 7.4 a aproximadamente 7.6. En modalidades adicionales, la composición tiene un pH de

aproximadamente 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6 o 7.7. El pH de una composición puede medirse con una sonda de micro pH. En ciertas modalidades, se incluye un crioprotector en la composición. Los ejemplos no limitantes de crioprotectores incluyen sacarosa, trehalosa, glicerol, DMSO y etilenglicol. Las composiciones ejemplares pueden incluir hasta el 10 % de crioprotector, tal como, por ejemplo, sacarosa. En ciertas modalidades, la composición de LNP puede incluir aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de crioprotector. En ciertas modalidades, la composición de LNP puede incluir aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de sacarosa. En algunas modalidades, la composición de LNP puede incluir un amortiguador. En algunas modalidades, el amortiguador puede comprender un amortiguador fosfato (PBS), un amortiguador Tris, un amortiguador citrato y las mezclas de estos. En ciertas modalidades ejemplares, el amortiguador comprende NaCl. En ciertas modalidades, se omite el NaCl. Las cantidades ejemplares de NaCl pueden variar de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 45 mM. Las cantidades ejemplares de NaCl pueden variar de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 50 mM. En algunas modalidades, la cantidad de NaCl es de aproximadamente 45 mM. En algunas modalidades, el amortiguador es un amortiguador Tris. Las cantidades ejemplares de Tris pueden variar de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 60 mM. Las cantidades ejemplares de Tris pueden variar de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM. En algunas modalidades, la cantidad de Tris es de aproximadamente 50 mM. En algunas modalidades, el amortiguador comprende NaCl y Tris. Ciertas modalidades ejemplares de las composiciones de LNP contienen sacarosa al 5 % y NaCl 45 mM en amortiguador Tris. En otras modalidades ejemplares, las composiciones contienen sacarosa en una cantidad de aproximadamente 5 % p/v, aproximadamente NaCl 45 mM y Tris aproximadamente 50 mM a pH 7.5. Las cantidades de sal, amortiguador y crioprotector pueden variar de modo que se mantenga la osmolalidad de la formulación general. Por ejemplo, la osmolalidad final puede mantenerse a menos de 450 mOsm/l. En modalidades adicionales, la osmolalidad está entre 350 y 250 mOsm/l. Ciertas modalidades tienen una osmolalidad final de 300 +/- 20 mOsm/l.

En algunas modalidades, se usa mezcla microfluídica, mezcla en T o mezcla cruzada. En ciertos aspectos, los caudales, el tamaño de la unión, la geometría de la unión, la forma de la unión, el diámetro del tubo, las soluciones y/o las concentraciones del ARN y los lípidos pueden variar. Las composiciones de LNP o las LNPs pueden concentrarse o purificarse, por ejemplo, mediante diálisis, filtración de flujo tangencial o cromatografía. Las LNPs pueden almacenarse como una

suspensión, una emulsión o un polvo liofilizado, por ejemplo. En algunas modalidades, una composición de LNP se almacena a 2-8 °C, en ciertos aspectos, las composiciones de LNP se almacenan a temperatura ambiente. En modalidades adicionales, una composición de LNP se almacena congelada, por ejemplo a -20 °C o -80 °C. En otras modalidades, una composición de LNP se almacena a una temperatura que varía de aproximadamente 0 °C a aproximadamente -80 °C. Las composiciones de LNP congeladas pueden descongelarse antes de su uso, por ejemplo en hielo, a 4 °C, a temperatura ambiente o a 25 °C. Las composiciones de LNP congeladas pueden mantenerse a varias temperaturas, por ejemplo en hielo, a 4 °C, a temperatura ambiente, a 25 °C, o a 37 °C.

En algunas modalidades, una composición de LNP tiene más de aproximadamente 80 % de encapsulación. En algunas modalidades, una composición de LNP tiene un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 120 nm. En algunas modalidades, una composición de LNP tiene un pdi inferior a aproximadamente 0.2. En algunas modalidades, al menos dos de estas características están presentes. En algunas modalidades, cada una de estas tres características está presente. Los métodos analíticos para determinar estos parámetros se analizan a continuación en la sección de reactivos y métodos generales.

En algunas modalidades, se usa mezcla microfluídica, mezcla en T o mezcla cruzada. En ciertos aspectos, los caudales, el tamaño de la unión, la geometría de la unión, la forma de la unión, el diámetro del tubo, las soluciones y/o las concentraciones del ARN y los lípidos pueden variar. Las composiciones de LNP o LNPs pueden concentrarse o purificarse, por ejemplo, mediante diálisis o cromatografía. Las LNPs pueden almacenarse como una suspensión, una emulsión o un polvo liofilizado, por ejemplo. En algunas modalidades, las composiciones de LNP se almacenan a 2-8 °C, en ciertos aspectos, las composiciones de LNP se almacenan a temperatura ambiente. En modalidades adicionales, la composición de LNP se almacena congelada, por ejemplo a -20 °C o -80 °C. En otras modalidades, las composiciones de LNP se almacenan a una temperatura que varía de 0 °C a -80 °C. Las composiciones de LNP congeladas pueden descongelarse antes de usarse, por ejemplo en hielo, a temperatura ambiente o a 25 °C.

La dispersión dinámica de la luz (“DLS”) puede usarse para caracterizar el índice de polidispersidad (“pdi”) y el tamaño de las LNPs de la presente descripción. La DLS mide la dispersión de la luz que resulta de someter una muestra a una fuente de luz. El PDI, según lo determinado a partir de mediciones de la DLS, representa la distribución del tamaño de partícula

(alrededor del tamaño medio de partícula) en una población, con una población perfectamente uniforme que tiene un PDI de cero. En algunas modalidades, el pdi puede variar de 0.005 a 0.75. En algunas modalidades, el pdi puede variar de 0.01 a 0.5. En algunas modalidades, el pdi puede variar de 0.02 a 0.4. En algunas modalidades, el pdi puede variar de 0.03 a 0.35. En algunas modalidades, el pdi puede variar de 0.1 a 0.35.

En algunas modalidades, las LNPs descritas en la presente descripción tienen un tamaño de 1 a 250 nm. En algunas modalidades, las LNPs tienen un tamaño de 10 a 200 nm. En modalidades adicionales, las LNPs tienen un tamaño de 20 a 150 nm. En algunas modalidades, las LNPs tienen un tamaño de 50 a 150 nm. En algunas modalidades, las LNPs tienen un tamaño de 50 a 100 nm. En algunas modalidades, las LNPs tienen un tamaño de 50 a 120 nm. En algunas modalidades, las LNPs tienen un tamaño de 75 a 150 nm. En algunas modalidades, las LNPs tienen un tamaño de 30 a 200 nm. A menos que se indique lo contrario, todos los tamaños a los que se hace referencia en la presente descripción son los tamaños promedio (diámetros) de las nanopartículas completamente formadas, medidas por dispersión dinámica de la luz en un Malvern Zetasizer. La muestra de las nanopartículas se diluye en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) para que la tasa de recuento sea de aproximadamente 200-400 kcts. Los datos se presentan como un promedio ponderado de la medida de la intensidad. En algunas modalidades, las LNPs se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que varía del 50 % al 100 %. En algunas modalidades, las LNPs se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que varía del 50 % al 70 %. En algunas modalidades, las LNPs se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que varía del 70 % al 90 %. En algunas modalidades, las LNPs se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que varía del 90 % al 100 %. En algunas modalidades, las LNPs se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que varía del 75 % al 95 %.

En algunas modalidades, las LNPs asociadas con los ARNg descritos en la presente descripción son para el uso en la preparación de un medicamento para tratar la ATTR. En algunas modalidades, las LNPs asociadas con los ARNg descritos en la presente descripción son para el uso en la preparación de un medicamento para reducir o prevenir la acumulación y la agregación de la TTR en los amiloides o las fibrillas amiloides en sujetos que tienen la ATTR. En algunas modalidades, las LNPs asociadas con los ARNg descritos en la presente descripción son para el uso en la preparación de un medicamento para reducir la concentración de la TTR en suero. En algunas modalidades, las LNPs asociadas con los ARNg descritos en la presente descripción son

para el uso en el tratamiento de la ATTR en un sujeto, tal como un mamífero, por ejemplo, un primate como un humano. En algunas modalidades, las LNPs asociadas con los ARNg descritos en la presente descripción son para el uso en la reducción o la prevención de la acumulación y la agregación de la TTR en los amiloides o las fibrillas amiloides en sujetos que tienen la ATTR, tal como un mamífero, por ejemplo, un primate como un humano. En algunas modalidades, las LNPs asociadas con los ARNg descritos en la presente descripción son para el uso en la reducción de la concentración de la TTR en suero en un sujeto, tal como un mamífero, por ejemplo, un primate como un humano.

La electroporación también es un medio bien conocido para el suministro de carga, y puede usarse cualquier metodología de electroporación para la administración de cualquiera de los ARNg descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la electroporación se puede usar para suministrar cualquiera de los ARNg descritos en la presente descripción y una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como Cas9, o un ARNm que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como Cas9.

En algunas modalidades, la invención comprende un método para suministrar cualquiera de los ARNg descritos en la presente descripción a una célula ex vivo, en donde el ARNg se asocia con una LNP o no se asocia con una LNP. En algunas modalidades, el ARNg/LNP o ARNg también se asocia con una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como Cas9, o un ARNm que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como Cas9.

En ciertas modalidades, la invención comprende vectores de ADN o ARN que codifican cualquiera de los ARN de guía que comprenden cualquiera o más de las secuencias de guía descritas en la presente descripción. En algunas modalidades, además de las secuencias de ARN de guía, los vectores comprenden además ácidos nucleicos que no codifican los ARN de guía. Los ácidos nucleicos que no codifican los ARN de guía incluyen, pero no se limitan a, promotores, potenciadores, secuencias reguladoras y ácidos nucleicos que codifican una nucleasa de ADN guiada por ARN, que puede ser una nucleasa tal como Cas9. En algunas modalidades, el vector comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un ARNcr, un ARNtr o un ARNcr y ARNtr. En algunas modalidades, el vector comprende una o más secuencias de los nucleótidos que codifican un ARNsg y un ARNm que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, que puede ser una nucleasa Cas, tal como Cas9 o Cpf1. En algunas modalidades, el vector comprende una o más secuencias de los nucleótidos que codifican un ARNcr, un ARNtr y un ARNm que codifica

una nucleasa de ADN guiada por ARN, que puede ser una proteína Cas, tal como Cas9. En una modalidad, el Cas9 es de *Streptococcus pyogenes* (es decir, Cas9 Spy). En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica el ARNcr, ARNtr o ARNcr y ARNtr (que puede ser un ARNsg) comprende o consiste en una secuencia de guía flanqueada por toda, o una parte de, una secuencia repetida de un sistema CRISPR/Cas natural. El ácido nucleico que comprende o que consiste en el ARNcr, el ARNtr o el ARNcr y el ARNtr puede comprender además una secuencia de vectores en donde la secuencia del vector comprende o consiste en ácidos nucleicos que no se encuentran de forma natural junto con el ARNcr, el ARNtr o el ARNcr y el ARNtr.

En algunas modalidades, el ARNcr y el ARNtr se codifican por ácidos nucleicos no contiguos dentro de un vector. En otras modalidades, el ARNcr y el ARNtr pueden codificarse por un ácido nucleico contiguo. En algunas modalidades, el ARNcr y el ARNtr se codifican por cadenas opuestas de un solo ácido nucleico. En otras modalidades, el ARNcr y el ARNtr se codifican por la misma cadena de un único ácido nucleico.

En algunas modalidades, el vector puede ser circular. En otras modalidades, el vector puede ser lineal. En algunas modalidades, el vector puede estar encerrado en una nanopartícula lipídica, liposoma, nanopartícula no lipídica o cápside viral. Los vectores ejemplares no limitantes incluyen plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales, minicromosomas, transposones, vectores virales y vectores de expresión.

En algunas modalidades, el vector puede ser un vector viral. En algunas modalidades, el vector viral puede modificarse genéticamente a partir de su contraparte de tipo salvaje. Por ejemplo, el vector viral puede comprender una inserción, deleción o sustitución de uno o más nucleótidos para facilitar la clonación o tal que una o más propiedades del vector cambien. Dichas propiedades pueden incluir la capacidad de empaquetamiento, la eficiencia de transducción, la inmunogenicidad, la integración genómica, la replicación, la transcripción y la traducción. En algunas modalidades, una parte del genoma viral puede eliminarse de manera que el virus sea capaz de empaquetar las secuencias exógenas que tengan un tamaño mayor. En algunas modalidades, el vector viral puede tener una eficiencia de transducción mejorada. En algunas modalidades, la respuesta inmunitaria inducida por el virus en un huésped puede reducirse. En algunas modalidades, los genes virales (tales como, por ejemplo, integrasa) que promueven la integración de la secuencia viral en un genoma del huésped pueden mutar de modo que el virus se vuelva no integrante. En algunas modalidades, el vector viral puede tener una replicación

defectuosa. En algunas modalidades, el vector viral puede comprender secuencias de control transcripcionales o traduccionales exógenas para dirigir la expresión de las secuencias codificantes en el vector. En algunas modalidades, el virus puede ser dependiente de un auxiliar. Por ejemplo, el virus puede necesitar uno o más virus auxiliares para suministrar los componentes virales (como, por ejemplo, proteínas virales) necesarios para amplificar y empaquetar los vectores en las partículas virales. En tal caso, uno o más componentes auxiliares, que incluyen uno o más vectores que codifican los componentes virales, pueden introducirse en una célula huésped junto con el sistema de vectores descrito en la presente descripción. En otras modalidades, el virus puede estar libre de auxiliar. Por ejemplo, el virus puede ser capaz de amplificar y empaquetar los vectores sin ningún virus auxiliar. En algunas modalidades, el sistema de vectores descrito en la presente descripción también puede codificar los componentes virales necesarios para la amplificación y el empaquetamiento del virus.

Los vectores virales ejemplares no limitantes incluyen vectores de virus adenoasociados (AAV), vectores de lentivirus, vectores de adenovirus, vectores adenovirales dependientes de auxiliares (HDAd), vectores del virus del herpes simple (HSV-1), bacteriófago T4, vectores de baculovirus y vectores de retrovirus. En algunas modalidades, el vector viral puede ser un vector AAV. En algunas modalidades, el vector viral es AAV2, AAV3, AAV3B, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAVrh10, o AAVLK03. En otras modalidades, el vector viral puede ser un vector de lentivirus.

En algunas modalidades, el lentivirus puede no integrarse. En algunas modalidades, el vector viral es un vector de adenovirus. En algunas modalidades, el adenovirus puede ser un adenovirus de alta capacidad de clonación o "vacío", donde todas las regiones virales codificantes aparte de las repeticiones terminales invertidas (ITR) 5' y 3' y la señal de empaquetamiento ('I') se eliminan del virus para aumentar su capacidad de empaquetamiento. En otras modalidades más, el vector viral puede ser un vector HSV-1. En algunas modalidades, el vector basado en HSV-1 es dependiente del auxiliar, y en otras modalidades es independiente del auxiliar. Por ejemplo, un vector de amplicón que retiene solo la secuencia de empaquetamiento requiere un virus auxiliar con componentes estructurales para el empaquetamiento, mientras que un vector HSV-1 que tiene una deleción de 30 kb que elimina las funciones virales no esenciales no requiere virus auxiliar. En modalidades adicionales, el vector viral puede ser el bacteriófago T4. En algunas modalidades, el bacteriófago T4 puede ser capaz de empaquetar cualquier molécula de ADN o ARN lineal o

circular cuando se vacía la cabeza del virus. En modalidades adicionales, el vector viral puede ser un vector de baculovirus. En otras modalidades adicionales, el vector viral puede ser un vector de retrovirus. En modalidades que usan AAV o vectores lentivirales, que tienen una capacidad de clonación más pequeña, puede ser necesario usar más de un vector para suministrar todos los componentes de un sistema de vectores como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, un vector AAV puede contener secuencias que codifican una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas, mientras que un segundo vector AAV puede contener una o más secuencias de guía.

En algunas modalidades, el vector puede ser capaz de dirigir la expresión de una o más secuencias de codificación en una célula. En algunas modalidades, la célula puede ser una célula procariota, tal como, por ejemplo, una célula bacteriana. En algunas modalidades, la célula puede ser una célula eucariota, tal como, por ejemplo, una célula de levadura, planta, insecto o mamífero. En algunas modalidades, la célula eucariota puede ser una célula de mamífero. En algunas modalidades, la célula eucariota puede ser una célula de roedor. En algunas modalidades, la célula eucariota puede ser una célula humana. Los promotores adecuados para dirigir la expresión en diferentes tipos de células son conocidos en la técnica. En algunas modalidades, el promotor puede ser de tipo salvaje. En otras modalidades, el promotor puede modificarse para una expresión más eficiente o eficaz. En aún otras modalidades, el promotor puede truncarse pero conservar su función. Por ejemplo, el promotor puede tener un tamaño normal o un tamaño reducido que sea adecuado para el empaquetamiento adecuado del vector en un virus.

En algunas modalidades, el vector puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, la nucleasa codificada por el vector puede ser una proteína Cas. En algunas modalidades, el sistema de vector puede comprender una copia de la secuencia de nucleótidos que codifica la nucleasa. En otras modalidades, el sistema de vectores puede comprender más de una copia de la secuencia de nucleótidos que codifica la nucleasa. En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica la nucleasa puede unirse operativamente a al menos una secuencia de control transcripcional o traduccional. En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica la nucleasa puede unirse operativamente a al menos un promotor.

En algunas modalidades, el promotor puede ser constitutivo, inducible o específico de tejido. En algunas modalidades, el promotor puede ser un promotor constitutivo. Los promotores constitutivos ejemplares no limitantes incluyen el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), el promotor del virus de simio (SV40), el promotor tardío mayor de adenovirus (MLP), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), el promotor del factor de alargamiento alfa (EF1a), los promotores de ubiquitina, los promotores de actina, los promotores de tubulina, los promotores de inmunoglobulina, un fragmento funcional de estos, o una combinación de cualquiera de los anteriores. En algunas modalidades, el promotor puede ser un promotor de CMV. En algunas modalidades, el promotor puede ser un promotor de CMV truncado. En otras modalidades, el promotor puede ser un promotor de EF1a. En algunas modalidades, el promotor puede ser un promotor inducible. Los promotores inducibles ejemplares no limitantes incluyen aquellos inducibles por choque térmico, luz, productos químicos, péptidos, metales, esteroides, antibióticos o alcohol. En algunas modalidades, el promotor inducible puede ser uno que tenga un nivel de expresión basal (no inducido) bajo, tal como, por ejemplo, el promotor Tet-On® (Clontech).

En algunas modalidades, el promotor puede ser un promotor específico de tejido, por ejemplo, un promotor específico para la expresión en el hígado.

El vector puede comprender además una secuencia de nucleótidos que codifica el ARN de guía descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el vector comprende una copia del ARN de guía. En otras modalidades, el vector comprende más de una copia del ARN de guía. En modalidades con más de un ARN de guía, los ARN de guía pueden ser no idénticos de modo que se dirigen a diferentes secuencias diana, o pueden ser idénticos en el sentido de que se dirigen a la misma secuencia diana. En algunas modalidades donde los vectores comprenden más de un ARN de guía, cada ARN de guía puede tener otras propiedades diferentes, tales como actividad o estabilidad dentro de un complejo con una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como un complejo RNP Cas. En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica el ARN de guía puede unirse operativamente a al menos una secuencia de control transcripcional o traduccional, tal como un promotor, un 3' UTR o un 5' UTR. En una modalidad, el promotor puede ser un promotor de ARNt, *por ejemplo*, $ARNt^{Lys3}$o una quimera de ARNt. *Véase* Mefferd y otros, *RNA*. 2015 21:1683-9; Scherer y otros, *Nucleic Acids Res*. 2007 35: 2620–2628. En algunas

modalidades, el promotor puede reconocerse por la ARN polimerasa III (Pol III). Ejemplos no limitantes de promotores Pol III incluyen promotores U6 y H1. En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica el ARN de guía puede unirse operativamente a un promotor U6 de ratón o humano. En otras modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica el ARN de guía puede unirse operativamente a un promotor H1 de ratón o humano. En modalidades con más de un ARN de guía, los promotores usados para dirigir la expresión pueden ser iguales o diferentes. En algunas modalidades, el nucleótido que codifica el ARNcr del ARN de guía y el nucleótido que codifica el ARNtr del ARN de guía pueden proporcionarse en el mismo vector. En algunas modalidades, el nucleótido que codifica el ARNcr y el nucleótido que codifica el ARNtr pueden dirigirse por el mismo promotor. En algunas modalidades, el ARNcr y el ARNtr pueden transcribirse en un transcrito único. Por ejemplo, el ARNcr y el ARNtr pueden procesarse a partir del transcrito único para formar un ARN de guía de molécula doble. Alternativamente, el ARNcr y el ARNtr pueden transcribirse en un ARN de guía de molécula única (ARNsg). En otras modalidades, el ARNcr y el ARNtr pueden dirigirse por sus promotores correspondientes en el mismo vector. En otras modalidades más, el ARNcr y el ARNtr pueden codificarse por diferentes vectores.

En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica el ARN de guía puede ubicarse en el mismo vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas. En algunas modalidades, la expresión del ARN de guía y de la nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una proteína Cas, puede dirigirse por sus propios promotores correspondientes. En algunas modalidades, la expresión del ARN de guía puede dirigirse por el mismo promotor que dirige la expresión de la nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una proteína Cas. En algunas modalidades, el ARN de guía y la nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como un transcrito de la proteína Cas, pueden contenerse dentro de un transcrito único. Por ejemplo, el ARN de guía puede estar dentro de una región no traducida (UTR) de la nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como un transcrito de la proteína Cas. En algunas modalidades, el ARN de guía puede estar dentro de la 5' UTR del transcrito. En otras modalidades, el ARN de guía puede estar dentro del 3' UTR del transcrito. En algunas modalidades, la vida media intracelular del transcrito puede reducirse al contener el ARN de guía dentro de su 3' UTR y acortar así la longitud de su 3' UTR. En modalidades adicionales, el ARN de guía puede estar dentro de un intrón del transcrito. En algunas modalidades, pueden añadirse sitios de empalme

adecuados en el intrón dentro del cual se encuentra el ARN de guía, de modo que el ARN de guía se empalme adecuadamente del transcrito. En algunas modalidades, la expresión de la nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una proteína Cas, y el ARN de guía del mismo vector en proximidad temporal cercana puede facilitar una formación más eficiente del complejo CRISPR RNP.

En algunas modalidades, las composiciones comprenden un sistema de vectores. En algunas modalidades, el sistema de vectores puede comprender un solo vector. En otras modalidades, el sistema de vectores puede comprender dos vectores. En modalidades adicionales, el sistema de vectores puede comprender tres vectores. Cuando se usan diferentes ARN de guía para la multiplexación, o cuando se usan múltiples copias del ARN de guía, el sistema del vector puede comprender más de tres vectores.

En algunas modalidades, el sistema de vector puede comprender promotores inducibles para comenzar la expresión solo después de que se suministra a una célula diana. Los promotores inducibles ejemplares no limitantes incluyen aquellos inducibles por choque térmico, luz, productos químicos, péptidos, metales, esteroides, antibióticos o alcohol. En algunas modalidades, el promotor inducible puede ser uno que tenga un nivel de expresión basal (no inducido) bajo, tal como, por ejemplo, el promotor Tet-On® (Clontech).

En modalidades adicionales, el sistema de vector puede comprender promotores específicos de tejido para comenzar la expresión solo después de que se suministra en un tejido específico.

El vector puede suministrarse por liposoma, una nanopartícula, un exosoma o una microvesícula. El vector también puede suministrarse mediante una nanopartícula lipídica (LNP); véase, por ejemplo, el documento USSN 62/433,228, presentado el 12 de diciembre de 2016 y titulado "LIPID NANOPARTICLE FORMULATIONS FOR CRISPR/CAS COMPONENTS", cuyo contenido se incorpora por la presente descripción como referencia en su totalidad. Cualquiera de las formulaciones de LNP y LNPs descritas en la presente descripción son adecuadas para suministrar los guías solos o juntos, una nucleasa cas o un ARNm que codifica una nucleasa cas. En algunas modalidades, se incluye una composición de LNP que comprende: un componente de ARN y un componente lipídico, en donde el componente lipídico comprende un lípido de amina, un lípido neutro, un lípido auxiliar y un lípido furtivo; y en donde la relación N/P es aproximadamente 1-10.

En algunos casos, el componente lipídico comprende el lípido A o su análogo acetal, colesterol, DSPC y PEG-DMG; y en donde la relación N/P es aproximadamente 1-10. En algunas modalidades, el componente lipídico comprende: aproximadamente 40-60 % molar del lípido de amina; aproximadamente 5-15 % molar del lípido neutro; y aproximadamente 1.5-10 % molar del lípido de PEG, en donde el resto del componente lipídico es lípido auxiliar, y en donde la relación N/P de la composición de LNP es aproximadamente 3-10. En algunas modalidades, el componente lipídico comprende aproximadamente 50-60 % molar del lípido de amina; aproximadamente 8-10 % molar del lípido neutro; y aproximadamente 2.5-4 % molar del lípido de PEG, en donde el resto del componente lipídico es lípido auxiliar, y en donde la relación N/P de la composición de LNP es aproximadamente 3-8. En algunos casos, el componente lipídico comprende: aproximadamente 50-60 % molar del lípido de amina; aproximadamente 5-15 % molar del DSPC; y aproximadamente 2.5-4 % molar del lípido de PEG, en donde el resto del componente lipídico es colesterol, y en donde la relación N/P de la composición de LNP es aproximadamente 3-8. En algunos casos, el componente lipídico comprende: 48-53 % molar del lípido A; aproximadamente 8-10 %molar del DSPC; y 1.5-10 % molar del lípido de PEG, en donde el resto del componente lipídico es colesterol, y en donde la relación N/P de la composición de LNP es 3-8 ±0.2.

En algunas modalidades, el vector puede suministrarse sistémicamente. En algunas modalidades, el vector puede suministrarse a la circulación hepática.

Esta descripción y modalidades ejemplares no deben tomarse como limitantes. Para los propósitos de esta especificación y reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades, por cientos o proporciones, y otros valores numéricos usados en la especificación y reivindicaciones, han de entenderse como modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”, en la medida que aún no se hayan modificado. En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente especificación y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener. Por lo menos, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe al menos interpretarse a la luz del número de dígitos significativos informados y aplicando técnicas de redondeo habituales.

Se nota que, como se usa en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que expresa e

inequívocamente se limite a una referencia. Como se usa en la presente descripción, el término "incluye" y sus variantes gramaticales no pretenden ser limitantes, de manera que la enumeración de artículos en una lista no es para la exclusión de otros artículos similares que pueden sustituirse o añadirse a los artículos listados.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas modalidades descritas y no se construyen como limitantes del alcance de esta descripción en ninguna manera.

Ejemplo 1. Materiales y Métodos

Transcripción in vitro ("IVT") del ARNm de la nucleasa

El ARNm de Cas9 con caperuza y poliadenilado de *Streptococcus pyogenes* ("Spy") que contiene N1-metil pseudo-U se generó por transcripción *in vitro* mediante el uso de un molde de ADN plasmídico linealizado y ARN polimerasa T7. El ADN plasmídico que contiene un promotor T7, una secuencia para la transcripción de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o 2, y se linealizó una región de poli (A/T) de 100 nt mediante incubación a 37 °C durante 2 horas con XbaI con las siguientes condiciones: 200 ng/µl de plásmido, 2 U/µl de XbaI (NEB) y amortiguador de reacción 1x. El XbaI se inactivó por calentamiento de la reacción a 65 °C durante 20 min. El plásmido linealizado se purificó a partir de sales de amortiguador y enzima mediante el uso de una columna de sílice maxi spin (Epoch Life Sciences) y se analizó mediante gel de agarosa para confirmar la linealización. La reacción IVT para generar el ARNm modificado de Cas9 se incubó a 37 °C durante 4 horas en las siguientes condiciones: 50 ng/µl de plásmido linealizado; 2 mM de cada uno de GTP, ATP, CTP y N1-metil pseudo-UTP (Trilink); 10 mM de ARCA (Trilink); 5 U/µl de ARN polimerasa T7 (NEB); 1 U/µl de inhibidor de la RNasa murina (NEB); 0.004 U/µl de pirofosfatasa de E. coli inorgánica (NEB); y amortiguador de reacción 1x. Después de la incubación de 4 horas, se añadió TURBO DNasa (ThermoFisher) a una concentración final de 0.01 U/µl, y la reacción se incubó durante 30 minutos adicionales para eliminar el molde de ADN. El ARNm de Cas9 se purificó a partir de enzimas y nucleótidos mediante el uso de un kit MegaClear Transcription Clean-up según el protocolo del fabricante (ThermoFisher). Alternativamente, el ARNm se purificó mediante un protocolo de precipitación, que en algunos casos se siguió con la purificación basada en HPLC. Brevemente, después de la digestión con DNasa, el ARNm se precipitó mediante la adición de 0.21x vol de una solución de LiCl 7.5 M y se mezcló, y el ARNm precipitado se sedimentó por centrifugación. Una vez que se retiró el sobrenadante, el ARNm se reconstituyó en agua. El ARNm se precipitó nuevamente mediante el uso de acetato de amonio y etanol. Se añadió acetato de

amonio 5 M a la solución de ARNm para una concentración final de 2 M junto con un volumen 2x de EtOH al 100 %. La solución se mezcló y se incubó a -20 °C durante 15 min. El ARNm precipitado se sedimentó nuevamente por centrifugación, se retiró el sobrenadante y se reconstituyó el ARNm en agua. Como etapa final, el ARNm se precipitó mediante el uso de acetato de sodio y etanol. Se añadió a la solución 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5.5) junto con un volumen 2x de EtOH al 100 %. La solución se mezcló y se incubó a -20 °C durante 15 min. El ARNm precipitado se sedimentó nuevamente por centrifugación, se retiró el sobrenadante, se lavó el sedimento con etanol frío al 70 % y se dejó secar al aire. El ARNm se reconstituyó en agua. Para el ARNm purificado por HPLC, después de la precipitación con LiCl y la reconstitución, el ARNm se purificó por HPLC RP-IP (véase, por ejemplo, Kariko, y otros, *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 21 e142). Las fracciones elegidas para unir se combinaron y desalaron mediante la precipitación con acetato de sodio/etanol como se describió anteriormente. La concentración del transcrito se determinó mediante la medición de la absorbancia de la luz a 260 nm (Nanodrop), y el transcrito se analizó mediante electroforesis capilar por Bioanlayzer (Agilent).

Cuando las SEQ ID NO: 1 y 2 se mencionan a continuación con respecto a los ARN, se entiende que Ts debe reemplazarse con Us (que fueron N1-metil pseudouridinas como se describió anteriormente). Los ARNm de Cas9 usados en los Ejemplos incluyen una caperuza de 5’ y una cola de poli-A de 3’, por ejemplo, hasta 100 nts, y se identifican por la SEQ ID NO.

SEQ ID NO: 1: Secuencia 1 de Cas 9 para la transcripción.

GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCT
TATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA
ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCA
AGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC
TGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGA
AGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAA
ATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAA
GAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCA
TACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACA
GACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGA
GGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTG
TTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAA

GCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTG
GAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTG
ATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAA
GACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTG
GCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGAC
GCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTG
AGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAG
GCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGC
AAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAA
GTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCT
GAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGC
ACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACC
CGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGT
ACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGA
GCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCG
CACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGG
TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAA
GGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAA
GAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCT
GAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGT
CGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAA
GGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCT
GACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC
ACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATG
GGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGA
CAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGAT
CCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACA
GGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAA
GGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACA
CAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGG
GACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTG
GGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAA

GCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGA
CATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAG
GACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAG
CGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCT
GCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAG
AGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAAC
AAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTA
CGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCT
GGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTA
CCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAA
GTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAG
AAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTT
CTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAAT
CAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACA
AGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCG
TCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAG
AGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGG
AGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAA
GGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGG
AAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGG
AAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAA
ACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTG
GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGA
AGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACT
ACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAG
ACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCA
GAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGG
CAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGG
AAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAA
TCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAG
GTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAG
AAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACA

CCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATT
AATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG

SEQ ID NO: 2: Secuencia 2 de Cas 9 para la transcripción.

GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCT
TATTCGGATCCATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGT
GGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCT
GGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGA
CTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACAC
CCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATGGCAAA
GGTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAG
AAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAA
AAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCG
ACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTTCCTG
ATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAACTGG
TGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCTAGCGGCGTCGATG
CCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGC
ACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTG
GGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAAC
TCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCA
GTACGCGGATCTGTTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATA
TCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCG
GTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACT
GCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTA
CATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGA
AAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCG
GAAACAGAGAACCTTTGACAACGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTG
CACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCGGGAAA
AGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGG
CAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAAT
TTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAATGACC
AACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACG
AATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAG

GAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACAGAAGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAG
ACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAG
TGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGA
ACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGA
ACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGAT
GATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACA
ACTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGT
ATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCCTCAAATCGGATGGCTTCG
CTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACAT
CCAAAAAGCACAAGTGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCT
GGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACTGTGAAGGTGGTCGACGA
GCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCG
AGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGA
TCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAA
AACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGAC
ATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACA
TCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAG
CGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGA
TGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTG
ACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCA
TCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGG
ACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGG
TGATTACCCTGAAAAGCAAACTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAA
AGTGAGAGAAATCAACAACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGT
CGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGAC
TACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAA
GCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACTGAAATTAC
GCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGG
GCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGCTCTCTAT
GCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGA
ATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGA
CCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTCGCATACTCCGTCCTCGTGGTG

GCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGG
GATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCCTCGAGGCG
AAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACTCCCCAAGTACTCACTG
TTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAA
GGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTA
CGAAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCA
GCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTG
ATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATA
AGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACCCTGACTAACCTGGG
AGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCC
ACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAA
ACTAGGATCGATCTGTCGCAGCTGGGTGGCGATGGCGGTGGATCTCCGAAAAAGAAG
AGAAAGGTGTAATGAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAT
AAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTA
AAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTG
TGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG

Diseño de guía de TTR humana y TTR humana con diseño de guía de homología de mono cynomolgus

Se realizó la selección inicial del guía *in silico* mediante el uso de un genoma de referencia humano (por ejemplo, hg38) y regiones genómicas de interés definidas por el usuario (por ejemplo, exones codificadores de proteínas TTR), para identificar PAMs en las regiones de interés. Para cada PAM identificado, se realizaron análisis y se informaron estadísticas. Las moléculas de ARNg se seleccionaron adicionalmente y se ordenaron según un número de criterios (por ejemplo, contenido de GC, actividad prevista dentro de la diana y actividad potencial fuera de la diana).

Se diseñó un total de 68 ARN de guía hacia TTR (ENSG00000118271) dirigidos a las regiones de codificación de proteínas dentro del Exón 1, 2, 3 y 4. Del total de los 68 guías, 33 eran 100 % homólogos en el mono cynomolgus ("cyno"). Además, para 10 de los guías de TTR humana que no eran perfectamente homólogos en cyno, los guías "sustitutos" se diseñaron y fabricaron en paralelo para coincidir perfectamente con la secuencia diana de cyno correspondiente. Estos guías "sustitutos" o "herramientas" pueden seleccionarse en cyno, por ejemplo, para aproximar la actividad y la función de la secuencia de guía humana homóloga. Se proporcionan secuencias de guía y las correspondientes coordenadas genómicas (Tabla 1). Todos los ARN de guía se hicieron

como ARN de guía doble, y un subconjunto de las secuencias de guía se hizo como ARN de guía única modificado (Tabla 2). Se proporcionan la alineación de ID de guía a través de las IDs de ARN de guía doble (ARNdg), las IDs de ARN de guía única modificado (ARNsg), el número de incompatibilidades con el genoma de cyno, así como también las IDs compatibles exactas de cyno (Tabla 3). Cuando se usan los ARNdg en los experimentos detallados a lo largo de los Ejemplos, se usó la SEQ ID NO: 270.

Suministro del ARNm de Cas9 y el ARN de guía in vitro

Línea celular HEK293_Cas9. La línea celular de adenocarcinoma de riñón embrionario humano HEK293 que expresa constitutivamente Cas9 Spy ("HEK293_Cas9") se cultivó en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % y 500 µg/ml de G418. Las células se colocaron a una densidad de 10,000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos 24 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, Cat. 13778150) según el protocolo del fabricante. Las células se transfectaron con un lipoplex que contenía ARNcr individual (25 nM), ARNtr (25 nM), Lipofectamine RNAiMAX (0.3 µl/pocillo) y OptiMem.

Línea celular HUH7. La línea celular de carcinoma hepatocelular humano HUH7 (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Cat. JCRB0403) se cultivó en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 %. Las células se colocaron en placas a una densidad de 15,000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos 20 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con Lipofectamine MessengerMAX (ThermoFisher, Cat. LMRNA003) según el protocolo del fabricante. Las células se transfectaron secuencialmente con un lipoplex que contenía ARNm de Cas9 Spy (100 ng), MessengerMAX (0.3 µl/pocillo) y OptiMem seguido de un lipoplex separado que contenía ARNcr individual (25 nM), ARN trazador (25 nM), MessengerMAX (0.3 µl/pocillo) y OptiMem.

Línea celular HepG2. La línea celular de carcinoma hepatocelular humano HepG2 (American Type Culture Collection, Cat. HB-8065) se cultivó en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 %. Las células se contaron y se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con colágeno Bio-coat (ThermoFisher, Cat. 877272) a una densidad de 10,000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos 24 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, Cat. 11668019) según el protocolo del fabricante. Las células se transfectaron secuencialmente con lipoplex que contenía ARNm de Cas9 Spy (100 ng), Lipofectamine 2000 (0.2 µl/pocillo) y OptiMem seguido por un lipoplex separado que contenía

ARNcr individual (25 nM), ARN trazador (25 nM), Lipofectamine 2000 (0.2 µl/pocillo) y OptiMem.

Hepatocitos primarios del hígado. Se cultivaron hepatocitos primarios de hígado humano (PHH) y hepatocitos primarios de hígado de cynomolgus (PCH) (Gibco) según el protocolo del fabricante (Invitrogen, protocolo 11.28.2012). En resumen, las células se descongelaron y se resuspendieron en medio de descongelación de hepatocitos con suplementos (Gibco, Cat. CM7000) seguido de centrifugación a 100 g durante 10 minutos para humanos y 80 g durante 4 minutos para cyno. El sobrenadante se desechó y las células sedimentadas se resuspendieron en medio de recubrimiento de hepatocitos más paquete de suplemento (Invitrogen, Cat. A1217601 y CM3000). Las células se contaron y se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertos con colágeno I Bio-coat (ThermoFisher, Cat. 877272) a una densidad de 33,000 células/pocillo para humanos o 60,000 células/pocillo para cyno (o 65,000 células/pocillo cuando se ensayaron los efectos en la proteína TTR, descrita más adelante). Las células en placa se dejaron sedimentar y adherir durante 6 o 24 horas en una incubadora de cultivo de tejidos a 37 °C y atmósfera de CO_2 al 5 %. Después de la incubación, se verificó la formación de monocapa en las células y el medio se reemplazó con medio de cultivo de hepatocitos con un paquete de suplementos sin suero (Invitrogen, Cat. A1217601 y CM4000).

Las transfecciones basadas en Lipofectamine RNAiMax (ThermoFisher, Cat. 13778150) se realizaron según el protocolo del fabricante. Las células se transfectaron secuencialmente con un lipoplex que contiene ARNm de Cas9 Spy (100 ng), Lipofectamine RNAiMax (0.4 µl/pocillo) y OptiMem, seguido de un lipoplex separado que contiene ARNcr (25 nM) y ARN trazador (25 nM) o ARNsg (25nM), Lipofectamine RNAiMax (0.4 µl/pocillo) y OptiMem.

La formación de ribonucleótidos se realizó antes de la electroporación o la transfección de la proteína Cas9 Spy cargada con los ARN de guía (RNPs) en las células. Para el guía doble (ARNdg), el ARNcr y el ARNtr individuales se pre-hibridaron mezclando cantidades equivalentes de reactivo e incubando a 95 °C durante 2 minutos y enfriando a temperatura ambiente. La guía única (ARNsg) se hirvió a 95 °C durante 2 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. El ARNdg o ARNsg hervido se incubó con la proteína Cas9 Spy en Optimem durante 10 minutos a temperatura ambiente para formar un complejo de ribonucleoproteína (RNP).

Para la electroporación de RNP en los hepatocitos primarios humanos y de cyno, las células se descongelan y se resuspenden en amortiguador P3 de célula primaria de electroporación Lonza a una concentración de 2,500 células por µl para los hepatocitos humanos y 3,500 células por µl para

los hepatocitos de cyno. Un volumen de 20 µl de células resuspendidas y 5 µl de RNP se mezclan por guía. Se colocan 20 µl de la mezcla en una placa de electroporación Lonza. Las células se electroporaron mediante el uso del nucleofector Lonza con el protocolo preestablecido EX-147. Después de la electroporación, las células se transfieren a una placa Biocoat que contiene medio de mantenimiento precalentado y se colocan en una incubadora de cultivo de tejidos a 37 °C y CO_2 al 5 %.

Para las transfecciones de lipoplex RNP, las células se transfectaron con Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, Cat. 13778150) según el protocolo del fabricante. Las células se transfectaron con una RNP que contenía Cas9 Spy (10 nM), guía individual (10 nM), ARN trazador (10 nM), Lipofectamine RNAiMAX (1.0 µl/pocillo) y OptiMem. La formación de RNP se realizó como se describe anteriormente.

Las LNPs se formaron mediante una mezcla microfluídica de las soluciones de lípidos y ARN mediante el uso de un Precision Nanosystems NanoAssemblr™ Benchtop Instrument, según el protocolo del fabricante, o la mezcla de flujo cruzado.

Formulación de LNP - NanoAssemblr

En general, los componentes de las nanopartículas lipídicas se disolvieron en etanol al 100 % con el componente lipídico de varias relaciones molares. Las cargas de ARN se disolvieron en citrato 25 mM, NaCl 100 mM, pH 5.0, lo que da como resultado una concentración de carga de ARN de aproximadamente 0.45 mg/ml. Las LNPs se formularon con una relación molar de lípido de amina a fosfato de ARN (N:P) de aproximadamente 4.5 o aproximadamente 6, con la relación de ARNm a ARNg a 1:1 en peso.

Las LNPs se formaron mediante la mezcla microfluídica de las soluciones de lípidos y ARN mediante el uso de un Precision Nanosystems NanoAssemblr™ Benchtop Instrument, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se mantuvo una relación 2:1 del disolvente acuoso a orgánico durante la mezcla mediante el uso de velocidades de flujo diferencial. Después de mezclar, las LNPs se recogieron, se diluyeron en agua (aproximadamente 1:1 v/v), se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente y se diluyeron adicionalmente con agua (aproximadamente 1:1 v/v) antes del intercambio final del amortiguador. El intercambio final del amortiguador en Tris 50 mM, NaCl 45 mM, sacarosa al 5 % (p/v), pH 7.5 (TSS) se completó con columnas de desalación PD-10 (GE). Si es necesario, las formulaciones se concentraron por centrifugación con filtros centrífugos Amicon 100 kDa (Millipore). La mezcla resultante se filtró luego mediante el uso de un filtro estéril de 0.2 µm. La LNP final se almacenó a -80 °C hasta su uso posterior.

Formulación de LNP – Flujo cruzado

Para las LNPs preparadas mediante el uso de la técnica de flujo cruzado, las LNPs se formaron al mezclar por chorro el lípido en etanol con dos volúmenes de soluciones de ARN y un volumen de agua. El lípido en etanol se mezcla a través de una mezcla cruzada con los dos volúmenes de solución de ARN. Una cuarta corriente de agua se mezcla con la corriente de salida del cruce a través de un punto de salida en línea. (*Véase* el documento WO2016010840 Figura 2) Las LNPs se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente y se diluyeron adicionalmente con agua (aproximadamente 1:1 v/v). Las LNPs diluidas se concentraron mediante el uso de filtración de flujo tangencial en un cartucho de lámina plana (Sartorius, 100 kD MWCO) y luego se intercambió el amortiguador por diafiltración en Tris 50 mM, NaCl 45 mM, sacarosa al 5 % (p/v), pH 7.5 (TSS). Alternativamente, el intercambio final del amortiguador en TSS se completó con columnas de desalación PD-10 (GE). Si es necesario, las formulaciones se concentraron por centrifugación con filtros centrífugos Amicon 100 kDa (Millipore). La mezcla resultante se filtró luego mediante el uso de un filtro estéril de 0.2 µm. La LNP final se almacenó a 4 °C o -80 °C hasta su uso posterior.

Analítica de formulación

La dispersión dinámica de la luz ("DLS") se usa para caracterizar el índice de polidispersidad ("pdi") y el tamaño de las LNPs de la presente descripción. La DLS mide la dispersión de la luz que resulta de someter una muestra a una fuente de luz. El PDI, según lo determinado a partir de mediciones de la DLS, representa la distribución del tamaño de partícula (alrededor del tamaño medio de partícula) en una población, con una población perfectamente uniforme que tiene un PDI de cero. El tamaño medio de las partículas y la polidispersidad se miden mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) mediante el uso de un instrumento Malvern Zetasizer DLS. Las muestras de LNP se diluyeron 30X en PBS antes de ser medidas por DLS. Se informó el diámetro promedio Z, que es una medida basada en la intensidad del tamaño medio de partícula junto con el diámetro promedio numérico y el pdi. Un instrumento Malvern Zetasizer también se usa para medir el potencial zeta de la LNP. Las muestras se diluyen 1:17 (50ul en 800ul) en PBS 0.1X, pH 7.4 antes de la medición.

Se usa un ensayo basado en fluorescencia (Ribogreen®, ThermoFisher Scientific) para determinar la concentración total del ARN y el ARN libre. La eficiencia de encapsulación se calcula como (ARN total - ARN libre)/ARN total. Las muestras de LNP se diluyen apropiadamente con amortiguador TE 1x, que contiene Triton-X 100 al 0.2 % para determinar el ARN total, o

amortiguador TE 1x para determinar el ARN libre. Las curvas estándar se preparan mediante el uso de la solución de ARN de partida usada para hacer las formulaciones y se diluyen en amortiguador TE 1x Triton-X 100 al +/- 0.2 %. Luego se añade colorante RiboGreen® diluido (de acuerdo con las instrucciones del fabricante) a cada uno de los estándares y muestras y se deja incubar durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente, en ausencia de luz. Se usa un lector de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices) para leer las muestras con longitudes de onda de excitación, nivel de corte automático y emisión configuradas a 488 nm, 515 nm y 525 nm respectivamente. El ARN total y el ARN libre se determinan a partir de las curvas estándar apropiadas.

La eficiencia de encapsulación se calcula como (ARN total - ARN libre)/ARN total. Puede usarse el mismo procedimiento para determinar la eficiencia de encapsulación de un componente de carga basado en ADN. Para el ADN monocatenario, puede usarse Oligreen Dye, y para el ADN bicatenario, Picogreen Dye.

Típicamente, cuando se preparan las LNPs, la encapsulación fue >80 %, el tamaño de partícula fue <120 nm y el pdi fue <0.2.

***Suministro de LNP* in vivo**

A menos que se indique lo contrario, en cada estudio se usaron ratones hembra CD-1, de 6-10 semanas de edad. Los animales se pesaron y se agruparon de acuerdo con el peso corporal para preparar soluciones de dosificación basadas en el peso promedio del grupo. Las LNPs se dosificaron a través de la vena lateral de la cola en un volumen de 0.2 ml por animal (aproximadamente 10 ml por kilogramo de peso corporal). Los animales se observaron aproximadamente 6 horas después de la dosis para detectar efectos adversos. El peso corporal se midió a las veinticuatro horas después de la administración, y los animales se sacrificaron en varios momentos por desangrado mediante punción cardíaca bajo anestesia con isoflourano. Se recogió sangre en tubos separadores de suero o en tubos que contienen citrato de sodio amortiguado para plasma como se describe en la presente descripción. Para los estudios que incluyeron la edición in vivo, se recolectó tejido hepático del lóbulo mediano o de tres lóbulos independientes (por ejemplo, el lóbulo medio derecho, medio izquierdo y lateral izquierdo) de cada animal para la extracción y análisis de ADN.

Análisis de la transtiretina (TTR) por ELISA usado en los estudios con animales

Se recogió sangre y se aisló el suero como se indica. Los niveles séricos totales de la TTR de ratón se determinaron mediante el uso de un kit Mouse Prealbumin (Transthyretin) ELISA (Aviva

Systems Biology, Cat. OKIA00111); los niveles séricos de la TTR en ratas se midieron mediante el uso de un kit ELISA específico para ratas (Aviva Systems Biology, número de catálogo OKIA00159); los niveles séricos de la TTR humana se midieron mediante el uso de un kit ELISA específico para humanos (Aviva Systems Biology, número de catálogo OKIA00081); cada uno de acuerdo con el protocolo de fabricación. Brevemente, los sueros se diluyeron en serie con el diluyente de muestra del kit hasta una dilución final de 10,000 veces o 5,000 veces cuando se midió la TTR humana en suero de ratón. Se añadieron 100 ul de la curva estándar preparada o las muestras de suero diluido a la placa ELISA, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron 3 veces con el amortiguador de lavado proporcionado. Luego se añadieron 100 µl del anticuerpo de detección a cada pocillo y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente seguido de 3 lavados. Se añaden 100 µl de sustrato y luego se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 100 µl de solución de parada. La absorbancia de los contenidos se midió en el lector de placas Spectramax M5 con análisis mediante el uso del programa SoftmaxPro versión 7.0. Los niveles de la TTR en suero se cuantificaron a partir de la curva estándar mediante el uso de un ajuste logístico de 4 parámetros y se expresaron como ug/ml de suero o el porcentaje de disminución relativo a los animales de control (tratados con vehículo).

Aislamiento de ADN genómico

Las células transfectadas se cultivaron después de la transfección a las 24, 48 o 72 horas. El ADN genómico se extrajo de cada pocillo de una placa de 96 pocillos mediante el uso de 50 µl/pocillo de una solución de extracción de ADN BuccalAmp (Epicentre, Cat. QE09050) según el protocolo del fabricante. Todas las muestras de ADN se sometieron a PCR y análisis NGS posteriores, como se describe en la presente descripción.

Análisis de secuenciación de próxima generación ("NGS")

Para determinar cuantitativamente la eficiencia de la edición en la ubicación diana en el genoma, se usó la secuenciación para identificar la presencia de inserciones y deleciones introducidas por la edición génica.

Los cebadores se diseñaron alrededor del sitio diana dentro del gen de interés (por ejemplo, *TTR*), y se amplificó el área genómica de interés.

Se realizó una PCR adicional según los protocolos del fabricante (Illumina) para añadir el químico para la secuenciación. Los amplicones se secuenciaron en un instrumento Illumina MiSeq. Las lecturas se alinearon con un genoma de referencia (por ejemplo, el genoma de referencia humano

(hg38), el genoma de referencia de cynomologus (mf5), el genoma de referencia de rata (rn6) o el genoma de referencia de ratón (mm10)) después de eliminar los que tuvieron puntuaciones de baja calidad. Los archivos resultantes que contienen las lecturas se asignaron al genoma de referencia (archivos BAM), donde se seleccionaron las lecturas que se superponían a la región diana de interés y se calculó el número de lecturas de tipo salvaje frente al número de lecturas que contienen una inserción, sustitución o deleción.

El porcentaje de edición (por ejemplo, la "eficiencia de edición" o "porcentaje de edición" o "frecuencia de indel") se define como el número total de lecturas de secuencia con inserciones/deleciones ("indeles") o sustituciones sobre el número total de lecturas de secuencia, incluido el tipo salvaje.

Análisis por electrotransferencia de la proteína transtiretina secretada ("TTR")

Los niveles secretados de la proteína TTR en el medio se determinaron mediante el uso de los métodos de electrotransferencia. Las células HepG2 se transfectaron como se describió previamente con los guías seleccionados de la Tabla 1. Se realizaron cambios en el medio cada 3 días después de la transfección. Seis días después de la transfección, se retiró el medio y las células se lavaron una vez con medio que no contenía suero fetal bovino (FBS). Se añadió medio sin suero a las células y se incubó a 37 °C. Después de 4 horas, el medio se retiró y se centrifugó para sedimentar cualquier residuo; el número de células para cada pocillo se estimó en base a los valores obtenidos de un ensayo CTG en las células restantes y la comparación con el promedio de la placa. Después de la centrifugación, el medio se transfirió a una nueva placa y se almacenó a -20 °C. Se realizó una precipitación con acetona del medio para precipitar cualquier proteína que ha sido secretada en el medio. Se añadieron cuatro volúmenes de acetona helada a un volumen de medio. La solución se mezcló bien y se mantuvo a -20 °C durante 90 minutos. La mezcla de acetona:medio se centrifugó a 15,000xg y 4 °C durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento retenido se secó al aire para eliminar cualquier acetona residual. El sedimento se resuspendió en 15 µl de amortiguador RIPA (Boston Bio Products, Cat. BP-115) más una mezcla de inhibidor de proteasa recién añadido que consiste en un cóctel completo de inhibidor de proteasa (Sigma, Cat. 11697498001) y DTT 1 mM. Los lisados se mezclaron con amortiguador Laemmli y se desnaturalizaron a 95 °C durante 10 minutos. Se realizaron las electrotransferencias mediante el uso del sistema NuPage en geles Bis-Tris al 12 % (ThermoFisher), según el protocolo del fabricante, seguido de transferencia húmeda sobre membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad, Cat. 1620115). Las transferencias se bloquearon mediante el uso de leche seca al 5 % en TBS

durante 30 minutos en un balancín de laboratorio a temperatura ambiente. Las transferencias se enjuagaron con TBST y se sondearon con anticuerpo monoclonal α-TTR de conejo (Abcam, Cat. Ab75815) a 1:1,000 en TBST. La alfa-1 antitripsina se usó como control de carga (Sigma, Cat. HPA001292) a 1:1,000 en TBST y se incubó simultáneamente con el anticuerpo primario TTR. Las transferencias se sellaron en una bolsa y se mantuvieron durante la noche a 4 °C en un balancín de laboratorio. Después de la incubación, las manchas se enjuagaron 3 veces durante 5 minutos cada una en TBST y se sondearon con anticuerpos secundarios a conejo (ThermoFisher, Cat. PISA535571) a 1:25,000 en TBST durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, las manchas se enjuagaron 3 veces durante 5 minutos cada una en TBST y 2 veces con PBS. Las transferencias se visualizaron y analizaron mediante el uso de un sistema Licor Odyssey.

Análisis de la TTR intracelular por electrotransferencia

La línea celular de carcinoma hepatocelular, HUH7, se transfectó como se describió previamente con los guías seleccionados de la Tabla 1. Seis días después de la transfección, se retiró el medio y se lisaron las células con 50 µl/pocillo de amortiguador RIPA (Boston Bio Products, Cat. BP-115) más una mezcla de inhibidor de proteasa recién añadido que consiste en un cóctel completo de inhibidor de proteasa (Sigma, Cat. 11697498001), DTT 1 mM y benzonasa 250 U/ml (EMD Millipore, Cat. 71206-3). Las células se mantuvieron en hielo durante 30 minutos, momento en el que se añadió NaCl (concentración final 1 M). Los lisados celulares se mezclaron completamente y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Los extractos de células completas ("WCE") se transfirieron a una placa de PCR y se centrifugaron a restos de sedimentos. Se usó un ensayo de Bradford (Bio-Rad, Cat. 500-0001) para evaluar el contenido de proteína de los lisados. El procedimiento de ensayo de Bradford se completó según el protocolo del fabricante. Los extractos se almacenaron a menos 20 °C antes de su uso. Se realizaron las electrotransferencias para evaluar los niveles de la proteína TTR intracelular. Los lisados se mezclaron con amortiguador Laemmli y se desnaturalizaron a 95 °C durante 10 minutos. Se realizaron las electrotransferencias mediante el uso del sistema NuPage en geles Bis-Tris al 12 % (ThermoFisher), según el protocolo del fabricante, seguido de transferencia húmeda sobre membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad, Cat. 1620115). Después de la transferencia, las membranas se enjuagaron completamente con agua y se tiñeron con solución Ponceau S (Boston Bio Products, Cat. ST-180) para confirmar la transferencia completa. Las transferencias se bloquearon mediante el uso de leche seca al 5 % en TBS durante 30 minutos en un balancín de laboratorio a temperatura ambiente. Las transferencias se enjuagaron con TBST y se sondearon con anticuerpo monoclonal α-TTR de conejo (Abcam,

Cat. Ab75815) a 1:1,000 en TBST. La β-actina se usó como control de carga (ThermoFisher, Cat. AM4302) a 1:2500 en TBST y se incubó simultáneamente con el anticuerpo primario de TTR. Las transferencias se sellaron en una bolsa y se mantuvieron durante la noche a 4 °C en un balancín de laboratorio. Después de la incubación, las transferencias se enjuagaron 3 veces durante 5 minutos cada una en TBST y se sondearon con anticuerpos secundarios contra ratón y conejo (ThermoFisher, Cat. PI35518 y PISA535571) a 1:25,000 cada una en TBST durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, las manchas se enjuagaron 3 veces durante 5 minutos cada una en TBST y 2 veces con PBS. Las transferencias se visualizaron y analizaron mediante el uso de un sistema Licor Odyssey.

Ejemplo 2. Selección de secuencias de ARNdg

Selección cruzada de ARNdg de TTR en múltiples tipos de células

Los guías en formato ARNdg dirigidos a *TTR* humana y las secuencias coincidentes de cynomologus se suministraron a las líneas celulares HEK293_Cas9, HUH7 y HepG2, así como a los hepatocitos primarios humanos y a los hepatocitos primarios de mono cynomolgus como se describe en el Ejemplo 1. El porcentaje de edición se determinó para los ARNcr que comprenden cada secuencia de guía a través de cada tipo de célula y las secuencias de guía se ordenaron según el % de edición más alto. Los datos de selección para las secuencias de guía en la Tabla 1 en las cinco líneas celulares se enumeran a continuación (Tabla 4 a 11).

La Tabla 4 muestra el promedio y la desviación estándar para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNcr de *TTR* en la línea celular de adenocarcinoma de riñón humano, HEK293_Cas9, que sobreexpresa constitutivamente la proteína Cas9 Spy.

Tabla 4: Datos de la edición de TTR en células Hek_Cas9 transfectadas con ARNdg

ID DE GUÍA	Promedio % de Edición	Desviación estándar % de Edición	Promedio % de Inserción	Desviación estándar % de Inserción	Promedio % de Deleción	Desviación estándar % de Deleción
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

La Tabla 5 muestra el promedio y la desviación estándar para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNcr de TTR de prueba cotransfectados con ARNm de Cas9 Spy (SEQ ID NO: 2) en la línea celular de carcinoma hepatocelular humano HUH7.

Tabla 5: Datos de la edición de TTR en células HUH7 transfectadas con ARNdg y ARNm de Cas9 Spy

ID DE GUÍA	**Promedio % de Edición**	**Desviación estándar % de Edición**	**Promedio % de Inserción**	**Desviación estándar % de Inserción**	**Promedio % de Deleción**	**Desviación estándar % de Deleción**
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

La Tabla 6 muestra el promedio y la desviación estándar para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNcr de control y de TTR de prueba cotransfectados con el ARNm de Cas9 Spy (SEQ ID NO: 2) en la línea celular del carcinoma hepatocelular humano, HepG2.

Tabla 6: Datos de la edición de TTR en células HepG2 transfectadas con ARNdg y ARNm de Cas9 Spy

ID DE GUÍA	Promedio % de	Desviación estándar	Promedio % de	Desviación estándar	Promedio % de	Desviación estándar

	Edición	% de Edición	Inserción	% de Inserción	Deleción	% de Deleción
CR001261 (control)	49.16	7.45	16.46	3.46	32.71	4.06
CR001262 (control)	63.33	5.66	59.88	4.92	3.45	0.86
CR001263 (control)	39.19	6.98	37.59	8.01	1.60	1.92
CR001264 (control)	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

La Tabla 7 muestra el promedio y la desviación estándar para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNdg de *TTR* de prueba electroporados con la proteína Cas9 Spy (RNP) en hepatocitos primarios humanos.

5

Tabla 7: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios humanos electroporados con la proteína Cas9 Spy cargada con ARNdg

ID DE GUÍA	Promedio % de Edición	Desviación estándar % de Edición	Promedio % de Inserción	Desviación estándar % de Inserción	Promedio % de Deleción	Desviación estándar % de Deleción
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

La Tabla 8 muestra el promedio y la desviación estándar para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNdg de control y de *TTR* de prueba transfectados con la proteína Cas9 Spy (RNP) en hepatocitos primarios humanos.

Tabla 8: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios humanos transfectados con Cas9 Spy cargados con ARNdg

ID DE GUÍA	Promedio % de Edición	Desviación estándar % de Edición	Promedio % de Inserción	Desviación estándar % de Inserción	Promedio % de Deleción	Desviación estándar % de Deleción
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

La Tabla 9 muestra el promedio y la desviación estándar para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNdg de control y de *TTR* de prueba cotransfectados con ARNm de Cas9 Spy (SEQ ID NO: 2) en hepatocitos primarios humanos.

Tabla 9: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios humanos transfectados con ARNdg y ARNm de Cas9 Spy

ID DE GUÍA	Promedio % de Edición	Desviación estándar % de Edición	Promedio % de Inserción	Desviación estándar % de Inserción	Promedio % de Deleción	Desviación estándar % de Deleción
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

La Tabla 10 muestra el promedio y la desviación estándar para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNdg de *TTR* de prueba electroporados con la proteína Cas9 Spy (RNP) en los hepatocitos primarios de cyno.

Tabla 10: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios de cyno electroporados con proteína Cas9 Spy y ARNdg

ID DE GUÍA	Promedio % de Edición	Desviación estándar % de Edición	Promedio % de Inserción	Desviación estándar % de Inserción	Promedio % de Deleción	Desviación estándar % de Deleción
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

La Tabla 11 muestra el promedio y la desviación estándar para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNdg de *TTR* de prueba específicos de cyno electroporados con proteína Cas9 Spy (RNP) en hepatocitos primarios de cyno.

Tabla 11: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios de cyno electroporados con proteína Cas9 Spy y ARNdg específicos de cyno

ID DE GUÍA	Promedio % de Edición	Desviación estándar % de Edición	Promedio % de Inserción	Desviación estándar % de Inserción	Promedio % de Deleción	Desviación estándar % de Deleción
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

Ejemplo 3. Selección de secuencias de ARNsg

Selección cruzada de los ARNsg de TTR en múltiples tipos de células

Los guías en formato de ARNsg modificado dirigidos a *TTR* humana y/o de cyno se suministraron a hepatocitos primarios humanos y a hepatocitos primarios de cyno como se describe en el Ejemplo 1. El porcentaje de edición se determinó para los ARNcr que comprenden cada secuencia de guía a través de cada tipo de célula y las secuencias de guía se ordenaron según el % de edición más alto. Los datos de selección para las secuencias de guía en la Tabla 2 en ambas líneas celulares se enumeran a continuación (Tabla 12 a 15).

La Tabla 12 muestra el promedio y la desviación estándar para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNsg de *TTR* de prueba transfectados con la proteína Cas9 Spy (RNP) en hepatocitos primarios humanos.

Tabla 12: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios humanos transfectados con proteína Cas9 Spy y ARNsg

ID DE GUÍA	Promedio % de Edición	Desviación estándar % de Edición	Promedio % de Inserción	Desviación estándar % de Inserción	Promedio % de Deleción	Desviación estándar % de Deleción
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

La Tabla 13 muestra el promedio y la desviación estándar a 12.5 nM para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNsg de *TTR* de prueba cotransfectados con ARNm de Cas9 Spy (SEQ ID NO: 2) en hepatocitos primarios humanos.

Tabla 13: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios humanos transfectados con ARNsg y ARNm de Cas9 Spy

ID DE GUÍA	Promedio % de Edición	Desviación estándar % de Edición	Promedio % de Inserción	Desviación estándar % de Inserción	Promedio % de Deleción	Desviación estándar % de Deleción
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

La Tabla 14 muestra el promedio y la desviación estándar para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNsg de *TTR* de prueba electroporados con proteína Cas9 Spy (RNP) en hepatocitos primarios de cyno. Tenga en cuenta que los guías G000480 y G000488 tienen una incompatibilidad a cyno, lo que puede comprometer su eficiencia de edición en las células de cyno.

Tabla 14: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios de cyno electroporados con proteína Cas9 Spy y ARNsg

ID DE GUÍA	Promedio % de Edición	Desviación estándar % de Edición	Promedio % de Inserción	Desviación estándar % de Inserción	Promedio % de Deleción	Desviación estándar % de Deleción
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

La Tabla 15 muestra el promedio y la desviación estándar para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNsg de *TTR* de prueba específicos de cyno electroporados con proteína Cas9 Spy (RNP) en hepatocitos primarios de cyno.

Tabla 15: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios de cyno electroporados con proteína Cas9 Spy y ARNsg específicos de cyno (por ejemplo, aquellos que tienen un ARNg humano análogo, véase Tabla 3)

ID DE GUÍA	Promedio % de Edición	Desviación estándar % de Edición	Promedio % de Inserción	Desviación estándar % de Inserción	Promedio % de Deleción	Desviación estándar % de Deleción
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

Ejemplo 4. Selección de las formulaciones de nanopartículas lipídicas (LNP) que contienen ARNm de Ca9 Spy y ARNsg

Selección cruzada de LNP formuladas con ARNsg de TTR con ARNm de Cas9 Spy en hepatocitos primarios humanos y hepatocitos primarios de cyno.

Las formulaciones de nanopartículas lipídicas de ARNsg modificados dirigidos a TTR humana y las secuencias de ARNsg compatibles se probaron en hepatocitos primarios humanos y hepatocitos primarios de cyno en una curva de respuesta a la dosis. Los hepatocitos humanos y de cyno se sembraron en placa como se describe en el Ejemplo 1. Ambas líneas celulares se incubaron a 37 °C, en CO_2 al 5 % durante 24 horas antes del tratamiento con las LNPs. Las LNPs usadas en los experimentos detallados en las Tablas 16-19 se prepararon mediante el uso del procedimiento Nanoassemblr™, cada una contiene ARNsg especificado y ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 2), cada uno con lípidos. Las LNPs contenían lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar de 45:44:9:2, respectivamente, y tenían una relación N:P de 4.5. Las LNPs se incubaron en medio de mantenimiento de hepatocitos que contenían 6 % de suero de cyno a 37 °C durante 5

minutos. Después de la incubación, las LNPs se añadieron a los hepatocitos primarios humanos o de cyno en una curva de respuesta a la dosis de 8 puntos 2 veces comenzando en 100 ng de ARNm. Las células se lisaron 72 horas después del tratamiento para el análisis de NGS como se describe en el Ejemplo 1. El porcentaje de edición se determinó para los ARNcr que comprenden cada secuencia de guía a través de cada tipo de célula y las secuencias de guía se ordenaron según el porcentaje de edición más alto a 12.5 ng de entrada de ARNm y 3.9 nM de concentración de guía. Los datos de la curva de respuesta a la dosis para las secuencias de guía en ambas líneas celulares se muestran en las Figuras de 4 a 7. El % de edición a 12.5 ng de entrada de ARNm y 3.9 nM de concentración de guía se enumeran a continuación (Tabla 16 a 18).

La Tabla 16 muestra el promedio y la desviación estándar a 12.5 ng de ARNm de Cas9 para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNsg de *TTR* de prueba formulados en nanopartículas lipídicas con ARNm de Cas9 Spy en hepatocitos primarios humanos como curvas de respuesta a la dosis. G000570 exhibió una curva de respuesta a la dosis poco característica en comparación con los otros ARNsg que puede ser un objeto del experimento. Los resultados se muestran de manera gráfica en la Figura 4.

Tabla 16: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios humanos tratados con LNP formuladas con ARNm de Cas9 Spy (SEQ ID NO: 2) y ARNsg

ID DE GUÍA	12.5 ng de ARNm, 3.9 nM de ARNsg, Promedio % de Edición	Desviación estándar % de Edición
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

La Tabla 17 muestra el promedio y la desviación estándar a 12.5 ng de ARNm y 3.9 nM de concentración de guía para % de edición, % de inserción (Ins) y % de deleción (Del) para los ARNsg de *TTR* de prueba formulados en nanopartículas lipídicas con ARNm de Cas9 Spy en hepatocitos primarios de cyno como curvas de respuesta a la dosis. Los resultados se muestran de manera gráfica en la Figura 5.

Tabla 17: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios de cyno tratados con LNP formuladas con ARNm de Cas9 Spy (SEQ ID NO: 2) y ARNsg

ID DE GUÍA	12.5 ng de ARNm, 3.9 nM de ARNsg, Promedio % de Edición	Desviación estándar % de Edición
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

La Tabla 18 muestra el promedio y la desviación estándar a 12.5 ng de ARNm y 3.9 nM de concentración de guía para % de deleción (Del) para los ARNsg de *TTR* de prueba específicos de cyno formulados en nanopartículas lipídicas con ARNm de Cas9 Spy en hepatocitos primarios de cyno como curvas de respuesta a la dosis. Los resultados se muestran de manera gráfica en la Figura 6.

Tabla 18: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios de cyno tratados con LNP formuladas con ARNm de Cas9 Spy (SEQ ID NO: 2) y ARNsg compatibles de cyno

ID DE GUÍA	12.5 ng de ARNm, 3.9 nM de ARNsg, % Edición	Desviación estándar % de Edición
G000502	80.70	0.14
G000506	60.13	0.70

G000509	74.47	7.28
G000510	61.87	2.54

Selección cruzada de LNP formuladas con ARNsg de TTR con ARNm de Cas9 Spy en hepatocitos primarios humanos y hepatocitos primarios de cyno

Las formulaciones de nanopartículas lipídicas de ARNsg modificados dirigidos a TTR humana y las secuencias de ARNsg compatibles se probaron en hepatocitos primarios humanos y hepatocitos primarios de cyno en una curva de respuesta a la dosis. Los hepatocitos humanos y de cyno se sembraron en placa como se describe en el Ejemplo 1. Ambas líneas celulares se incubaron a 37 °C, en CO_2 al 5 % durante 24 horas antes del tratamiento con las LNPs. Las LNPs usadas en los experimentos detallados en las Tablas 20-22 se prepararon mediante el uso del procedimiento del flujo cruzado descrito anteriormente pero purificado mediante el uso de columnas PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) y concentrado mediante el uso de unidades de filtro centrífugo Amicon (Millipore Sigma), cada una de las cuales contiene el ARNsg específico y el ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 1). Las LNPs contenían lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar de 50:38:9:3, respectivamente, y tenían una relación N:P de 6.0. Las LNPs se incubaron en medio de mantenimiento de hepatocitos que contenían suero de cyno al 6 % a 37 °C, CO_2 al 5 % durante 5 minutos. Después de la incubación, las LNPs se añadieron a los hepatocitos primarios humanos o de cyno en una curva de respuesta a la dosis de 8 puntos 3 veces comenzando en 300 ng de ARNm. Las células se lisaron 72 horas después del tratamiento para el análisis de NGS como se describe en el Ejemplo 1. El porcentaje de edición se determinó para los ARNcr que comprenden cada secuencia de guía en cada tipo de célula y las secuencias de guía se ordenaron según los valores de EC50 y el porcentaje de edición máximo. Los datos de la curva de respuesta a la dosis para las secuencias de guía en ambas líneas celulares se muestran en las Figuras de 4 a 7. Los valores de EC50 y el porcentaje de edición máximo se enumeran a continuación (Tabla 19 a 22).

La Tabla 19 muestra la EC50 y la edición máxima de los ARNsg de *TTR* de prueba específicos de humano formulados en nanopartículas lipídicas con ARNm de Cas9 Spy empobrecido en U en hepatocitos primarios humanos como curvas de respuesta a la dosis. Los resultados se muestran de manera gráfica en la Figura 4.

Tabla 19: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios humanos tratados con LNP formulada con ARNm de Cas9 Spy y ARNsg específicos de humanos

ID DE GUÍA	EC50	Edición máxima
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

La Tabla 20 muestra la EC50 y la edición máxima de los ARNsg de *TTR* de prueba específicos de humanos formulados en nanopartículas lipídicas con ARNm de Cas9 Spy empobrecido en U en hepatocitos primarios de cyno como curvas de respuesta a la dosis. Los resultados se muestran de manera gráfica en la Figura. 16.

Tabla 20: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios de cyno tratados con LNP formuladas con ARNm de Cas9 Spy y ARNsg específicos de humanos

ID DE GUÍA	EC50	Edición 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

La Tabla 21 muestra el EC50 y la edición máxima de los ARNsg de *TTR* de prueba compatibles de cyno formulados en nanopartículas lipídicas con ARNm de Cas9 Spy empobrecido en U en hepatocitos primarios humanos como curvas de respuesta a la dosis. Los resultados se muestran de manera gráfica en la Figura 17.

Tabla 21: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios humanos tratados LNP formuladas con ARNm de Cas9 Spy y ARNsg específicos de cyno

ID DE GUÍA	EC50	Edición máxima
G000502	0.70	91.50
G000504	5.16	7.16

G000505	3.57	13.48
G000506	1.26	89.49

La Tabla 22 muestra el EC50 y la edición máxima de los ARNsg de *TTR* de prueba compatibles de cyno formulados en nanopartículas lipídicas con ARNm de Cas9 Spy empobrecido en U en hepatocitos primarios de cyno como curvas de respuesta a la dosis. Los resultados se muestran de manera gráfica en la Figura. 18.

Tabla 22: Datos de la edición de TTR en hepatocitos primarios de cyno tratados LNP formuladas con ARNm de Cas9 Spy y ARNsg específicos de cyno

ID DE GUÍA	EC50	Edición máxima
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

Ejemplo 5. Análisis fuera de la diana de los ARNdg y los ARNsg de TTR

Análisis fuera de la diana de los guías de TTR

Se usó un ensayo basado en la inserción de oligo (véase, por ejemplo, Tsai y otros, Nature Biotechnology 33, 187–197; 2015) para determinar los posibles sitios genómicos fuera de la diana escindidos por la Cas9 dirigida a *TTR*. Cuarenta y cinco ARNdg de la Tabla 1 (y dos guías de control con perfiles conocidos fuera de la diana) se seleccionaron en las células HEK293_Cas9. La línea celular de adenocarcinoma de riñón embrionario humano HEK293 que expresa constitutivamente Cas9 Spy ("HEK293_Cas9") se cultivó en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % y 500 µg/ml de G418. Las células se colocaron a una densidad de 30,000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos 24 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, Cat. 13778150) según el protocolo del fabricante. Las células se transfectaron con un lipoplex que contenía ARNcr individual (15 nM), ARNtr (15 nM) y oligo donante con (10 nM) Lipofectamine RNAiMAX (0.3 µl/pocillo) y OptiMem. Las células se lisaron 24 horas después de la transfección y el ADN genómico se extrajo mediante el uso del kit Zymo's Quick gDNA 96 Extraction (catálogo # D3012) siguiendo el

protocolo recomendado por el fabricante. El ADNg se cuantificó mediante el uso del kit Qubit High Sensitivity dsDNA (Life Technologies). Las bibliotecas se prepararon según el método descrito anteriormente en Tsai y otros, 2015, con modificaciones menores. La secuenciación se realizó en Illumina's MiSeq y HiSeq 2500. El ensayo identificó sitios fuera de la diana potenciales para algunos de los ARNcr que se representan en la Figura 2.

La Tabla 23 muestra el número de sitios de integración fuera de la diana detectados en células HekCas9 transfectadas con ARNdg de *TTR* junto con una secuencia donante de oligo de ADN bicatenario.

Tabla 23: Número de sitios de integración fuera de la diana detectados para ARNdg de TTR mediante un ensayo basado en la inserción de oligo

ID DE GUÍA	# Sitios
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

Además, se evaluó un subconjunto de guías para determinar el potencial fuera de la diana como ARNsg modificados en las células Hek_Cas9 a través del método de inserción basado en oligo descrito anteriormente. Los resultados fuera de la diana se representaron en la Figura 4.

La Tabla 24 muestra el número de sitios de integración fuera de la diana detectados en células HekCas9 transfectadas con ARNsg de *TTR* junto con una secuencia donante de oligo de ADN bicatenario.

Tabla 24: Número de sitios de integración fuera de la diana detectados para los ARNsg de TTR mediante un método de detección de inserción

ID DE GUÍA	# Sitios
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

Ejemplo 6. Secuenciación dirigida para validar posibles sitios fuera de la diana

Las células HEK293_Cas9 usadas en el Ejemplo 5 para detectar los sitios fuera de la diana potenciales sobreexpresan constitutivamente Cas9, lo que lleva a un mayor número de "resultados" potenciales fuera de la diana en comparación con un paradigma de suministro transitorio en varios tipos de células. Además, cuando se suministran los ARNsg (a diferencia de los ARNdg), el número de posibles resultados fuera de la diana puede aumentarse aún más ya que las moléculas de ARNsg son más estables que los ARNdg (especialmente cuando se modifican químicamente). Por consiguiente, los sitios fuera de la diana potenciales identificados por un método de inserción de oligo, tal como se usa en el Ejemplo 5, pueden validarse mediante el uso de la secuenciación dirigida de los sitios fuera de la diana potenciales identificados.

En un enfoque, los hepatocitos primarios se tratan con LNPs que comprenden ARNm de Cas9 y un ARNsg de interés (por ejemplo, un ARNsg que tiene sitios fuera de la diana potenciales para la evaluación). Luego se lisan los hepatocitos primarios y se usan cebadores que flanquean los sitios fuera de la diana potenciales para generar un amplicón para el análisis de NGS. La identificación de indeles en cierto nivel puede validar el sitio fuera de la diana potencial, mientras que la falta de indeles encontrados en el sitio fuera de la diana potencial puede indicar un falso positivo en el ensayo de las células HEK293_Cas9.

Ejemplo 7. Análisis fenotípico

Análisis de electrotransferencia de la TTR secretada

La línea celular de carcinoma hepatocelular, HepG2, se transfectó como se describe en el Ejemplo 1 con guías seleccionados de la Tabla 1 por triplicado. Dos días después de la transfección, se cultivó una réplica para el ADN genómico y el análisis mediante secuenciación NGS para la eficiencia de edición. Cinco días después de la transfección, el medio sin suero se reemplazó en una réplica. Después de 4 horas, el medio se cultivó para el análisis de la TTR secretada por electrotransferencia como se describió previamente. Los datos para el % de edición para cada guía y la reducción de la *TTR* extracelular se proporciona en la Figura 7.

Análisis de electrotransferencia de la TTR intracelular

La línea celular de carcinoma hepatocelular, HUH7, se transfectó como se describe en el Ejemplo 1 con ARNcr que comprende los guías de la Tabla 1. Los grupos de células transfectadas se retuvieron en cultivo de tejidos y se pasaron para su posterior análisis. A los siete días después de la transfección, las células se cultivaron y los extractos de células enteras (WCEs) se prepararon y se sometieron a análisis por electrotransferencia como se describió previamente.

Los WCEs se analizaron por electrotransferencia para la reducción de la proteína *TTR*. La proteína *TTR* de longitud total tiene un peso molecular previsto de ~16 kD. Se observó una banda a este peso molecular en los carriles de control en la electrotransferencia.

Se calculó el porcentaje de reducción de la proteína *TTR* mediante el uso del programa Licor Odyssey Image Studio Ver 5.2. Se usó GAPDH como control de carga y se sondeó simultáneamente con la *TTR*. Se calculó una relación para los valores de densitometría para GAPDH dentro de cada muestra en comparación con la región total que abarca la banda de la *TTR*. Se determinó el porcentaje de reducción de la proteína *TTR* después de que las relaciones se normalizaron para los carriles de control. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 8. Suministro de LNP a ratones TTR humanizados y ratones que tienen TTR (murina) wt.

Se dosificaron los ratones humanizados con respecto al gen *TTR* con formulaciones de LNP 701-704 que contenían los guías indicados en la Tabla 25 (5 ratones por formulación). Estos ratones *TTR* humanizados se diseñaron de tal manera que una región del locus *TTR* murino endógeno se eliminó y se reemplazó con una secuencia *TTR* ortóloga para que el locus codifique una proteína TTR humana. A modo de comparación, 6 ratones con *TTR* murina se dosificaron con LNP700, que contiene un guía (G000282) dirigido a *TTR* murina. Las LNPs con los números de formulación 1-5 en la Tabla 25 se prepararon mediante el uso del procedimiento Nanoassemblr™ como se describió anteriormente, mientras que las LNPs con los números de formulación 6-16 se prepararon mediante el uso del procedimiento de flujo cruzado descrito anteriormente, pero se purificaron mediante el uso de columnas PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) y se concentraron mediante el uso de unidades de filtro centrífugo Amicon (Millipore Sigma). Como controles negativos, los ratones del genotipo correspondiente se dosificaron con vehículo solo (amortiguador de tris-solución salina-sacarosa (TSS)). El fondo de los ratones *TTR* humanizados que recibieron las LNPs con los números de formulación 2-5 en la Tabla 25 fueron 50 % 129S6/SvEvTac 50 % C57BL/6NTac; el fondo de los ratones *TTR* humanizados que recibieron las LNPs que tenían los números de formulación 6-16 en la Tabla 25, así como también los ratones con *TTR* murina (administrados con LNP700, Formulación número 1) fue 75 % C57BL/6NTac 25 % 129S6/SvEvTac.

Tabla 25. Formulaciones de LNP para la dosificación de ratones *TTR* humanizados.

Número de formulación	LNP	Guía	Concentración de ARN (mg/ml)	Relación N:P	Relaciones molares (lípido A, colesterol, DSPC y 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

Las LNPs que tenían los números de formulación 1-5 contenían ARNm de Cas9 de la SEQ ID NO: 2 y las LNPs que tenían los números de formulación 6-16 contenían el ARNm de Cas9 de la SEQ ID NO: 1, todo en una relación 1:1 en peso respecto al guía. Las LNPs contenían lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en las relaciones molares mencionadas en la Tabla 25, respectivamente. La dosificación con LNPs con números de formulación 1-5 fue de 2 mg/kg (contenido total de ARN) y la dosificación con LNPs con números de formulación 6-16 fue de 1 mg/kg (contenido total de ARN). Los resultados de la edición en el hígado se determinaron mediante el uso de cebadores diseñados para amplificar la región de interés para el análisis NGS. Los resultados de la edición en el hígado para los números de formulación 1-5 se muestran en la Figura 9 e indican la edición de la secuencia *TTR* humana con cada una de los cuatro guías

probados a un nivel >35 % de edición (valores medios) con G000494 y G000499 proporcionando valores cercanos al 60 %. Los resultados de la edición en el hígado para los números de formulación 6-8, 10-13 y 15-16 se muestran en la Figura 13 y la Tabla 26, que muestran una edición eficiente de la secuencia *TTR* humana con cada una de las formulaciones probadas. Se observó una edición superior al 38 % para todas las formulaciones, con varias formulaciones que proporcionan valores de edición superiores al 60 %. Las formulaciones 9 y 14 no se muestran debido al diseño del amplicón de PCR y al bajo número resultante de lecturas de secuenciación.

El nivel de la TTR humana en suero se midió en los ratones con los números de formulación 6-8, 10-13 y 15-16. *Véase la* Figura 14B. La Figura 14A es una repetición de la Figura 13 proporcionada con fines de comparación. Se detectó la disminución de la TTR humana en suero para cada formulación probada, lo que se correlacionó con la cantidad de edición detectada en el hígado (véase Figura 14A frente a 14B, Tabla 26).

Tabla 26

ID DE GUÍA	**% Edición**	**TTR en suero (% TSS)**
TSS (vehículo)	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

En otro conjunto de experimentos, los ratones TTR humanizados se dosificaron con formulaciones de LNP en un intervalo de dosis con los guías G000480, G000488, G000489 y G000502. Las formulaciones contenían ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 1) en una relación 1:1 en peso respecto al guía. Las LNPs contenían lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar de 50:38:9:3, respectivamente, y con una relación de N:P de 6. La dosis fue de 1, 0.3, 0.1 o 0.03 mg/kg (n=5/grupo). Las LNPs se prepararon mediante el uso del procedimiento de flujo cruzado descrito anteriormente y se purificaron y se concentraron mediante el uso de columnas PD-10 y unidades de filtro centrífugo Amicon, respectivamente. Los resultados de la edición en el hígado se determinaron mediante el uso de cebadores diseñados para amplificar la región de interés para el análisis NGS y se midieron los niveles de la TTR humana en suero como se describió anteriormente. Los resultados para la edición en el hígado se muestran en la Figura 26A y los niveles de la TTR humana en suero en la Figura 26B-C. Fue evidente una respuesta a la dosis tanto para la edición como para los niveles de la TTR en suero.

En otro conjunto de experimentos, los ratones TTR humanizados se dosificaron con formulaciones de LNP en un intervalo de dosis con los guías G000481, G000482, G000486 y G000499. Las formulaciones contenían ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 1) en una relación 1:1 en peso respecto al guía. Las LNPs contenían lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar 50:38:9:3, respectivamente, y tenían una relación N:P de 6. La dosis fue de 1, 0.3 o 0.1 mg/kg (n=5/grupo). Las LNPs se prepararon mediante el uso del procedimiento de flujo cruzado descrito anteriormente y se purificaron y se concentraron mediante el uso de columnas PD-10 y unidades de filtro centrífugo Amicon, respectivamente. Los resultados de la edición en el hígado se determinaron mediante el uso de cebadores diseñados para amplificar la región de interés para el análisis NGS y se midieron los niveles de la TTR humana en suero como se describió anteriormente. Los resultados para la edición en el hígado se muestran en la Figura 27A y los

niveles de la TTR humana en suero en la Figura 27B-C. Fue evidente una respuesta a la dosis tanto para la edición como para los niveles de la TTR en suero.

En otro conjunto de experimentos, los ratones TTR humanizados se dosificaron con formulaciones de LNP en un intervalo de dosis con los guías G000480, G000481, G000486, G000499 y G000502. Las formulaciones contenían ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 1) en una relación 1:2 en peso respecto al guía. Las LNPs contenían lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar 50:38:9:3, respectivamente, y tenían una relación N:P de 6. La dosis fue de 1, 0.3 o 0.1 mg/kg (n=5/grupo). Las LNPs se prepararon mediante el uso del procedimiento de flujo cruzado descrito anteriormente y se purificaron y se concentraron mediante el uso de columnas PD-10 y unidades de filtro centrífugo Amicon, respectivamente. Los resultados de la edición en el hígado se determinaron mediante el uso de cebadores diseñados para amplificar la región de interés para el análisis NGS y se midieron los niveles de la TTR humana en suero como se describió anteriormente. Los resultados para la edición en el hígado se muestran en la Figura 28A y los niveles de la TTR humana en suero en la Figura 28B-C. Fue evidente una respuesta a la dosis tanto para la edición como para los niveles de la TTR en suero.

En experimentos separados que usan ratones CD-1 de tipo salvaje, una formulación de LNP que comprende el guía G000502, que es homólogo cruzado entre ratón y cyno, se probó en un estudio de respuesta a la dosis. La formulación contenía ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 1) en una relación 1:1 en peso con respecto al guía. La LNP contenía lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar 45:44:9:2, respectivamente, y que tenía una relación N:P de 6. La dosis fue a 1, 0.3, 0.1, 0.03 o 0.01 mg/kg (n=5/grupo). Los resultados de la edición en el hígado se determinaron mediante el uso de cebadores diseñados para amplificar la región de interés para el análisis NGS. Los resultados para la edición en el hígado se muestran en la Figura 15A y los niveles de la TTR de ratón en suero en la Figura 15B. Fue evidente una respuesta a la dosis tanto para la edición como para los niveles de la TTR en suero.

Ejemplo 9. Suministro de LNP a ratones en dosis múltiples

Los ratones (hembras del Charles River Laboratory, de aproximadamente 6-7 semanas de edad) se dosificaron con una formulación de LNP LNP705, preparada mediante el uso de procedimientos de flujo cruzado y TFF como se describió anteriormente que contiene G000282 (“G282”) y ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 2) en una relación 1:1 en peso y una concentración total de ARN de 0.5 mg/ml. La LNP tenía una relación N:P de 4.5 y contenía lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar de 45:44:9:2, respectivamente. Los grupos se dosificaron una vez por semana

hasta una, dos, tres o cuatro semanas (QWx1-4) o una vez al mes hasta dos o tres meses (QMx2-3). Las dosis fueron de 0.5 mg/kg o 1 mg/kg (contenido total de ARN). Los grupos de control recibieron una dosis única en el día 1 de 0.5, 1 o 2 mg/kg. Cada grupo contenía 5 ratones. La TTR en suero se analizó mediante ELISA y en la necropsia se recogieron el hígado, el bazo y el músculo para el análisis de edición NGS. Los datos se muestran en la Tabla 27. X = sacrificio y necropsia. MPK = mg/kg.

Tabla 27. Grupos de estudio

Grupo	**Duración/ Régimen de Dosis**	**Dosis (MPK)**	**Dosis total (MPK) dada**	**Dosis Día 1**	**Dosis Día 8**	**Dosis Día 15**	**Dosis Día 22**	**NX Día 28**	**Dosis Día 43**	**NX Día 49**
1	4 semanas de dosis múltiple/ QWx4	0 (control de TSS)	0	X	X	X	X	X		
2	2 meses de dosis múltiple/ QMx3	1	3	X			X		X	X
3		0.5	1.5	X			X		X	X
4	1 mes de dosis múltiple/ QMx2	1	2	X			X	X		
5		0.5	1	X			X	X		
6	4 semanas de dosis múltiple/ QWx4	1	4	X	X	X	X	X		
7		0.5	2	X	X	X	X	X		
8	3 semanas de dosis múltiple/ QWx3	1	3		X	X	X	X		
9		0.5	1.5		X	X	X	X		

10	2 semanas de dosis múltiple/ QWx2	1	2			X	X	X		
11		0.5	1			X	X	X		
12	Dosis única/ QWx1	1	1				X	X		
13		0.5	0.5				X	X		
14		2	2				Día 26	Día 32		

La Tabla 28 y las Figuras 10A-11B muestran los resultados del nivel de la TTR en suero (% KD =% de disminución). La Tabla 29 y las Figuras 12A-C muestran los resultados de la edición en el hígado.

Tabla 28. Resultados de la TTR en suero.

Régimen de tiempo	Dosis	TTR en suero (µg/ml)	TTR en suero (% 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

Tabla 29. Resultados de la edición en el hígado.

Régimen de tiempo	Dosis	Edición en el hígado (%)
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

Los resultados muestran que es posible desarrollar un efecto y dosis acumulativa con múltiples administraciones a lo largo del tiempo, incluso a intervalos semanales o mensuales, para lograr niveles de edición crecientes y % de KD de TTR.

Ejemplo 10. Carga de ARN: diferentes relaciones de ARNm y ARNg

Este estudio evaluó la eficacia in vivo en ratones de diferentes relaciones de ARNg a ARNm. El ARNm de Cas9 con CleanCap ™ con el ORF de la SEQ ID NO: 4, HSD 5' UTR, albúmina humana 3' UTR, una secuencia de Kozak y una cola poli-A se realizaron mediante síntesis IVT como se indicó en el Ejemplo 1 con N1-metilpseudouridina trifosfato en lugar de trifosfato de uridina.

Formulaciones de LNP preparadas a partir del ARNm descrito y G282 (SEQ ID NO: 124) como se describe en el Ejemplo 1 con lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar 50:38:9:3 y con una relación N:P de 6. Las relaciones en peso de ARNg:ARNm de Cas9 de las formulaciones fueron como se muestran en las Figuras 19A y 19B.

Para la caracterización in vivo, las LNPs se administraron a ratones con 0.1 mg de ARN total (mg de ARN de guía + mg de ARNm) por kg (n=5 por grupo). A los 7-9 días después de la dosis, se sacrificaron los animales, se recogió la sangre y el hígado, y se midieron la TTR en suero y la edición en el hígado como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados de la TTR en suero y la edición en el hígado se muestran en las Figuras 19A y 19B. Los ratones de control negativo se dosificaron con vehículo TSS.

Además, las LNPs anteriores se administraron a los ratones a una dosis constante de ARNm de 0.05 mg de ARNm por kg (n=5 por grupo), mientras se variaba la dosis de ARNg de 0.06 mg por kg a 0.4 mg por kg. A los 7-9 días después de la dosis, se sacrificaron los animales, se recogió la sangre y el hígado, y se midieron la TTR en suero y la edición en el hígado. Los resultados de la TTR en suero y de la edición en el hígado se muestran en la Figura 19C y la Figura 19D. Los ratones de control negativo se dosificaron con vehículo TSS.

Ejemplo 11. Análisis fuera de la diana de los ARNsg de TTR en hepatocitos primarios humanos

El análisis fuera de la diana de los ARNsg dirigidos a TTR se realizó en hepatocitos primarios humanos (PHH) como se describe en el Ejemplo 5, con las siguientes modificaciones. Los PHH se colocaron en placas a una densidad de 33,000 células por pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas de colágeno como se describe en el Ejemplo 1. Veinticuatro horas después del recubrimiento, las células se lavaron con medio y se transfectaron mediante el uso de Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, Cat. 13778150) como se describe en el Ejemplo 1. Las células se transfectaron con un lipoplex que contenía 100 ng de ARNm de Cas9, seguido inmediatamente por la adición de otro lipoplex que contenía 25 nM de ARNsg y 12.5 nM del oligo

donante (0.3 µl/pocillo). Las células se lisaron 48 horas después de la transfección y se extrajo el ADNg y se analizó como se describe adicionalmente en el Ejemplo 5. Los datos se representan gráficamente en la Figura 20.

La Tabla 30 muestra el número de sitios de integración fuera de la diana detectados en PHH, y se compara con el número de sitios que se detectaron en las células HekCas9 usadas en el Ejemplo 5. Se detectaron menos sitios en los PHH para cada guía probado en comparación con la línea celular HekCas9, sin sitios únicos detectados en PHH solo.

Tabla 30. Número de sitios de integración fuera de la diana detectados para los ARNsg de TTR en PHH mediante un ensayo basado en inserción de oligo

ID DE GUÍA	**# Sitios en PHH**	**# Sitios en células HekCas9 (Ejemplo 5)**
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

Después de la identificación de los sitios fuera de la diana potenciales en PHH a través del ensayo de inserción de oligo, ciertos sitios potenciales se evaluaron adicionalmente mediante secuenciación de amplicón dirigido, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 6. Además de los posibles sitios fuera de la diana identificados por la estrategia de inserción del oligo, otros sitios fuera de la diana potenciales identificados por predicción *in silico* se incluyeron en el análisis.

Con este fin, los PHH se trataron con LNPs que comprenden 100 ng de ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 1) y el ARNg de interés a 14.68 nM (en una relación 1:1 en peso), como se describe en el Ejemplo 4. Las LNPs se prepararon mediante el uso del procedimiento de flujo cruzado descrito anteriormente y se purificaron y se concentraron mediante el uso de columnas PD-10 y unidades de filtro centrífugo Amicon, respectivamente. Las LNPs se formularon con una relación N:P de 6.0 y contenían lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar 50:38:9:2, respectivamente. Después del tratamiento con LNP, el ADN genómico aislado se analizó por NGS (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 1 y 6) para determinar si se podían detectar los indeles en el sitio fuera de la diana potencial, lo que sería indicativo de un evento de escisión mediado por Cas9. Las Tablas 31 y 32 muestran los posibles sitios fuera de la diana que se evaluaron para los ARNg G000480 y G000486, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 21A-B y 22A-B y la Tabla 33 a continuación, se detectaron los indeles a niveles bajos solo para dos de los sitios fuera de la diana potenciales identificados por el ensayo de inserción de oligo para G000480, y solo uno para G000486. No se detectaron indeles en ninguno de los sitios que se predijeron *in silico* para cualquiera de los guías. Además, los indeles solo se detectaron en estos sitios mediante el uso de una dosis casi saturante de LNP, ya que las tasas de indeles observadas en los sitios en la diana para G000480 y G000486 fueron ~97 % y ~91 %, respectivamente (véase Tabla 33). Las coordenadas genómicas de estos sitios también se informan en las Tablas 31 y 32, y cada una corresponde a secuencias que no codifican ninguna proteína.

Luego se realizó un ensayo de respuesta a la dosis para determinar la dosis más alta de LNP en la que no se detectaron fuera de la diana. Los PHH se trataron con LNPs que comprenden G000480 o G000486 como se describe en el Ejemplo 4. Las dosis variaron en 11 puntos con respecto a la concentración de ARNg (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 y 46.55 nM). Como se representa por la línea vertical discontinua en las Figuras 21A-B y 22A-B, las concentraciones más altas (con respecto a la concentración de

ARNg) en las que los sitios fuera de la diana potenciales ya no se detectaron para G000480 y G000486 fueron 0.57 nM y 15.51 nM, respectivamente, lo que resultó en tasas de indel en la diana de 84.60 % y 89.50 %, respectivamente.

Tabla 31. Sitios fuera de la diana potenciales identificados mediante detección de inserción y predicción in silico para G000480 evaluado mediante secuenciación de amplicones dirigidos

ID DE GUÍA	**ID de sitio fuera de la diana (OT)**	**Ensayo usado**	**Coordenadas cromosómicas (hg38)**	**Cadena**
G000480	INS-OT.1	Detección de inserción	chr7:94767406-94767426	+
G000480	INS-OT.2	Detección de inserción	chr2:192658562-192658582	+
G000480	INS-OT.3	Detección de inserción	chr7:4834390-4834410	+
G000480	INS-OT.4	Detección de inserción	chr20:9216118-9216138	-
G000480	INS-OT.5	Detección de inserción	chr10:12547071-12547091	+
G000480	INS-OT.6	Detección de inserción	chr6:168377978-168377998	-
G000480	INS-OT.7	Detección de inserción	chr12:114144669-114144689	-
G000480	INS-OT.8	Detección de inserción	chr10:7376755-7376775	+
G000480	INS-OT.9	Detección de inserción	chr2:52950299-52950319	+
G000480	INS-OT.10	Detección de inserción	chr8:56579165-56579185	-
G000480	INS-OT.11	Detección de inserción	chr1:189992255-189992275	+
G000480	PRED-OT.1	*predicción* in silico	chr10:12547071-12547091	+
G000480	PRE-DOT.2	*predicción* in silico	chrX:119702782-119702802	+
G000480	PRED-OT.3	*predicción* in silico	chr1:116544586-116544606	+
G000480	PRED-OT.4	*predicción* in silico	chr6:88282884-88282904	+
G000480	PRED-OT.6	*predicción* in silico	chr5:121891868-121891888	+
G000480	PRED-OT.7	*predicción* in silico	chr3:52544945-52544965	+
G000480	PRED-OT.8	*predicción* in silico	chr15:36949639-36949659	+
G000480	PRED-OT.9	*predicción* in silico	chr5:33866486-33866506	+
G000480	PRED-OT.10	*predicción* in silico	chr5:159755754-159755774	+
G000480	PRED-OT.11	*predicción* in silico	chr5:31349859-31349879	+
G000480	PRED-OT.12	*predicción* in silico	chr11:79485652-79485672	+
G000480	PRED-OT.13	*predicción* in silico	chr15:29448864-29448884	+
G000480	PRED-OT.14	*predicción* in silico	chr5:171153565-171153585	+

G000480	PRED-OT.15	*predicción* in silico	chr9:84855273-84855293	+
G000480	PRED-OT.16	*predicción* in silico	chr6:159953060-159953080	+
G000480	PRED-OT.17	*predicción* in silico	chr16:51849024-51849044	+
G000480	PRED-OT.18	*predicción* in silico	chr3:24108809-24108829	+
G000480	PRED-OT.19	*predicción* in silico	chr18:41118310-41118330	+
G000480	PRED-OT.20	*predicción* in silico	chr10:108975241-108975261	+
G000480	PREDO-T.21	*predicción* in silico	chr1:44683633-44683653	+
G000480	PRED-OT.22	*predicción* in silico	chr2:196214849-196214869	+
G000480	PRED-OT.23	*predicción* in silico	chr9:117353544-117353564	+
G000480	PRED-OT.24	*predicción* in silico	chr1:55583322-55583342	+
G000480	PRED-OT.25	*predicción* in silico	chr12:28246827-28246847	+
G000480	PRED-OT.26	*predicción* in silico	chr4:54545361-54545381	+
G000480	PRED-OT.27	*predicción* in silico	chr13:22364836-22364856	+
G000480	PRED-OT.28	*predicción* in silico	chr13:80816049-80816069	+
G000480	PRED-OT.29	*predicción* in silico	chr7:39078622-39078642	+
G000480	PRED-OT.30	*predicción* in silico	chr2:59944386-59944406	+

"INS-OT.N" se refiere a un ID de sitio fuera de la diana detectado por inserción de oligo, donde N es un número entero especificado anteriormente; "PRED-OT.N" se refiere a una ID de sitio fuera de la diana predicha a través de los métodos *in silico*, donde N es un número entero especificado anteriormente.

Tabla 32. Sitios fuera de la diana potenciales identificados mediante detección de inserción y predicción in silico para G000486 evaluado mediante secuenciación de amplicones dirigidos

ID DE GUÍA	**ID de sitio fuera de la diana (OT)**	**Ensayo usado**	**Coordenadas cromosómicas (hg38)**	**Cadena**
G000486	INS-OT.1	Detección de inserción	chr14:77332157-77332177	+
G000486	INS-OT.2	Detección de inserción	chr14:54672059-54672079	-
G000486	INS-OT.3	Detección de inserción	chr4:108513169-108513189	-
G00048	INS-OT.4	Detección de	chr5:91397023-91397043	-

6		inserción		
G000486	INS-OT.5	Detección de inserción	chr9:116626135-116626155	-
G000486	INS-OT.6	Detección de inserción	chr6:73201226-73201246	+
G000486	INS-OT.7	Detección de inserción	chr16:89368352-89368372	-
G000486	INS-OT.8	Detección de inserción	chr7:56308371-56308391	-
G000486	INS-OT.9	Detección de inserción	chr21:43605667-43605687	+
G000486	INS-OT.10	Detección de inserción	chr5:26758030-26758050	+
G000486	INS-OT.11	Detección de inserción	chr17:30656428-30656448	+
G000486	INS-OT.12	Detección de inserción	chr8:130486452-130486472	+
G000486	PRED-OT.1	*predicción* in silico	chr11:44707064-44707084	+
G000486	PRED-OT.2	*predicción* in silico	chr5:50775396-50775416	+
G000486	PRED-OT.3	*predicción* in silico	chr4:141623949-141623969	+
G000486	PRED-OT.4	*predicción* in silico	chr1:223481186-223481206	+
G000486	PRED-OT.5	*predicción* in silico	chr6:39951487-39951507	+
G000486	PRED-OT.6	*predicción* in silico	chrY:5456047-5456067	+
G000486	PRED-OT.8	*predicción* in silico	chr6:129868719-129868739	+
G00048	PRED-OT.9	*predicción* in	chrX:80450312-80450332	+

6		silico		
G00048 6	PRED-OT.10	*predicción* in silico	chr7:27256771-27256791	+
G00048 6	PRED-OT.11	*predicción* in silico	chr3:181416528-181416548	+
G00048 6	PRED-OT12	*predicción* in silico	chr7:146425020-146425040	+
G00048 6	PRED-OT.13	*predicción* in silico	chr3:16980977-16980997	+
G00048 6	PRED-OT.14	*predicción* in silico	chr7:118161002-118161022	+
G00048 6	PRED-OT.15	*predicción* in silico	chr6:102220539-102220559	+
G00048 6	PRED-OT.16	*predicción* in silico	chr12:127278991-127279011	+
G00048 6	PRED-OT.17	*predicción* in silico	chr2:67686631-67686651	+
G00048 6	PRED-OT.18	*predicción* in silico	chr1:114467665-114467685	+
G00048 6	PRED-OT.19	*predicción* in silico	chr3:194514436-194514456	+
G00048 6	PRED-OT.20	*predicción* in silico	chr14:31767581-31767601	+
G00048 6	PRED-OT.21	*predicción* in silico	chr16:28706209-28706229	+
G00048 6	PRED-OT.22	*predicción* in silico	chr8:110526279-110526299	+
G00048 6	PRED-OT.23	*predicción* in silico	chr19:2899814-2899834	+
G00048 6	PRED-OT.25	*predicción* in silico	chr3:130760261-130760281	+
G00048	PRED-	*predicción* in	chr11:2506046-2506066	+

6	OT.26	silico		
G000486	PRED-OT.27	*predicción* in silico	chr2:153918318-153918338	+
G000486	PRED-OT.28	*predicción* in silico	chr14:40590226-40590246	+
G000486	PRED-OT.29	*predicción* in silico	chr18:806650-806670	+
G000486	PRED-OT.30	*predicción* in silico	chr2:117707480-117707500	+

"INS-OT.N" se refiere a un ID de sitio fuera de la diana detectado por inserción de oligo, donde N es un número entero especificado anteriormente; "PRED-OT.N" se refiere a un ID de sitio fuera de la diana predicho a través de *in silico* métodos, donde N es un entero especificado.

Tabla 33. Sitios fuera de la diana detectados en PHH tratados con LNP que contiene 100 ng de ARNm y 31.03 nM de ARNg

ID DE GUÍA	**ID de sitio fuera de la diana (OT)**	**Tipo de sitio**	**Frecuencia del indel (mediante el uso de LNP con 100 ng de ARNm de Cas9 y 14.68 nM de ARNg)**	**Desviación estándar de frecuencia de indel**
G000480	n/a	En la diana	97.33 %	1.10 %
G000480	INS-OT.2	Fuera de diana	1.43 %	0.40 %
G000480	INS-OT.4	Fuera de diana	0.97 %	0.25 %
G000486	n/a	En la diana	91.33 %	1.97 %
G000486	INS-OT.4	Fuera de diana	0.47 %	0.06 %

Ejemplo 12. Suministro de LNP al modelo de ratón humanizado de la ATTR

En este ejemplo se usó un modelo de ratón transgénico humanizado bien establecido de amiloidosis ATTR hereditaria que expresa la forma mutante patogénica V30M de la proteína TTR

humana. Este modelo de ratón recapitula el fenotipo de depósito de la TTR en los tejidos observados en pacientes con la ATTR, incluso dentro del sistema nervioso periférico y el tracto gastrointestinal (GI) (véase Santos y otros, Neurobiol Aging. 2010 Feb;31(2):280-9).

Los ratones (de aproximadamente 4-5 meses de edad) se dosificaron con las formulaciones de LNP preparadas mediante el uso de los procedimientos de flujo cruzado y TFF como se describe en el Ejemplo 1. Las LNPs se formularon con una relación N:P de 6.0 y contenían lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar 50:38:9:2, respectivamente. Las LNPs contenían ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 1) y G000481 ("G481") o un guía de control no dirigido G000395 ("G395"; SEQ ID NO: 273), en una relación 1:1 de ARNg:ARNm por peso.

Los ratones se inyectaron a través de la vena lateral de la cola como se describe en el Ejemplo 1 con una dosis única de 1 mg/kg (de contenido de ARN total) de LNP con una n=10/grupo. A las 8 semanas después del tratamiento, los ratones se sacrificaron para la recolección de muestras. Los niveles de la proteína TTR humana se midieron en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante ELISA como se describió previamente por Butler y otros, Amyloid. 2016 Jun;23(2):109-18. El tejido hepático se analizó para determinar los niveles de edición como se describe en el Ejemplo 1. Otros tejidos (estómago, colon, nervio ciático, ganglio de la raíz dorsal (DRG)) se recogieron y se procesaron para inmunohistoquímica semicuantitativa como se describió previamente por Gonçalves y otros, Amyloid. 2014 Sep; 21(3): 175–184. El análisis estadístico para los datos de inmunohistoquímica se realizó mediante el uso de la prueba de Mann Whitney con un valor de $p < 0.0001$.

Como se muestra en la Figura 23A-B, se observó una edición robusta (49.4 %) de TTR en los hígados de los ratones humanizados después de la dosis única de LNP que comprende G481, sin que se haya detectado edición en el grupo de control. El análisis de los eventos de edición demostró que el 96.8 % de los eventos fueron inserciones, con el resto deleciones.

Como se muestra en la Figura 24A-B, los niveles de la proteína TTR disminuyeron en plasma pero no en CSF de los ratones tratados, observándose una disminución de más del 99 % de los niveles plasmáticos de la TTR ($p < 0.001$).

La disminución casi completa de la TTR observada en el plasma de los animales tratados se correlacionó con el aclaramiento del depósito de amiloide de la proteína TTR en los tejidos analizados. Como se muestra en la Figura 25, los ratones de control exhibieron tinción amiloide en los tejidos, que se asemeja a la fisiopatología observada en sujetos humanos con la ATTR. La disminución de la TTR circulante mediante la edición del locus HuTTR V30M resultó en una

disminución dramática del depósito de amiloide en los tejidos. Se observó una reducción de aproximadamente el 85 % o mejor en la tinción de la TTR en los tejidos tratados 8 semanas después del tratamiento (Figura 25).

Ejemplo 13. *Disminución del ARNm de TTR* en hepatocitos primarios humanos (PHH)

En un experimento, se cultivaron PHH y se trataron con LNPs que comprenden ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 1) y un ARNg de interés (véase la Figura 29, Tabla 34), como se describe en el Ejemplo 4. Las LNPs se prepararon mediante el uso del procedimiento de flujo cruzado descrito anteriormente y se purificaron y se concentraron mediante el uso de columnas PD-10 y unidades de filtro centrífugo Amicon, respectivamente. Las LNPs se formularon con una relación N:P de 6.0 y contenían lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar 50:38:9:2, respectivamente. Las LNPs comprendían una relación de ARNg:ARNm de 1:2, y las células se trataron a una dosis de 300 ng (con respecto a la cantidad de carga del ARNm suministrado).

Noventa y seis (96) horas después del tratamiento con LNP (con triplicados biológicos para cada condición), el ARNm se purificó de las células PHH mediante el uso del kit Dynabeads mRNA DIRECT (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La transcripción inversa (RT) se realizó con la Maxima reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific) y un cebador poli-dT. El ADNc resultante se purificó con Ampure XP Beads (Agencourt). Para la PCR cuantitativa, el 2 % del ADNc purificado se amplificó con Taqman Fast Advanced Mastermix y 3 conjuntos de sondas Taqman, TTR (ID del ensayo: Hs00174914_m1), GAPDH (ID del ensayo: Hs02786624_g1) y PPIB (ID del ensayo: Hs00168719_m1). Los ensayos se realizaron en QuantStudio 7 Flex Real Time PCR System de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Se calculó la expresión relativa del ARNm de *TTR* mediante la normalización a los controles endógenos (GAPDH y PPIB) individualmente, y luego se promedió.

Como se muestra en la Figura 29 y se reproduce numéricamente en la Tabla 34 a continuación, cada una de las formulaciones de LNP probadas dio como resultado la disminución del ARNm de *TTR*, en comparación con el control negativo (no tratado). Los grupos en la Figura 29 y la Tabla 34 se identifican por la ID del ARNg usado en cada preparación de LNP. La expresión relativa del ARNm de *TTR* se representa en la Figura 29, mientras que el porcentaje de disminución del ARNm de *TTR* se proporciona en la Tabla 34.

Tabla 34.

ID DE GUÍA	Promedio % de	Desviación

	Disminución	estándar
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

En un experimento separado, la disminución del ARNm de *TTR* se evaluó después del tratamiento con LNPs que comprenden G000480, G000486 y G000502. Las LNPs se formularon y los PHH se cultivaron y se trataron con las LNP, cada una como se describe en el experimento anterior en este Ejemplo, con la excepción de que las células se trataron a una dosis de 100 ng (con respecto a la cantidad de carga del ARNm suministrado).

Noventa y seis (96) horas después del tratamiento con LNP (tratamiento único para cada condición), el ARNm se purificó a partir de células PHH mediante el uso del kit Dynabeads mRNA DIRECT (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La transcripción inversa (RT) se realizó con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la PCR cuantitativa, el 2 % del ADNc se amplificó con Taqman Fast Advanced Mastermix y 3 conjuntos de sondas Taqman, TTR (ID del ensayo: Hs00174914_m1), GAPDH (ID del ensayo: Hs02786624_g1) y PPIB (ID del ensayo: Hs00168719_m1). Los ensayos se realizaron en

QuantStudio 7 Flex Real Time PCR System de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Se calculó la expresión relativa del ARNm de *TTR* mediante la normalización a los controles endógenos (GAPDH y PPIB) individualmente, y luego se promedió.

Como se muestra en la Figura 30 y se reproduce numéricamente en la Tabla 35 a continuación, cada una de las formulaciones de LNP probadas dio como resultado la disminución del ARNm de *TTR*, en comparación con el control negativo (no tratado). Los grupos en la Figura 30 y la Tabla 35 se identifican por la ID del ARNg usado en cada preparación de LNP. La expresión relativa del ARNm de *TTR* se representa en la Figura 30, mientras que el porcentaje de disminución del ARNm de *TTR* se proporciona en la Tabla 35.

Tabla 35.

ID DE GUÍA	Promedio % de Disminución	Desviación estándar
G000480	95.61	0.92
G000486	97.36	0.63
G000502	90.94	2.63

Tabla de secuencia

La siguiente tabla de secuencia proporciona un listado de secuencias descritas en la presente descripción. Se entiende que si se hace referencia a una secuencia de ADN (que comprende Ts) con respecto a un ARN, entonces Ts debe reemplazarse con Us (que puede modificarse o no modificarse según el contexto), y viceversa.

Descripción	Secuencia	SEQ ID No.
Transcrito de Cas9 con 5' UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, secuencia de Kozak y 3'	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCAT GGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAG GTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGA ACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAA	1

UTR de ALB	TGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAG AAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGA CACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATAC CACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAA GCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGA TCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGAC ACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGC GACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATAC AACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGG AGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCA AGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCG GGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGC ACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGG ACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAG ATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAA GAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG AGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAA GCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTG ACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGA AAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACG GATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAA GAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATG GACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGA AGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAA GCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCA ATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAG GACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAG AATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACA GCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACA ATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGG AGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACT TCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAG	

	CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAA CTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCG TCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCA AGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGC TTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGA TCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAAC GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTG TTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC ATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCT GAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGC AGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGG AAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGC AAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCT GACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCG GACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTG GCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC AGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAA GACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGA GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCA GAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGA ACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACC TGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTG GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACAT CGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACA ACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAG AGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGA TCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAG AGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCAT CAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGC	

	ACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAG TACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGT CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAA AGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACT ACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCG GAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGC GAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGA AAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGC AACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTT CTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCA GAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGA GAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGT CAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCA AGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAA AGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGC AAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGAT TCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCG CAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAA GCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCA AAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAA GCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAA GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAG GGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTT CCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAA CAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGAT CAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAA ACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGA GACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCA CCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATT CAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACA CAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC	

	CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCT GAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAG AAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAG CATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGA AGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGT GTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTT AATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAA AATGGAAAGAACCTCGAG	
Transcrito de Cas9 que comprende ORF de Cas9 correspondiente a la SEQ ID NO: 205 que usa codones con expresión generalmente alta en humanos	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATGCCTAA GAAAAAGCGGAAGGTCGACGGGGATAAGAAGTACTCAA TCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGTTGGGCAG TGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCA AGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAA AATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACC GCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACG CTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGA GATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTT CTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGA CAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGT CGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCT ACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGG CCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGA TCAAATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGA ACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAAC TGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAAAACCCA ATCAATGCTAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCC GCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATC GCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGG CAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTC AAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAA CTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTG	2

	CTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCCTT GCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGAT ATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTT AGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCA GGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACT GCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAA GAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCC AGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAA AGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAAC AGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACAA CGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCA CGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCCT CAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGT TCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCA ATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAA ACCATCACTCCTTGGAATTTCGAGGAAGTTGTGGATAAG GGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAATGACCAA CTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAA GCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGA ACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGA AGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACAGAAGAAAGCAATT GTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTC AAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTG TTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATT CAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGAT CATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACG AGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTT TCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACC TACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACTC AAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGC AAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAA AACTATCCTGGATTTCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAA TCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGAC	

	CTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGCACAAGTGTCCGGAC AGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCG GTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACTGTGA AGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCAC AAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAA CCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTCCCGCGAAA GGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGC AGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACACGCA GCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAA TGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCA ATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCAC AGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGT TGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAAT GTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTA CTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAG AAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACT CTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCT GGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGA TCTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACG ATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAA AGCAAACTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTT TACAAAGTGAGAGAAATCAACAACTACCATCACGCGCA TGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGAT CAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGG AGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCA AGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAATAC TTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACTGAAA TTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTG ATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGA CAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGCTCTC TATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGC AAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGA GAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGG	

	GACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTC GCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGG AAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGG GGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACC CGATTGATTTCCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGA AGAAGGATCTGATCATCAAACTCCCCAAGTACTCACTGT TCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGG CCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCT AGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACG AAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAG CAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAA ATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATC CTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCGGCCTAC AATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGA GAACATTATCCACTTGTTCACCCTGACTAACCTGGGAGC CCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGATCG CAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGA CCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTA GGATCGATCTGTCGCAGCTGGGTGGCGATTGATAGTCTA GCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAT AAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCT TTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAA AAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGT GCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
secuencia modificada de ARNsg (“N” puede ser cualquier nucleótido natural o no natural)	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	3

secuencia poli-A 30/30/39	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	4
ARNg CR003335 dirigido a TTR humana (Exón 1)	CUGCUCCUCCUCUGCCUUGC	5
ARNg CR003336 dirigido a TTR humana (Exón 1)	CCUCCUCUGCCUUGCUGGAC	6
ARNg CR003337 dirigido a TTR humana (Exón 1)	CCAGUCCAGCAAGGCAGAGG	7
ARNg CR003338 dirigido a TTR humana (Exón 1)	AUACCAGUCCAGCAAGGCAG	8
ARNg CR003339 dirigido a TTR humana (Exón 1)	ACACAAAUACCAGUCCAGCA	9
ARNg CR003340 dirigido a TTR humana (Exón 1)	UGGACUGGUAUUUGUGUCUG	10

ARNg CR003341 dirigido a TTR humana (Exón 1)	CUGGUAUUUGUGUCUGAGGC	11
ARNg CR003342 dirigido a TTR humana (Exón 2)	CUUCUCUACACCCAGGGCAC	12
ARNg CR003343 dirigido a TTR humana (Exón 2)	CAGAGGACACUUGGAUUCAC	13
ARNg CR003344 dirigido a TTR humana (Exón 2)	UUUGACCAUCAGAGGACACU	14
ARNg CR003345 dirigido a TTR humana (Exón 2)	UCUAGAACUUUGACCAUCAG	15
ARNg CR003346 dirigido a TTR humana (Exón 2)	AAAGUUCUAGAUGCUGUCCG	16
ARNg CR003347 dirigido a TTR	CAUUGAUGGCAGGACUGCCU	17

humana (Exón 2)		
ARNg CR003348 dirigido a TTR humana (Exón 2)	AGGCAGUCCUGCCAUCAAUG	18
ARNg CR003349 dirigido a TTR humana (Exón 2)	UGCACGGCCACAUUGAUGGC	19
ARNg CR003350 dirigido a TTR humana (Exón 2)	CACAUGCACGGCCACAUUGA	20
ARNg CR003351 dirigido a TTR humana (Exón 2)	AGCCUUUCUGAACACAUGCA	21
ARNg CR003352 dirigido a TTR humana (Exón 2)	GAAAGGCUGCUGAUGACACC	22
ARNg CR003353 dirigido a TTR humana (Exón 2)	AAAGGCUGCUGAUGACACCU	23

ARNg CR003354 dirigido a TTR humana (Exón 2)	ACCUGGGAGCCAUUUGCCUC	24
ARNg CR003355 dirigido a TTR humana (Exón 2)	CCCAGAGGCAAAUGGCUCCC	25
ARNg CR003356 dirigido a TTR humana (Exón 2)	GCAACUUACCCAGAGGCAAA	26
ARNg CR003357 dirigido a TTR humana (Exón 2)	UUCUUUGGCAACUUACCCAG	27
ARNg CR003358 dirigido a TTR humana (Exón 3)	AUGCAGCUCUCCAGACUCAC	28
ARNg CR003359 dirigido a TTR humana (Exón 3)	AGUGAGUCUGGAGAGCUGCA	29
ARNg CR003360 dirigido a TTR	GUGAGUCUGGAGAGCUGCAU	30

humana (Exón 3)		
ARNg CR003361 dirigido a TTR humana (Exón 3)	GCUGCAUGGGCUCACAACUG	31
ARNg CR003362 dirigido a TTR humana (Exón 3)	GCAUGGGCUCACAACUGAGG	32
ARNg CR003363 dirigido a TTR humana (Exón 3)	ACUGAGGAGGAAUUUGUAGA	33
ARNg CR003364 dirigido a TTR humana (Exón 3)	CUGAGGAGGAAUUUGUAGAA	34
ARNg CR003365 dirigido a TTR humana (Exón 3)	UGUAGAAGGGAUAUACAAAG	35
ARNg CR003366 dirigido a TTR humana (Exón 3)	AAAUAGACACCAAAUCUUAC	36

ARNg CR003367 dirigido a TTR humana (Exón 3)	AGACACCAAAUCUUACUGGA	37
ARNg CR003368 dirigido a TTR humana (Exón 3)	AAGUGCCUUCCAGUAAGAUU	38
ARNg CR003369 dirigido a TTR humana (Exón 3)	CUCUGCAUGCUCAUGGAAUG	39
ARNg CR003370 dirigido a TTR humana (Exón 3)	CCUCUGCAUGCUCAUGGAAU	40
ARNg CR003371 dirigido a TTR humana (Exón 3)	ACCUCUGCAUGCUCAUGGAA	41
ARNg CR003372 dirigido a TTR humana (Exón 3)	UACUCACCUCUGCAUGCUCA	42
ARNg CR003373 dirigido a TTR	GUAUUCACAGCCAACGACUC	43

humana (Exón 4)		
ARNg CR003374 dirigido a TTR humana (Exón 4)	GCGGCGGGGGCCGGAGUCGU	44
ARNg CR003375 dirigido a TTR humana (Exón 4)	AAUGGUGUAGCGGCGGGGGC	45
ARNg CR003376 dirigido a TTR humana (Exón 4)	CGGCAAUGGUGUAGCGGCGG	46
ARNg CR003377 dirigido a TTR humana (Exón 4)	GCGGCAAUGGUGUAGCGGCG	47
ARNg CR003378 dirigido a TTR humana (Exón 4)	GGCGGCAAUGGUGUAGCGGC	48
ARNg CR003379 dirigido a TTR humana (Exón 4)	GGGCGGCAAUGGUGUAGCGG	49

ARNg CR003380 dirigido a TTR humana (Exón 4)	GCAGGGCGGCAAUGGUGUAG	50
ARNg CR003381 dirigido a TTR humana (Exón 4)	GGGGCUCAGCAGGGCGGCAA	51
ARNg CR003382 dirigido a TTR humana (Exón 4)	GGAGUAGGGGCUCAGCAGGG	52
ARNg CR003383 dirigido a TTR humana (Exón 4)	AUAGGAGUAGGGGCUCAGCA	53
ARNg CR003384 dirigido a TTR humana (Exón 4)	AAUAGGAGUAGGGGCUCAGC	54
ARNg CR003385 dirigido a TTR humana (Exón 4)	CCCCUACUCCUAUUCCACCA	55
ARNg CR003386 dirigido a TTR	CCGUGGUGGAAUAGGAGUAG	56

humana (Exón 4)		
ARNg CR003387 dirigido a TTR humana (Exón 4)	GCCGUGGUGGAAUAGGAGUA	57
ARNg CR003388 dirigido a TTR humana (Exón 4)	GACGACAGCCGUGGUGGAAU	58
ARNg CR003389 dirigido a TTR humana (Exón 4)	AUUGGUGACGACAGCCGUGG	59
ARNg CR003390 dirigido a TTR humana (Exón 4)	GGGAUUGGUGACGACAGCCG	60
ARNg CR003391 dirigido a TTR humana (Exón 4)	GGCUGUCGUCACCAAUCCCA	61
ARNg CR003392 dirigido a TTR humana (Exón 4)	AGUCCCUCAUUCCUUGGGAU	62

ARNg CR005298 dirigido a TTR humana (Exón 1)	UCCACUCAUUCUUGGCAGGA	63
ARNg CR005299 dirigido a TTR humana (Exón 4)	AGCCGUGGUGGAAUAGGAGU	64
ARNg CR005300 dirigido a TTR humana (Exón 1)	UCACAGAAACACUCACCGUA	65
ARNg CR005301 dirigido a TTR humana (Exón 1)	GUCACAGAAACACUCACCGU	66
ARNg CR005302 dirigido a TTR humana (Exón 2)	ACGUGUCUUCUCUACACCCA	67
ARNg CR005303 dirigido a TTR humana (Exón 2)	UGAAUCCAAGUGUCCUCUGA	68
ARNg CR005304 dirigido a TTR	GGCCGUGCAUGUGUUCAGAA	69

humana (Exón 2)		
ARNg CR005305 dirigido a TTR humana (Exón 3)	UAUAGGAAAACCAGUGAGUC	70
ARNg CR005306 dirigido a TTR humana (Exón 3)	AAAUCUUACUGGAAGGCACU	71
ARNg CR005307 dirigido a TTR humana (Exón 4)	UGUCUGUCUUCUCUCAUAGG	72
ARNg CR000689 dirigido a TTR de cyno	ACACAAAUACCAGUCCAGCG	73
ARNg CR005364 dirigido a TTR de cyno	AAAGGCUGCUGAUGAGACCU	74
ARNg CR005365 dirigido a TTR de cyno	CAUUGACAGCAGGACUGCCU	75
ARNg CR005366 dirigido a TTR	AUACCAGUCCAGCGAGGCAG	76

de cyno		
ARNg CR005367 dirigido a TTR de cyno	CCAGUCCAGCGAGGCAGAGG	77
ARNg CR005368 dirigido a TTR de cyno	CCUCCUCUGCCUCGCUGGAC	78
ARNg CR005369 dirigido a TTR de cyno	AAAGUUCUAGAUGCCGUCCG	79
ARNg CR005370 dirigido a TTR de cyno	ACUUGUCUUCUCUAUACCCA	80
ARNg CR005371 dirigido a TTR de cyno	AAGUGACUUCCAGUAAGAUU	81
ARNg CR005372 dirigido a TTR de cyno	AAAAGGCUGCUGAUGAGACC	82
	No usado	83
	No usado	84
	No usado	85
	No usado	86
Secuencia modificada de ARNsg	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU	87

G000480 dirigido a TTR humana	mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
Secuencia modificada de ARNsg G000481 dirigido a TTR humana	mU*mC*mU*AGAACUUUGACCAUCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	88
Secuencia modificada de ARNsg G000482 dirigido a TTR humana	mU*mG*mU*AGAAGGGAUAUACAAAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	89
Secuencia modificada de ARNsg G000483 dirigido a TTR humana	mU*mC*mC*ACUCAUUCUUGGCAGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	90
Secuencia modificada de ARNsg G000484 dirigido a TTR humana	mA*mG*mA*CACCAAAUCUUACUGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	91
Secuencia modificada de ARNsg G000485 dirigido a TTR humana	mC*mC*mU*CCUCUGCCUUGCUGGACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	92

Secuencia modificada de ARNsg G000486 dirigido a TTR humana	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	93
Secuencia modificada de ARNsg G000487 dirigido a TTR humana	mU*mU*mC*UUUGGCAACUUACCCAGGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	94
Secuencia modificada de ARNsg G000488 dirigido a TTR humana	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCUGUCCGGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	95
Secuencia modificada de ARNsg G000489 dirigido a TTR humana	mU*mU*mU*GACCAUCAGAGGACACUGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	96
Secuencia modificada de ARNsg G000490 dirigido a TTR humana	mA*mA*mA*UAGACACCAAAUCUUACGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	97
Secuencia modificada de ARNsg	mA*mU*mA*CCAGUCCAGCAAGGCAGGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU	98

G000491 dirigido a TTR humana	mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
Secuencia modificada de ARNsg G000492 dirigido a TTR humana	mC*mU*mU*CUCUACACCCAGGGCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	99
Secuencia modificada de ARNsg G000493 dirigido a TTR humana	mA*mA*mG*UGCCUUCCAGUAAGAUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	100
Secuencia modificada de ARNsg G000494 dirigido a TTR humana	mG*mU*mG*AGUCUGGAGAGCUGCAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	101
Secuencia modificada de ARNsg G000495 dirigido a TTR humana	mC*mA*mG*AGGACACUUGGAUUCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	102
Secuencia modificada de ARNsg G000496 dirigido a TTR humana	mG*mG*mC*CGUGCAUGUGUUCAGAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	103

Secuencia modificada de ARNsg G000497 dirigido a TTR humana	mC*mU*mG*CUCCUCCUCUGCCUUGCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	104
Secuencia modificada de ARNsg G000498 dirigido a TTR humana	mA*mG*mU*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	105
Secuencia modificada de ARNsg G000499 dirigido a TTR humana	mU*mG*mA*AUCCAAGUGUCCUCUGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	106
Secuencia modificada de ARNsg G000500 dirigido a TTR humana	mC*mC*mA*GUCCAGCAAGGCAGAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	107
Secuencia modificada de ARNsg G000501 dirigido a TTR humana	mU*mC*mA*CAGAAACACUCACCGUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	108
Secuencia modificada de ARNsg	mG*mA*mA*AGGCUGCUGAUGACACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU	109

G000567 dirigido a TTR humana	mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
Secuencia modificada de ARNsg G000568 dirigido a TTR humana	mG*mG*mC*UGUCGUCACCAAUCCCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	110
Secuencia modificada de ARNsg G000570 dirigido a TTR humana	mC*mA*mU*UGAUGGCAGGACUGCCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	111
Secuencia modificada de ARNsg G000571 dirigido a TTR humana	mG*mU*mC*ACAGAAACACUCACCGUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	112
Secuencia modificada de ARNsg G000572 dirigido a TTR humana	mC*mC*mC*CUACUCCUAUUCCACCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	113
Secuencia modificada de ARNsg G000502 dirigido a TTR de cyno	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	114

Secuencia modificada de ARNsg G000503 dirigido a TTR de cyno	mA*mA*mA*AGGCUGCUGAUGAGACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	115
Secuencia modificada de ARNsg G000504 dirigido a TTR de cyno	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGAGACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	116
Secuencia modificada de ARNsg G000505 dirigido a TTR de cyno	mC*mA*mU*UGACAGCAGGACUGCCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	117
Secuencia modificada de ARNsg G000506 dirigido a TTR de cyno	mA*mU*mA*CCAGUCCAGCGAGGCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	118
Secuencia modificada de ARNsg G000507 dirigido a TTR de cyno	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAGAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	119
Secuencia modificada de ARNsg	mC*mC*mU*CCUCUGCCUCGCUGGACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU	120

G000508 dirigido a TTR de cyno	mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
Secuencia modificada de ARNsg G000509 dirigido a TTR de cyno	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGUCCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	121
Secuencia modificada de ARNsg G000510 dirigido a TTR de cyno	mA*mC*mU*UGUCUUCUCUAUACCCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	122
Secuencia modificada de ARNsg G000511 dirigido a TTR de cyno	mA*mA*mG*UGACUUCCAGUAAGAUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	123
Secuencia modificada de ARNsg G000282 dirigido a TTR de ratón	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	124
	No usado	125 a 200
Secuencia de codificación de ADN de Cas9 que usa el	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT	201

análogo de timidina de los codones de mínima uridina enumerados en la Tabla 3, con codones de inicio y parada	GCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGAC TGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAA GAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGA AATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGA AGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAA GACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCAT ACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAG AAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACT GATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGG ACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACA GCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACAT ACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGC GGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAG CAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGC CGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATC GCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAA CTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCA AGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCA CAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCA AAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTG AGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGC AAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACC TGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCG GAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAA CGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGG AAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGA TGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGA GAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGG AAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACG CAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGA AGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTC AGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAA CAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAA	

	CAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAG GGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAA CTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGA AGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG AACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGA AAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAT CGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGT CAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAAT GCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGA TTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAG ATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAA CGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACT GTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGA CATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGC TGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGC AGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGG AAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGC AAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCT GACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCG GACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTG GCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC AGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAA GACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGA GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCA GAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGA ACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACC TGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTG GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACAT CGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACA ACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAG AGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGA	

	TCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAG AGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCAT CAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGC ACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAG TACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGT CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAA AGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACT ACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCG GAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGC GAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGA AAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGC AACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTT CTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCA GAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGA GAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGT CAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCA AGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAA AGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGC AAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGAT TCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCG CAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAA GCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCA AAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAA GCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAA GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAG GGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTT CCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAA CAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGAT CAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAA ACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGA GACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCA	

	CCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATT CAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACA CAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCT GAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAG AAGAAGAGAAAGGTCTAG	
Secuencia de codificación de ADN de Cas9 que usa codones con expresión generalmente alta en humanos	ATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACT AATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAA GTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGAT AGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCT GTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCA AACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAAT CGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATG GCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAA TCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCA TCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCA CGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTT GGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTA CTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTT CCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGT GGATAAGCTTTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCA ACTGTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCTAGCGGCGTCGA TGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCG GCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGA AAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCAC TGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGG CCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTAC GACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGAT CAGTACGCGGATCTGTTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCG GACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACC GAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAG CGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAA GCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGA	202

	GATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTA CATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTT CATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAG AACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGG AAACAGAGAACCTTTGACAACGGATCCATTCCCCACCAG ATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAG GAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCGGGAAAAG ATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTG GGCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATG ACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTTC GAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTT CATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAA CGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATA CTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGT TACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGA ACAGAAGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAA CCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTT CAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCG GGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATC ATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTG ACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTC CTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAG GAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAG GTCATGAAACAACTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGG GGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGAT AAACAGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCCTCAAATCG GATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCAC GACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGC ACAAGTGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACA TCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGA ATTCTGCAAACTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAG GTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGA AATGGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGA	

	AAAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGA ATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCC GGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACC TGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACC AAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGG ACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGA TCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGA GGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAA GAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGA AGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAG CCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGA TTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACC AAGCACGTGGCGCAGATCTTGGACTCCCGCATGAACACT AAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAA GGTGATTACCCTGAAAAGCAAACTTGTGTCGGACTTTCG GAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACA ACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGG TCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAAT CGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGA GGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAA GCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAAC TTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATC AGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGG CGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTG TTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGA AGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAA TCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCA CGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATT CGATTCGCCGACTGTCGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGC CAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCG TCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCT CGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCCTCGAGGCGAAGG GTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACTC	

	CCCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAG CGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAA TGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTA TCTTGCTTCGCACTACGAAAAACTCAAAGGGTCACCGGA AGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACA AGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGT TTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACA AAGTCCTGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCG ATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACC CTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTC GATACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAG GAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACT GGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTCGCAGCTGGGT GGCGATGGCGGTGGATCTCCGAAAAAGAAGAGAAAGGT GTAATGA	
Secuencia de aminoácidos de Cas9 con una señal de localización nuclear (1xNLS) como los 7 aminoácidos C-terminales	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL	203

	IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIL QTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKR PLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT LIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV	
ORF del ARNm de Cas9 que usa codones de mínima uridina, con codones de inicio y parada	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCAC AGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGA AGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGAC GAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCA CCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCA GACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAU CAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUG AACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCA	204

	GCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACAC CGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA	

	AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU	

	CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAG	
ORF del ARNm de Cas9	AUGGAUAAGAAGUACUCAAUCGGGCUGGAUAUCGGAA CUAAUUCCGUGGGUUGGGCAGUGAUCACGGAUGAAUA	205

que usa codones con expresión generalmente alta en humanos, con codones de inicio y parada	CAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGGAAC ACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAAUCUCAUCGGAG CCCUGCUGUUUGACUCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACC CGGCUCAAACGUACCGCGAGGCGACGCUACACCCGGCG GAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUCUUUUCG AACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACCG CCUGGAAGAAUCUUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAG CAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAAACAUCGUCGACG AAGUGGCGUACCACGAAAAGUACCCGACCAUCUACCAU CUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUCAACUGACAAGGCCG ACCUCAGAUUGAUCUACUUGGCCCUCGCCCAUAUGAUC AAAUUCCGCGGACACUUCCUGAUCGAAGGCGAUCUGA ACCCUGAUAACUCCGACGUGGAUAAGCUUUUCAUUCA ACUGGUGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAGAAAACC CAAUCAAUGCUAGCGGCGUCGAUGCCAAGGCCAUCCUG UCCGCCCGGCUGUCGAAGUCGCGGCGCCUCGAAAACCU GAUCGCACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACUU UUCGGCAACUUGAUCGCUCUCUCACUGGGACUCACUCC CAAUUUCAAGUCCAAUUUUGACCUGGCCGAGGACGCG AAGCUGCAACUCUCAAAGGACACCUACGACGACGACUU GGACAAUUUGCUGGCACAAAUUGGCGAUCAGUACGCG GAUCUGUUCCUUGCCGCUAAGAACCUUUCGGACGCAAU CUUGCUGUCCGAUAUCCUGCGCGUGAACACCGAAAUAA CCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUCGAUGAUUAAGCGGUAC GACGAGCAUCACCAGGAUCUCACGCUGCUCAAAGCGCU CGUGAGACAGCAACUGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUC UUCUUCGACCAGUCCAAGAAUGGGUACGCAGGGUACA UCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUAAGUU CAUCAAGCCAAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACCGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGGGAGGAUCUGCUCC GGAAACAGAGAACCUUUGACAACGGAUCCAUUCCCCAC CAGAUCCAUCUGGGUGAGCUGCACGCCAUCUUGCGGCG CCAGGAGGACUUUUACCCAUUCCUCAAGGACAACCGGG	

	AAAAGAUCGAGAAAAUUCUGACGUUCCGCAUCCCGUA UUACGUGGGCCCACUGGCGCGCGGCAAUUCGCGCUUCG CGUGGAUGACUAGAAAAUCAGAGGAAACCAUCACUCC UUGGAAUUUCGAGGAAGUUGUGGAUAAGGGAGCUUCG GCACAAAGCUUCAUCGAACGAAUGACCAACUUCGACAA GAAUCUCCCAAACGAGAAGGUGCUUCCUAAGCACAGCC UCCUUUACGAAUACUUCACUGUCUACAACGAACUGACU AAAGUGAAAUACGUUACUGAAGGAAUGAGGAAGCCGG CCUUUCUGUCCGGAGAACAGAAGAAAGCAAUUGUCGA UCUGCUGUUCAAGACCAACCGCAAGGUGACCGUCAAGC AGCUUAAAGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGUUU CGACUCAGUGGAAAUCAGCGGGGUGGAGGACAGAUUC AACGCUUCGCUGGGAACCUAUCAUGAUCUCCUGAAGA UCAUCAAGGACAAGGACUUCCUUGACAACGAGGAGAA CGAGGACAUCCUGGAAGAUAUCGUCCUGACCUUGACCC UUUUCGAGGAUCGCGAGAUGAUCGAGGAGAGGCUUAA GACCUACGCUCAUCUCUUCGACGAUAAGGUCAUGAAAC AACUCAAGCGCCGCCGGUACACUGGUUGGGGCCGCCUC UCCCGCAAGCUGAUCAACGGUAUUCGCGAUAAACAGA GCGGUAAAACUAUCCUGGAUUUCCUCAAAUCGGAUGG CUUCGCUAAUCGUAACUUCAUGCAAUUGAUCCACGACG ACAGCCUGACCUUUAAGGAGGACAUCCAAAAAGCACA AGUGUCCGGACAGGGAGACUCACUCCAUGAACACAUCG CGAAUCUGGCCGGUUCGCCGGCGAUUAAGAAGGGAAU UCUGCAAACUGUGAAGGUGGUCGACGAGCUGGUGAAG GUCAUGGGACGGCACAAACCGGAGAAUAUCGUGAUUG AAAUGGCCCGAGAAAACCAGACUACCCAGAAGGGCCAG AAAAACUCCCGCGAAAGGAUGAAGCGGAUCGAAGAAG GAAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAAGAGCA CCCGGUGGAAAACACGCAGCUGCAGAACGAGAAGCUCU ACCUGUACUAUUUGCAAAAUGGACGGGACAUGUACGU GGACCAAGAGCUGGACAUCAAUCGGUUGUCUGAUUAC GACGUGGACCACAUCGUUCCACAGUCCUUUCUGAAGGA	

	UGACUCGAUCGAUAACAAGGUGUUGACUCGCAGCGAC AAGAACAGAGGGAAGUCAGAUAAUGUGCCAUCGGAGG AGGUCGUGAAGAAGAUGAAGAAUUACUGGCGGCAGCU CCUGAAUGCGAAGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUUGAC AAUCUCACUAAAGCCGAGCGCGGCGGACUCUCAGAGCU GGAUAAGGCUGGAUUCAUCAAACGGCAGCUGGUCGAG ACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCGCAGAUCUUGG ACUCCCGCAUGAACACUAAAUACGACGAGAACGAUAA GCUCAUCCGGGAAGUGAAGGUGAUUACCCUGAAAAGC AAACUUGUGUCGGACUUUCGGAAGGACUUUCAGUUUU ACAAAGUGAGAGAAAUCAACAACUACCAUCACGCGCA UGACGCAUACCUCAACGCUGUGGUCGGUACCGCCCUGA UCAAAAAGUACCCUAAACUUGAAUCGGAGUUUGUGUA CGGAGACUACAAGGUCUACGACGUGAGGAAGAUGAUA GCCAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGA AAUACUUCUUUUACUCAAACAUCAUGAACUUUUUCAA GACUGAAAUUACGCUGGCCAAUGGAGAAAUCAGGAAG AGGCCACUGAUCGAAACUAACGGAGAAACGGGCGAAA UCGUGUGGGACAAGGGCAGGGACUUCGCAACUGUUCG CAAAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUCAAUAUUGUGAAG AAAACCGAAGUGCAAACCGGCGGAUUUUCAAAGGAAU CGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAGCGACAAGCUCAUUGCA CGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAU UCGAUUCGCCGACUGUCGCAUACUCCGUCCUCGUGGUG GCCAAGGUGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCUCAAAU CCGUCAAAGAGCUGCUGGGGAUUACCAUCAUGGAACG AUCCUCGUUCGAGAAGAACCCGAUUGAUUUCCUCGAG GCGAAGGGUUACAAGGAGGUGAAGAAGGAUCUGAUCA UCAAACUCCCCAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAAAAU GGUCGGAAGCGCAUGCUGGCUUCGGCCGGAGAACUCCA AAAAGGAAAUGAGCUGGCCUUGCCUAGCAAGUACGUC AACUUCCUCUAUCUUGCUUCGCACUACGAAAAACUCAA AGGGUCACCGGAAGAUAACGAACAGAAGCAGCUUUUC	

	GUGGAGCAGCACAAGCAUUAUCUGGAUGAAAUCAUCG AACAAAUCUCCGAGUUUUCAAAGCGCGUGAUCCUCGCC GACGCCAACCUCGACAAAGUCCUGUCGGCCUACAAUAA GCAUAGAGAUAAGCCGAUCAGAGAACAGGCCGAGAAC AUUAUCCACUUGUUCACCCUGACUAACCUGGGAGCCCC AGCCGCCUUCAAGUACUUCGAUACUACUAUCGAUCGCA AAAGAUACACGUCCACCAAGGAAGUUCUGGACGCGACC CUGAUCCACCAAAGCAUCACUGGACUCUACGAAACUAG GAUCGAUCUGUCGCAGCUGGGUGGCGAUGGCGGUGGA UCUCCGAAAAAGAAGAGAAAGGUGUAAUGA	
Secuencia de aminoácidos de la nickasa Cas9 (D10A)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIL QTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF	206

	DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKR PLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT LIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV	
ORF del ARNm de la nickasa Cas9 (D10A)	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCAC AGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGA AGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGAC GAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCA CCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCA GACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAU CAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUG AACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCA GCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACAC	207

	CGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA	

	AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG	

	AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAG	
Secuencia de aminoácidos de dCas9 (D10A H840A)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH	208

	QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIL QTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKR PLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT LIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV	
ORF del ARNm de dCas9 (D10A H840A)	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA	209

	AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCAC AGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGA AGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGAC GAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCA CCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCA GACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAU CAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUG AACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCA GCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACAC CGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA	

	GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG	

	UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG	

	CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAG	
Secuencia de codificación del ARNm de Cas9 que usa codones de mínima uridina (sin codones de inicio o parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCG AUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCU GAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUG UUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACC GAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU	210

	GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG	

	UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC	

	UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUC	
Secuencia de codificación de la nickasa Cas9 que usa codones de mínima uridina (sin codones de inicio o parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAA	211

proteínas de fusión)	CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCG AUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCU GAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUG UUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACC GAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG	

	AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG	

	CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUC	
Secuencia de codificación de	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA	212

dCas9 que usa codones de mínima uridina (sin codones de inicio o parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)	GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCG AUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCU GAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUG UUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACC GAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA	

	GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU	

	GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC	

	AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUC	
Secuencia de aminoácidos de Cas9 (sin NLS)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIL QTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR	213

	MNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKR PLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT LIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	
ORF del ARNm de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 213 que usa codones de mínima uridina, con codones de inicio y parada	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCAC AGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGA AGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGAC GAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCA CCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCA GACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAU CAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUG AACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCA GCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACAC CGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA	214

	AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA	

	AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA	

	GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC UAG	
Secuencia de codificación de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 213 que usa codones de mínima uridina (sin codones de	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAG	215

inicio o parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)	ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCG AUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCU GAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUG UUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACC GAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA	

	GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU	

	GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU	

	CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC	
Secuencia de aminoácidos de la nickasa Cas9 (sin NLS)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIL QTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKR PLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL	216

	EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT LIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	
ORF del ARNm de la nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 216 que usa codones de mínima uridina como se enumeran en la Tabla 3, con codones de inicio y parada	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCAC AGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGA AGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGAC GAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCA CCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCA GACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAU CAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUG AACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCA GCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACAC CGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU	217

	GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG	

	UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC	

	UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC UAG	
Secuencia de codificación de la nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 216 que usa codones de mínima uridina como se enumeran en la Tabla 3 (sin codones de inicio o parada;	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC	218

adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)	UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCG AUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCU GAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUG UUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACC GAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA	

	AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU	

	CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC	
Secuencia de aminoácidos de dCas9 (sin NLS)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK	219

	FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIL QTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKR PLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT LIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	
ORF del ARNm de	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA	220

dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 219 que usa codones de mínima uridina como se enumeran en la Tabla 3, con codones de inicio y parada	CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCAC AGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGA AGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGAC GAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCA CCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCA GACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAU CAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUG AACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCA GCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACAC CGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA	

	GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU	

	GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC	

	AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC UAG	
Secuencia de codificación de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 219 que usa codones de mínima uridina como se enumeran en la Tabla 3 (sin codones de inicio o parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCG AUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCU GAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUG UUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACC GAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG	221

	ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC	

	ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA	

	GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAGGAGGAAGC	
Secuencia de aminoácidos de Cas9 con dos señales de localización nuclear (2xNLS) como aminoácidos C-terminales	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP	222

	LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIL QTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKR PLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT LIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGSGSPKKKRKVDGSPKKKR KVDSG	
ORF del ARNm de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 222 que usa codones de mínima uridina, con codones de	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCAC	223

inicio y parada	AGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGA AGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGAC GAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCA CCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCA GACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAU CAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUG AACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCA GCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACAC CGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA	

	GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU	

	GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU	

	CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCCCGA AGAAGAAGAGAAAGGUC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUA G	
Secuencia de codificación de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 222 que usa codones de mínima uridina (sin codones de inicio o parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCG AUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCU GAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUG UUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACC GAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC	224

	CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA	

	GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG	

	AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCCCGA AGAAGAAGAGAAAGGUC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGA	
Secuencia de aminoácidos de la nickasa Cas9 con dos señales de localización nuclear como los	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH	225

aminoácidos C-terminales	QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIL QTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKR PLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT LIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGSGSPKKKRKVDGSPKKKR KVDSG	
ORF del ARNm de la nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO:	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC	226

25 que usa codones de mínima uridina como se enumeran en la Tabla 3, con codones de inicio y parada	AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCAC AGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGA AGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGAC GAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCA CCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCA GACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAU CAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUG AACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCA GCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACAC CGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA	

	CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG	

	ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA	

	UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUA G	
Secuencia de codificación de la nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 25 que usa codones de mínima uridina (sin codones de inicio o parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCG AUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCU GAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUG UUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACC GAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC	227

	CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA	

	GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG	

	AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGA	
Secuencia de aminoácidos de dCas9 con dos señales de localización nuclear como los aminoácidos C-terminales	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP	228

	LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIL QTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS RERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKR PLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQK GNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT LIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGSGSPKKKRKVDGSPKKKR KVDSG	
ORF del ARNm de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 228 que usa codones de mínima	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCAC	229

uridina, con codones de inicio y parada	AGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGA AGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGAC GAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCA CCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCA GACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAU CAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUG AACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCA GCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACAC CGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA	

	GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU	

	GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU	

	CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUA G	
Secuencia de codificación de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 228 que usa codones de mínima uridina (sin codones de inicio o parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCG AUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCU GAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUG UUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACC GAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCA AAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAG ACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUC CUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUAC GACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU	230

	GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACA UCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUU CAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAA GAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGA GAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGU ACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUU CGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACA CCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGA CAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGC CGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGU CGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAU GCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAG AUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAU GAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGA AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAG CGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG	

	UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCG AAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAA GGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCU GAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGA AGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGA GCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAG UUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGA GCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCU GGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAA ACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAG CACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUU CGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAA CAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGG AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACA GUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCG UCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUG AUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC	

	UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAU GGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCA AGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUG GGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGA	
Promotor T7	TAATACGACTCACTATA	231
Beta-globina humana 5’ UTR	ACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTC AAACAGACACC	232
Beta-globina humana 3’ UTR	GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCTT TGTTCCCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATATTATG AAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACA TTTATTTTCATTGC	233
Alfa-globina humana 5’ UTR	CATAAACCCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTCTTCTGG TCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACC	234
Alfa-globina humana 3’ UTR	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCC TCCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCC GTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC	235

Beta-globina 5' UTR de Xenopus laevis	AAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCC	236
Beta-globina 3' UTR de Xenopus laevis	ACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCTACATAATACCAACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCCCAAAATGTAGCCATTCGTATCTGCTCCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCT	237
Hormona de crecimiento bovino 5' UTR	CAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCAGCT	238
Hormona de crecimiento bovino 3' UTR	TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA	239
Hemoglobina alfa de Mus musculus, cadena adulta 1 (Hba-a1), 3'UTR	GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAG	240
HSD17B4 5' UTR	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTC	241
ARN de guía única G282 dirigido al gen TTR de ratón	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	242
	No usado	243
Transcrito de Cas9 con 5' UTR de HSD, ORF	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCG	244

correspondiente a la SEQ ID NO: 204, y 3' UTR de ALB	AGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACA CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGA CAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGA ACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAA TCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAA AGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCT TCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCG ATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAA AAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGT CGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACC TGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCC TGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTC GACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAG CTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGA CGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCA GAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAA AAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAG CCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCT GGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACAT ACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGA GACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTG AGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAAC ACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGAT CAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGC TGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTAC AAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGC AGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCT ACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGA ACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCT GCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCC CGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGA GAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAAC AGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCC	

	GTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGAT TCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACA CCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAG CGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACA AGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGC CTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACA AAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGC ATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACC TGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAG CTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGAC AGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGC AAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCA AGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGAC ATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAA GACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC ACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGA GAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAA GCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGA CAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACA GAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAG GGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGG AAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCA AGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACAC AAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAA CCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAA AGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGG AAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACAC AGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGA ACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATC AACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCG CAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC	

	AACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAA CTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACAC AGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGA GGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAG ACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCG CACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGAC GAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCAC ACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACT TCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACC ACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACA GCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATT CGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGA TGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACA GCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTC AAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAA GAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAA TCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGA AAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAA GACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCA TCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGA AAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGA CAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAA GGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCA AGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGC TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGG ATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGC CGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAG AGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAA CGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTA CCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGG AAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCAC AAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGA ATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGG	

	ACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAG CCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTC ACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTA CTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCA CAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGC ATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCA GCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAG AGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCA GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAA TAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCC AACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTT GCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAA GAACCTCGAG	
ORF de Cas9 alternativo con 19.36 % de contenido de U	ATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAACT AATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAA GTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGAT AGACACAGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGCCCTGCT GTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCA AACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAAT CGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAATG GCAAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGA ATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGC ATCCTATCTTTGGAAACATCGTGGACGAAGTGGCGTACC ACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAG TTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATC TACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACAC TTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGAC GTGGATAAGCTGTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAAC CAACTGTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCCAGCGGCGTC GATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCG CGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGA GAAGAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTC	245

	ACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCT GGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCT ACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCG ATCAGTACGCGGATCTGTTCCTTGCCGCTAAGAACCTTT CGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACA CCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTA AGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCA AAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAG GAGATTTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGG TACATCGATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAA GTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCG AAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTC CGCAAACAGAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACA CCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCG CCAGGAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCGGGA AAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTA CGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTG GATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGA ATTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAT CCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCC CAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACG AATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAAT ACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGAGCG GAGAACAGAAGAAAGCGATTGTCGATCTGCTGTTCAAG ACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGA CTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAAT CAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAA CCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACT TCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGAT ATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATG ATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGAC GATAAGGTCATGAAACAACTCAAGCGCCGCCGGTACAC TGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTAT	

	TCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCCT CAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAGTT GATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCA GAAAGCACAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCCATG AACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGA AGGGAATCCTGCAAACTGTGAAGGTGGTGGACGAGCTG GTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGT GATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGG GCCAGAAGAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAA GAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGA GCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGC TCTACCTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACG TGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACG ACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATG ACTCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGA ACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTC GTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAA TGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCAC TAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGG CTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGA TTACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGA ACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAA GTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACTTGTGTCGGAC TTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATC AACAACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCT GTGGTCGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCTAAACTT GAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGAC GTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGG GAAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCAT GAACTTCTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGA AATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAA CGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCA ACTGTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATT	

	GTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAA GGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCA TTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA GGATTCGATTCGCCGACTGTCGCATACTCCGTCCTCGTG GTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAA ATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACG ATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCCTGGAGGC GAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCA AACTGCCCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTC GGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAGAAA GGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTC CTCTATCTTGCTTCGCACTACGAGAAACTCAAAGGGTCA CCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCA GCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTC CGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCT CGACAAAGTCCTGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATA AGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGT TCACCCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCTTCAAGT ACTTCGATACTACTATCGACCGCAAAAGATACACGTCCA CCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGC ATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTCGCAG CTGGGTGGCGATGGTGGCGGTGGATCCTACCCATACGAC GTGCCTGACTACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCCCAAGAAG AAACGGAAGGTGTGATAG	
Transcrito de Cas9 con 5' UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 245, secuencia de	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCTGCCACCAT GGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAACTA ATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAG TGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATA GACACAGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGCCCTGCTGT TTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAA CGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCG	246

Kozak y 3’ UTR de ALB	CATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAATGGC AAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATC TTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATC CTATCTTTGGAAACATCGTGGACGAAGTGGCGTACCACG AAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGG TTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACT TGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTTCC TGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGG ATAAGCTGTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAAC TGTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCCAGCGGCGTCGATG CCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGC GCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAG AAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTG GGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCC GAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGA CGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCA GTACGCGGATCTGTTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGA CGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGA AATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCG GTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGC GCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGA TTTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACA TCGATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCA TCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAA CTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGCAAA CAGAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACACCAGATC CATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAG GACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATC GAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGC CCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACT AGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTTCGAG GAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAATCCTTCATC GAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGA	

	GAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTT CACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTAC TGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGAGCGGAGAAC AGAAGAAAGCGATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACC GCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTC AAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGG AGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCA TGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGA CAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCC TGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGG AGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGG TCATGAAACAACTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGG GCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATA AACAGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCCTCAAATCGG ATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAGTTGATCCACG ACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAGAAAGCA CAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACAT CGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAA TCCTGCAAACTGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAG GTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGA AATGGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGA AGAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGA ATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCC GGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACC TGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACC AAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGG ACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCCA TCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGA GGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAA GAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGA AGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAG CCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGA TTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACC	

	AAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAACACT AAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAA GGTGATTACCCTGAAAAGCAAACTTGTGTCGGACTTTCG GAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACA ACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGG TCGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCTAAACTTGAAT CGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGA GGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAA GCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAAC TTCTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATC AGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGG CGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTG TTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGA AGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAA TCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCA CGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATT CGATTCGCCGACTGTCGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGC CAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCCG TCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCT CGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCCTGGAGGCGAAGG GTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACTG CCCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAG CGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAGAAAGGAAA TGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTA TCTTGCTTCGCACTACGAGAAACTCAAAGGGTCACCGGA AGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACA AGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGT TTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACA AAGTCCTGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCG ATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACC CTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCTTCAAGTACTTC GATACTACTATCGACCGCAAAAGATACACGTCCACCAAG GAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACT	

	GGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTCGCAGCTGGGT GGCGATGGTGGCGGTGGATCCTACCCATACGACGTGCCT GACTACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCCCAAGAAGAAACG GAAGGTGTGATAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTC AGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCA ATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAG CCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCAT TTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGA AAGAACCTCGAG	
Transcrito de Cas9 con 5' UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 245, y 3' UTR de ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCTATGGATAA GAAGTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGT GGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGT CCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACAC AGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGAC TCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTAC CGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCT GCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGG TGGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCC TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATC TTTGGAAACATCGTGGACGAAGTGGCGTACCACGAAAA GTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGA CTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGC CCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTTCCTGAT CGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAA GCTGTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTT CGAAGAAAACCCAATCAATGCCAGCGGCGTCGATGCCA AGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCGCC TCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAGAAG AACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGA CTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAG GACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGA	247

	CGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTA CGCGGATCTGTTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGC AATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAAT AACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTA CGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCT CGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATTT TCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCG ATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCA AGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTG CTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGCAAACA GAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACACCAGATCCA TCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGA CTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGA GAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCC ACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAG AAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTTCGAGGA AGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAATCCTTCATCGA ACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGA AGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCA CTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTG AAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGAGCGGAGAACAG AAGAAAGCGATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGC AAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAA GAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGAGT GGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGA TCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAA CGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGA CCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGA GGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCA TGAAACAACTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCC GCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAAC AGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCCTCAAATCGGATG GCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAGTTGATCCACGACG	

	ACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAGAAAGCACAA GTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGC GAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATCCT GCAAACTGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTCA TGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATG GCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAGAA CTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCA AGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTG GAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTA CTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAG AGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACC ACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCCATCG ATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGG AAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAA GATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCT GATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGA GCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCAT CAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGC ACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAACACTAAAT ACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTG ATTACCCTGAAAAGCAAACTTGTGTCGGACTTTCGGAAG GACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACTAC CATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGC ACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAG TTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAG ATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAAC TGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTCTTC AAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAA GAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAA TCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCA AAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAA CCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCC TCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAG	

	AAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTC GCCGACTGTCGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGT GGAGAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCCGTCAAAG AGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCG AGAAGAACCCGATTGATTTCCTGGAGGCGAAGGGTTAC AAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACTGCCCAA GTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCAT GCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAGAAAGGAAATGAGC TGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGC TTCGCACTACGAGAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATA ACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCAT TATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCA AAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTC CTGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAG AGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACCCTGAC TAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATAC TACTATCGACCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAG TTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGAC TCTACGAAACTAGGATCGATCTGTCGCAGCTGGGTGGCG ATGGTGGCGGTGGATCCTACCCATACGACGTGCCTGACT ACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCCCAAGAAGAAACGGAAG GTGTGATAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCC TACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAG CTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAA CACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGC CTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGA ACCTCGAG	
	Not used	248
Transcrito de Cas9 que comprende la secuencia de	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCAT GCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTCGACGGGGATAAGAAGT ACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGTT	249

Kozak con ORF de Cas9 que usa codones con una expresión generalmente alta en humanos	GGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAG AAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCAT CAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGG CGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGA GGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATC TGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTCGAC GACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTG GAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGG AAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACC CGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAA CTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCG CCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAG GCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTT TCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAG AAAACCCAATCAATGCTAGCGGCGTCGATGCCAAGGCC ATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCGCCTCGAA AACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGG ACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACT CCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCG AAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTG GACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGAT CTGTTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTTGC TGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAG CGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGC ATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGAC AGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACC AGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGC GCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATC CTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTCAA GCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCT TTGACAACGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTG AGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACC CATTCCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAAATT	

	CTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCG CGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCA GAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTTCGAGGAAGTTGTG GATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAAT GACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGC TTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTA CAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAA TGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACAGAAGAAA GCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTG ACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGAT CGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGGGTGGAGG ACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCC TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAG GAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTG ACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTT AAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAA CAACTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTC TCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGC GGTAAAACTATCCTGGATTTCCTCAAATCGGATGGCTTC GCTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGC CTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGCACAAGTGTCC GGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCT GGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAA CTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGA CGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCG AGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTCCC GCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGA GCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAA ACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATT TGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTG GACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATC GTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAAC AAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTC	

	AGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGA AGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTA CCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGC GGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAAA CGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGT GGCGCAGATCTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGA CGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTA CCCTGAAAAGCAAACTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGACT TTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACTACCATC ACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGTACCG CCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTG TGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATG ATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGC GAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAG ACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAG GCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCG TGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCAAA GTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACC GAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTC CCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAA AGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGC CGACTGTCGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGG AGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAG CTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGAG AAGAACCCGATTGATTTCCTCGAGGCGAAGGGTTACAAG GAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACTCCCCAAGTA CTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCT GGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGG CCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTC GCACTACGAAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACG AACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATC TGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGC GCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGT	

	CGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAA CAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACCCTGACTAAC CTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACTACT ATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTG GACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTAC GAAACTAGGATCGATCTGTCGCAGCTGGGTGGCGATTGA TAGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCA TGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTAT TCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCC TGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTT TTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTC GAG	
ORF de Cas9 con uniones de empalme eliminadas; 12.75 % de contenido de U	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAAC AAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACA AGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACA GACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT GCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGAC TGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAA GAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGA AATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACcggCTGGAA GAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAG ACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATA CCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGA AGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTG ATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGA CACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAG CGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATA CAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCG GAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGC AAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC GGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACT	250

	TCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAG GACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACA GATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAA AGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGA GAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCA AGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCT GACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGG AAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC GGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGA AGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT GGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAG AAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGA AGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGC AATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAA GGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCA GAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAAC AGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAAC AATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGG GAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAAC TTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAA GCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGA ACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAA AGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATC GTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTC AAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATG CTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGAT TCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAG ATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAA CGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACT GTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGA CATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGC TGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGC AGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGG	

	AAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGC AAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCT GACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCG GACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTG GCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC AGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAA GACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGA GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCA GAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGA ACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACC TGCAaAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTG GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACAT CGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACA ACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAG AGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGA TCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAG AGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCAT CAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGC ACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAG TACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGT CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAA AGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACT ACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCG GAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGC GAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGA AAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGC AACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTT CTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCA GAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGA GAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGT CAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCA	

	AGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAA AGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGC AAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGAT TCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCG CAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAA GCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCA AAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAA GCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAA GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAG GGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTT CCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAA CAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGAT CAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAA ACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGA GACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCA CCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATT CAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACA CAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCT GAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAG AAGAAGAGAAAGGTCTAG	
Transcrito de Cas9 con 5' UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 250, secuencia de Kozak y 3'	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCAT GGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAG GTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGA ACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAA	251

UTR de ALB	TGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACcggCTGGAAGA AAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGAC ACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACC ACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAG CTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGAT CTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACA CTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCG ACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACA ACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGA GTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAA GAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGG GAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCA CTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTC GACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGA CACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGA TCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAG AACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGA GTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAG CATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGA CACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAA AAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGG ATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAG AATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGG ACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAA GACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAG CATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAAT CCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAGGA CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAA TCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGC AGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAT CACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAG CAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTC GACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCA	

	CAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACT GACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGC CGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAA GCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCT TCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTC AACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGAT CATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACG AAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGT TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACA TACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTG AAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCA GAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGA AAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCA AACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTG ACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGG ACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGG CAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACA GTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAG ACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAG AAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAG AGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAA CTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAA CACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAaAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGG ACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATC GTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAA CAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATG AAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGAT CACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGA GAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATC AAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCA	

	CGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGT ACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTC ATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAA GGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTA CCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGG AACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCG AATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAA AGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCA ACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTC TTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAG AAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAG AAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTC AGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAA GAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAA GCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCA AGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATT CGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGC AAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGC GTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAG CAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAA AGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAG CTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAG AAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGG GAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCC TGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGC CCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACA GCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCA GCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAAC CTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGA CAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC TGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCA AGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACA AGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCA	

	GAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGA GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAA GAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCA TCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAG ATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTA AAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAAT CATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAAT GGAAAGAACCTCGAG	
ORF de Cas9 con codones de mínima uridina de uso frecuente en humanos en general; 12.75 % de contenido de U	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCAC CAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACA AGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACC GACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCT GCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAGAC TGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAG AACAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAG ATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAG GAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGAG ACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTA CCACGAGAAGTACCCCACCATCTACCACCTGAGAAAGA AGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGAGACTG ATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCAGAGGC CACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGC GACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTAC AACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGG CGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCAGACTGAGCA AGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCC GGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGC CCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGG ACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAG ATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAG AACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGA	252

	GTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAG CATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGA CCCTGCTGAAGGCCCTGGTGAGACAGCAGCTGCCCGAG AAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGG CTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGG AGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGG ACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAG GACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAG CATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCAT CCTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGA CAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAA TCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGCA GATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAGACCATC ACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGC CAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTCGA CAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACA GCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGA CCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAAGCCC GCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGA CCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAGC AGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTC GACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCAA CGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCAT CAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGG ACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCG AGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTAC GCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAA GAGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAA AGCTGATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAG ACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAAC AGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACC TTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCA GGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCG	

	GCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTG AAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCAGACA CAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAGA ACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCAGAGAG AGAATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGG CAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCC AGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGA ACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATC AACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCC CCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGG TGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCGAC AACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAA CTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCA GAGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCG GCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGAGA CAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGC CCAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACG AGAACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACC CTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGACTT CCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAACAACTACCACC ACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCG CCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTC GTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAGAAAGAT GATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCG CCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCA AGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCAGAAAG AGACCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAT CGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTTCGCCACCGTGAGAA AGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAG ACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCAT CCTGCCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGAA AGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGAC AGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAG	

	GTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGA AGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGC TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGC TACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC CAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGA GAATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAAC GAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTAC CTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGA GGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACA AGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG TTCAGCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGAC AAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCC CATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCAC CCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTT CGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCAGCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATC ACCGGCCTGTACGAGACCAGAATCGACCTGAGCCAGCT GGGCGGCGACGGCGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGAGA AAGGTGTGA	
Transcrito de Cas9 con 5' UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 252, secuencia de Kozak y 3' UTR de ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCAT GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCA ACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAG GTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGC TGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAGACTG AAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGA ACAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGA TGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGG AGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGAGA CACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTAC CACGAGAAGTACCCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAA	253

	GCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGAGACTGA TCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCAGAGGCC ACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCG ACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACA ACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGC GTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCAGACTGAGCAA GAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCG GCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCC CTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTC GACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGA CACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGAT CGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAA CCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGT GAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCA TGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACC CTGCTGAAGGCCCTGGTGAGACAGCAGCTGCCCGAGAA GTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCT ACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAG TTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGAC GGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGA CCTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAGCA TCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCC TGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACA ACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAATC CCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGCAG ATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAGACCATCA CCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCC AGCGCCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTCGAC AAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAG CCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGAC CAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAAGCCCG CCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGAC CTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAGCA	

	GCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCG ACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCAAC GCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATC AAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGA CATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGA GGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACG CCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG AGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAAA GCTGATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGA CCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACA GAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAG GGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGG CAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGA AGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCAGACAC AAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAA CCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCAGAGAGA GAATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGC AGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCA GCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCA ACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCC AGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTG CTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCGACAA CGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACT ACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAG AGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGG CCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGAGAC AGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCC CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGA GAACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACCC TGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGACTTC CAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAACAACTACCACCA	

	CGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGC CCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGT GTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAGAAAGATGA TCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCC AAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAG ACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCAGAAAGAG ACCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCG TGTGGGACAAGGGCAGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAG GTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGAC CGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCC TGCCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGAAAG AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAG CCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGT GGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAG GAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGCTTC GAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTA CAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCA AGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGA ATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGA GCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCT GGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGG ACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAG CACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTC AGCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAA GGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCCA TCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCC TGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCG ACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCAGCACCAAG GAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACC GGCCTGTACGAGACCAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGG CGGCGACGGCGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAG GTGTGACTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTAC CATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTT	

	ATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACAC CCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTC TTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACC TCGAG	
ORF de Cas9 con codones de mínima uridina usados con poca frecuencia en humanos en general; 12.75 % de contenido de U	ATGGACAAAAAATACAGCATAGGGCTAGACATAGGGAC GAACAGCGTAGGGTGGGCGGTAATAACGGACGAATACA AAGTACCGAGCAAAAAATTCAAAGTACTAGGGAACACG GACCGACACAGCATAAAAAAAAACCTAATAGGGGCGCT ACTATTCGACAGCGGGGAAACGGCGGAAGCGACGCGAC TAAAACGAACGGCGCGACGACGATACACGCGACGAAAA AACCGAATATGCTACCTACAAGAAATATTCAGCAACGA AATGGCGAAAGTAGACGACAGCTTCTTCCACCGACTAGA AGAAAGCTTCCTAGTAGAAGAAGACAAAAAACACGAAC GACACCCGATATTCGGGAACATAGTAGACGAAGTAGCG TACCACGAAAAATACCCGACGATATACCACCTACGAAA AAAACTAGTAGACAGCACGGACAAAGCGGACCTACGAC TAATATACCTAGCGCTAGCGCACATGATAAAATTCCGAG GGCACTTCCTAATAGAAGGGGACCTAAACCCGGACAAC AGCGACGTAGACAAACTATTCATACAACTAGTACAAAC GTACAACCAACTATTCGAAGAAAACCCGATAAACGCGA GCGGGGTAGACGCGAAAGCGATACTAAGCGCGCGACTA AGCAAAAGCCGACGACTAGAAAACCTAATAGCGCAACT ACCGGGGGAAAAAAAAAACGGGCTATTCGGGAACCTAA TAGCGCTAAGCCTAGGGCTAACGCCGAACTTCAAAAGC AACTTCGACCTAGCGGAAGACGCGAAACTACAACTAAG CAAAGACACGTACGACGACGACCTAGACAACCTACTAG CGCAAATAGGGGACCAATACGCGGACCTATTCCTAGCG GCGAAAAACCTAAGCGACGCGATACTACTAAGCGACAT ACTACGAGTAAACACGGAAATAACGAAAGCGCCGCTAA GCGCGAGCATGATAAAACGATACGACGAACACCACCAA GACCTAACGCTACTAAAAGCGCTAGTACGACAACAACT ACCGGAAAAATACAAAGAAATATTCTTCGACCAAAGCA	254

	AAAACGGGTACGCGGGGTACATAGACGGGGGGGCGAGC CAAGAAGAATTCTACAAATTCATAAAACCGATACTAGA AAAAATGGACGGGACGGAAGAACTACTAGTAAAACTAA ACCGAGAAGACCTACTACGAAAACAACGAACGTTCGAC AACGGGAGCATACCGCACCAAATACACCTAGGGGAACT ACACGCGATACTACGACGACAAGAAGACTTCTACCCGTT CCTAAAAGACAACCGAGAAAAAATAGAAAAAATACTAA CGTTCCGAATACCGTACTACGTAGGGCCGCTAGCGCGAG GGAACAGCCGATTCGCGTGGATGACGCGAAAAAGCGAA GAAACGATAACGCCGTGGAACTTCGAAGAAGTAGTAGA CAAAGGGGCGAGCGCGCAAAGCTTCATAGAACGAATGA CGAACTTCGACAAAAACCTACCGAACGAAAAAGTACTA CCGAAACACAGCCTACTATACGAATACTTCACGGTATAC AACGAACTAACGAAAGTAAAATACGTAACGGAAGGGAT GCGAAAACCGGCGTTCCTAAGCGGGGAACAAAAAAAAG CGATAGTAGACCTACTATTCAAAACGAACCGAAAAGTA ACGGTAAAACAACTAAAAGAAGACTACTTCAAAAAAAT AGAATGCTTCGACAGCGTAGAAATAAGCGGGGTAGAAG ACCGATTCAACGCGAGCCTAGGGACGTACCACGACCTAC TAAAAATAATAAAAGACAAAGACTTCCTAGACAACGAA GAAAACGAAGACATACTAGAAGACATAGTACTAACGCT AACGCTATTCGAAGACCGAGAAATGATAGAAGAACGAC TAAAAACGTACGCGCACCTATTCGACGACAAAGTAATG AAACAACTAAAACGACGACGATACACGGGGTGGGGGCG ACTAAGCCGAAAACTAATAAACGGGATACGAGACAAAC AAAGCGGGAAAACGATACTAGACTTCCTAAAAAGCGAC GGGTTCGCGAACCGAAACTTCATGCAACTAATACACGAC GACAGCCTAACGTTCAAAGAAGACATACAAAAAGCGCA AGTAAGCGGGCAAGGGGACAGCCTACACGAACACATAG CGAACCTAGCGGGGAGCCCGGCGATAAAAAAAGGGATA CTACAAACGGTAAAAGTAGTAGACGAACTAGTAAAAGT AATGGGGCGACACAAACCGGAAAACATAGTAATAGAAA TGGCGCGAGAAAACCAAACGACGCAAAAAGGGCAAAA	

	AAACAGCCGAGAACGAATGAAACGAATAGAAGAAGGG ATAAAAGAACTAGGGAGCCAAATACTAAAAGAACACCC GGTAGAAAACACGCAACTACAAAACGAAAAACTATACC TATACTACCTACAAAACGGGCGAGACATGTACGTAGACC AAGAACTAGACATAAACCGACTAAGCGACTACGACGTA GACCACATAGTACCGCAAAGCTTCCTAAAAGACGACAG CATAGACAACAAAGTACTAACGCGAAGCGACAAAAACC GAGGGAAAAGCGACAACGTACCGAGCGAAGAAGTAGTA AAAAAAATGAAAAACTACTGGCGACAACTACTAAACGC GAAACTAATAACGCAACGAAAATTCGACAACCTAACGA AAGCGGAACGAGGGGGGCTAAGCGAACTAGACAAAGCG GGGTTCATAAAACGACAACTAGTAGAAACGCGACAAAT AACGAAACACGTAGCGCAAATACTAGACAGCCGAATGA ACACGAAATACGACGAAAACGACAAACTAATACGAGAA GTAAAAGTAATAACGCTAAAAAGCAAACTAGTAAGCGA CTTCCGAAAAGACTTCCAATTCTACAAAGTACGAGAAAT AAACAACTACCACCACGCGCACGACGCGTACCTAAACG CGGTAGTAGGGACGGCGCTAATAAAAAAATACCCGAAA CTAGAAAGCGAATTCGTATACGGGGACTACAAAGTATA CGACGTACGAAAAATGATAGCGAAAAGCGAACAAGAAA TAGGGAAAGCGACGGCGAAATACTTCTTCTACAGCAAC ATAATGAACTTCTTCAAAACGGAAATAACGCTAGCGAAC GGGGAAATACGAAAACGACCGCTAATAGAAACGAACGG GGAAACGGGGGAAATAGTATGGGACAAAGGGCGAGACT TCGCGACGGTACGAAAAGTACTAAGCATGCCGCAAGTA AACATAGTAAAAAAAACGGAAGTACAAACGGGGGGGTT CAGCAAAGAAAGCATACTACCGAAACGAAACAGCGACA AACTAATAGCGCGAAAAAAAGACTGGGACCCGAAAAAA TACGGGGGGTTCGACAGCCCGACGGTAGCGTACAGCGT ACTAGTAGTAGCGAAAGTAGAAAAAGGGAAAAGCAAAA AACTAAAAAGCGTAAAAGAACTACTAGGGATAACGATA ATGGAACGAAGCAGCTTCGAAAAAAACCCGATAGACTT CCTAGAAGCGAAAGGGTACAAAGAAGTAAAAAAAGACC	

	TAATAATAAAACTACCGAAATACAGCCTATTCGAACTAG AAAACGGGCGAAAACGAATGCTAGCGAGCGCGGGGGAA CTACAAAAAGGGAACGAACTAGCGCTACCGAGCAAATA CGTAAACTTCCTATACCTAGCGAGCCACTACGAAAAACT AAAAGGGAGCCCGGAAGACAACGAACAAAAACAACTAT TCGTAGAACAACACAAACACTACCTAGACGAAATAATA GAACAAATAAGCGAATTCAGCAAACGAGTAATACTAGC GGACGCGAACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGTACAACA AACACCGAGACAAACCGATACGAGAACAAGCGGAAAAC ATAATACACCTATTCACGCTAACGAACCTAGGGGCGCCG GCGGCGTTCAAATACTTCGACACGACGATAGACCGAAA ACGATACACGAGCACGAAAGAAGTACTAGACGCGACGC TAATACACCAAAGCATAACGGGGCTATACGAAACGCGA ATAGACCTAAGCCAACTAGGGGGGGACGGGGGGGGGAG CCCGAAAAAAAAACGAAAAGTATGA	
Transcrito de Cas9 con 5' UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 254, secuencia de Kozak y 3' UTR de ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCAT GGACAAAAAATACAGCATAGGGCTAGACATAGGGACGA ACAGCGTAGGGTGGGCGGTAATAACGGACGAATACAAA GTACCGAGCAAAAAATTCAAAGTACTAGGGAACACGGA CCGACACAGCATAAAAAAAAACCTAATAGGGGCGCTAC TATTCGACAGCGGGGAAACGGCGGAAGCGACGCGACTA AAACGAACGGCGCGACGACGATACACGCGACGAAAAAA CCGAATATGCTACCTACAAGAAATATTCAGCAACGAAAT GGCGAAAGTAGACGACAGCTTCTTCCACCGACTAGAAG AAAGCTTCCTAGTAGAAGAAGACAAAAAACACGAACGA CACCCGATATTCGGGAACATAGTAGACGAAGTAGCGTA CCACGAAAAATACCCGACGATATACCACCTACGAAAAA AACTAGTAGACAGCACGGACAAAGCGGACCTACGACTA ATATACCTAGCGCTAGCGCACATGATAAAATTCCGAGGG CACTTCCTAATAGAAGGGGACCTAAACCCGGACAACAG CGACGTAGACAAACTATTCATACAACTAGTACAAACGTA	255

	CAACCAACTATTCGAAGAAAACCCGATAAACGCGAGCG GGGTAGACGCGAAAGCGATACTAAGCGCGCGACTAAGC AAAAGCCGACGACTAGAAAACCTAATAGCGCAACTACC GGGGGAAAAAAAAAAACGGGCTATTCGGGAACCTAATAG CGCTAAGCCTAGGGCTAACGCCGAACTTCAAAAGCAACT TCGACCTAGCGGAAGACGCGAAACTACAACTAAGCAAA GACACGTACGACGACGACCTAGACAACCTACTAGCGCA AATAGGGGACCAATACGCGGACCTATTCCTAGCGGCGA AAAACCTAAGCGACGCGATACTACTAAGCGACATACTA CGAGTAAACACGGAAATAACGAAAGCGCCGCTAAGCGC GAGCATGATAAAACGATACGACGAACACCACCAAGACC TAACGCTACTAAAAGCGCTAGTACGACAACAACTACCG GAAAAATACAAAGAAATATTCTTCGACCAAAGCAAAAA CGGGTACGCGGGGTACATAGACGGGGGGGCGAGCCAAG AAGAATTCTACAAATTCATAAAACCGATACTAGAAAAA ATGGACGGGACGGAAGAACTACTAGTAAAACTAAACCG AGAAGACCTACTACGAAAACAACGAACGTTCGACAACG GGAGCATACCGCACCAAATACACCTAGGGGAACTACAC GCGATACTACGACGACAAGAAGACTTCTACCCGTTCCTA AAAGACAACCGAGAAAAAATAGAAAAAATACTAACGTT CCGAATACCGTACTACGTAGGGCCGCTAGCGCGAGGGA ACAGCCGATTCGCGTGGATGACGCGAAAAAGCGAAGAA ACGATAACGCCGTGGAACTTCGAAGAAGTAGTAGACAA AGGGGCGAGCGCGCAAAGCTTCATAGAACGAATGACGA ACTTCGACAAAAACCTACCGAACGAAAAAGTACTACCG AAACACAGCCTACTATACGAATACTTCACGGTATACAAC GAACTAACGAAAGTAAAATACGTAACGGAAGGGATGCG AAAACCGGCGTTCCTAAGCGGGGAACAAAAAAAAGCGA TAGTAGACCTACTATTCAAAACGAACCGAAAAGTAACG GTAAAACAACTAAAAGAAGACTACTTCAAAAAAATAGA ATGCTTCGACAGCGTAGAAATAAGCGGGGTAGAAGACC GATTCAACGCGAGCCTAGGGACGTACCACGACCTACTAA AAATAATAAAAGACAAAGACTTCCTAGACAACGAAGAA	

	AACGAAGACATACTAGAAGACATAGTACTAACGCTAAC GCTATTCGAAGACCGAGAAATGATAGAAGAACGACTAA AAACGTACGCGCACCTATTCGACGACAAAGTAATGAAA CAACTAAAACGACGACGATACACGGGGTGGGGGCGACT AAGCCGAAAACTAATAAACGGGATACGAGACAAACAAA GCGGGAAAACGATACTAGACTTCCTAAAAAGCGACGGG TTCGCGAACCGAAACTTCATGCAACTAATACACGACGAC AGCCTAACGTTCAAAGAAGACATACAAAAAGCGCAAGT AAGCGGGCAAGGGGACAGCCTACACGAACACATAGCGA ACCTAGCGGGGAGCCCGGCGATAAAAAAAGGGATACTA CAAACGGTAAAAGTAGTAGACGAACTAGTAAAAGTAAT GGGGCGACACAAACCGGAAAACATAGTAATAGAAATGG CGCGAGAAAACCAAACGACGCAAAAAGGGCAAAAAAA CAGCCGAGAACGAATGAAACGAATAGAAGAAGGGATAA AAGAACTAGGGAGCCAAATACTAAAAGAACACCCGGTA GAAAACACGCAACTACAAAACGAAAAACTATACCTATA CTACCTACAAAACGGGCGAGACATGTACGTAGACCAAG AACTAGACATAAACCGACTAAGCGACTACGACGTAGAC CACATAGTACCGCAAAGCTTCCTAAAAGACGACAGCAT AGACAACAAAGTACTAACGCGAAGCGACAAAAACCGAG GGAAAAGCGACAACGTACCGAGCGAAGAAGTAGTAAAA AAAATGAAAAACTACTGGCGACAACTACTAAACGCGAA ACTAATAACGCAACGAAAATTCGACAACCTAACGAAAG CGGAACGAGGGGGGCTAAGCGAACTAGACAAAGCGGGG TTCATAAAACGACAACTAGTAGAAACGCGACAAATAAC GAAACACGTAGCGCAAATACTAGACAGCCGAATGAACA CGAAATACGACGAAAACGACAAACTAATACGAGAAGTA AAAGTAATAACGCTAAAAAGCAAACTAGTAAGCGACTT CCGAAAAGACTTCCAATTCTACAAAGTACGAGAAATAA ACAACTACCACCACGCGCACGACGCGTACCTAAACGCG GTAGTAGGGACGGCGCTAATAAAAAAATACCCGAAACT AGAAAGCGAATTCGTATACGGGGACTACAAAGTATACG ACGTACGAAAAATGATAGCGAAAAGCGAACAAGAAATA	

	GGGAAAGCGACGGCGAAATACTTCTTCTACAGCAACAT AATGAACTTCTTCAAAACGGAAATAACGCTAGCGAACG GGGAAATACGAAAACGACCGCTAATAGAAACGAACGGG GAAACGGGGGAAATAGTATGGGACAAAGGGCGAGACTT CGCGACGGTACGAAAAGTACTAAGCATGCCGCAAGTAA ACATAGTAAAAAAAACGGAAGTACAAACGGGGGGGTTC AGCAAAGAAAGCATACTACCGAAACGAAACAGCGACAA ACTAATAGCGCGAAAAAAAGACTGGGACCCGAAAAAAT ACGGGGGGTTCGACAGCCCGACGGTAGCGTACAGCGTA CTAGTAGTAGCGAAAGTAGAAAAAGGGAAAAGCAAAAA ACTAAAAAGCGTAAAAGAACTACTAGGGATAACGATAA TGGAACGAAGCAGCTTCGAAAAAAACCCGATAGACTTC CTAGAAGCGAAAGGGTACAAAGAAGTAAAAAAAGACCT AATAATAAAACTACCGAAATACAGCCTATTCGAACTAGA AAACGGGCGAAAACGAATGCTAGCGAGCGCGGGGGAAC TACAAAAAGGGAACGAACTAGCGCTACCGAGCAAATAC GTAAACTTCCTATACCTAGCGAGCCACTACGAAAAACTA AAAGGGAGCCCGGAAGACAACGAACAAAAACAACTATT CGTAGAACAACACAAACACTACCTAGACGAAATAATAG AACAAATAAGCGAATTCAGCAAACGAGTAATACTAGCG GACGCGAACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGTACAACAA ACACCGAGACAAACCGATACGAGAACAAGCGGAAAACA TAATACACCTATTCACGCTAACGAACCTAGGGGCGCCGG CGGCGTTCAAATACTTCGACACGACGATAGACCGAAAA CGATACACGAGCACGAAAGAAGTACTAGACGCGACGCT AATACACCAAAGCATAACGGGGCTATACGAAACGCGAA TAGACCTAAGCCAACTAGGGGGGGACGGGGGGGGGAGC CCGAAAAAAAAAACGAAAAGTATGACTAGCCATCACATT TAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGA AAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTC GTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAAT TTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAA TAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	

Transcrito de Cas9 con AGG como los primeros tres nucleótidos para el uso con CleanCap™, 5' UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, secuencia de Kozak y 3' UTR de ALB	AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCAT GGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAG GTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGA ACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAA TGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAG AAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGA CACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATAC CACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAA GCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGA TCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGAC ACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGC GACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATAC AACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGG AGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCA AGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCG GGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGC ACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGG ACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAG ATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAA GAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG AGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAA GCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTG ACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGA AAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACG GATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAA GAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATG	256

	GACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGA AGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAA GCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCA ATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAG GACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAG AATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACA GCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACA ATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGG AGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACT TCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAG CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAA CTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCG TCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCA AGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGC TTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGA TCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAAC GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTG TTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC ATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCT GAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGC AGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGG AAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGC AAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCT GACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCG GACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTG GCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC AGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAA GACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGA GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCA GAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGA ACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA	

	ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACC TGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTG GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACAT CGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACA ACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAG AGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGA TCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAG AGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCAT CAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGC ACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAG TACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGT CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAA AGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACT ACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCG GAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGC GAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGA AAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGC AACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTT CTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCA GAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGA GAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGT CAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCA AGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAA AGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGC AAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGAT TCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCG CAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAA GCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCA AAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAA GCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAA GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAG	

	GGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTT CCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAA CAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGAT CAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAA ACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGA GACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCA CCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATT CAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACA CAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCT GAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAG AAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAG CATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGA AGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGT GTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTT AATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAA AATGGAAAGAACCTCGAG	
Transcrito de Cas9 con 5’ UTR de CMV, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, secuencia de Kozak y 3’ UTR de ALB	GGGCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGAC CTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGC CGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAA GAGTGACTCACCGTCCTTGACACGGCCACCATGGACAAG AAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT CGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGA GCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACAC AGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGAC AGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAA CAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAT CTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAA GGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTT CCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA TCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAA	257

	AGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTC GACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCT GGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCT GATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCG ACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGC TGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGAC GCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAG AAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAA AGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTG GCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATA CGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAG ACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGA GCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACA CAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATC AAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCT GAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACA AGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCA GGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTA CAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA CAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTG CTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCC GCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGA GAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAAC AGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCC GTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGAT TCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACA CCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAG CGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACA AGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGC CTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACA AAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGC ATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACC	

	TGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAG CTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGAC AGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGC AAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCA AGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGAC ATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAA GACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC ACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGA GAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAA GCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGA CAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACA GAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAG GGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGG AAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCA AGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACAC AAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAA CCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAA AGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGG AAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACAC AGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGA ACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATC AACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCG CAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGT CCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC AACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAA CTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACAC AGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGA GGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAG ACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCG CACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGAC GAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCAC ACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACT	

	TCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACC ACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACA GCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATT CGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGA TGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACA GCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTC AAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAA GAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAA TCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGA AAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAA GACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCA TCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGA AAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGA CAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAA GGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCA AGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGC TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGG ATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGC CGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAG AGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAA CGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTA CCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGG AAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCAC AAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGA ATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGG ACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAG CCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTC ACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTA CTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCA CAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGC ATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCA GCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAG AGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCA	

	GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAA TAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCC AACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTT GCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAA GAACCTCGAG	
Transcrito de Cas9 con 5' UTR de HBB, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, secuencia de Kozak y 3' UTR de HBB	GGGACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAAC CTCAAACAGACACCGGATCTGCCACCATGGACAAGAAG TACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGG ATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCA AGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGC ATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGC GGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAG CAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGC TACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGT CGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCT GGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCT TCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAG TACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGAC AGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGC ACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGAT CGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACA AGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGT TCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCA AAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAG ACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGA AGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGG GACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAG AAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGAC GACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCA GTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCG ACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAG AAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAG	258

	AGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAA GGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGG AAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGA TACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAA GTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAG AAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTG AGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCA CCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAA GACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAACAGA GAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTA CTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCG CATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCG TGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGC ACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGA ACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTG CTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAG GTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATT CCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGC TGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTG AAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAG CGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAA GCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAG GACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACAT CCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGA CAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCAC ACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGA AGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCT GATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAA TCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAA ACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCA AGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGA GACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAG CCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGG	

	TCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAG CCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCA GACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGA ATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAG CCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGC TGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACG GAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAAC AGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAG AGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCT GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTA CTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGA GAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGA CTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACA GCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCAC AGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAA AACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACT GAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCC AGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACCAC GCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGC ACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCG TCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATG ATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGC AAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAA GACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGA GACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATC GTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAA GGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGA CAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATC CTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAA GAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACA GCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGG TCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAG	

	GAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTT CGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGAT ACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCG AAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAG AATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACG AACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACC TGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAA GACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAA GCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATT CAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACA AGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCG ATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCAC ACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTT CGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAA AGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATC ACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCT GGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA AAGGTCTAGCTAGCGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCT ATTAAAGGTTCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACTACTAAACT GGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGC CTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCCTCGAG	
Transcrito de Cas9 con 5’ UTR de XBG, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, secuencia de Kozak, y 3’ UTR de XBG	GGGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCCGGATCTG CCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATC GGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGA ATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAA ACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGA GCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGA AGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAG CAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACA GACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGA	259

	AGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCT GAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACC TGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCG GACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAA CGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAA GACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCA CAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAA CCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAA GAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGC TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTG CTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTG GCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGA CATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGC TGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCAC CAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCA GCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGA GCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCA AGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTG GAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCT GAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCG ACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAA CTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCG TTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCT GACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAG AGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCG AAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTC GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAT GACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCT ACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGA ATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAA	

	GGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGG TCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAG ATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGA AGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACC TGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAAC GAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGAC ACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAA GACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTC ATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGG AAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGC GACGGATTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCAC GACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGC ACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACA TCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGA ATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGA AATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAG AAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAG GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACAC CCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTA CCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGA CCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACG TCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACA GCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACG CAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACA AAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGG CAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAG ATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAG AAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGC	

	GACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAA ATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAAC GCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAA GCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAA TCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACA TCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACG GAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGA GAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTT CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCA ACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTC AGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAA GCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGT ACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTC CTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAA GCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCA TGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTC CTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCT GATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGA AAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAA CTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTA CGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCT GAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGT TCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCG AACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCA GACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACA TCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGG CAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAG AGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACT GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAA TCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC CCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCACCAGCCTC	

	AAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCTACATAATACCA ACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCCCAAAATGTAGCC ATTCGTATCTGCTCCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACA TTCTCTCGAG	
Transcrito de Cas9 con AGG como los primeros tres nucleótidos para usar con CleanCap™, 5' UTR de XBG, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, secuencia de Kozak, y 3' UTR de XBG	AGGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCCGGATCTG CCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATC GGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGA ATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAA ACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGA GCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGA AGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAG CAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACA GACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGA AGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCT GAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACC TGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCG GACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAA CGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAA GACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCA CAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAA CCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAA GAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGC TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTG CTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTG GCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGA CATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGC TGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCAC CAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCA	260

	GCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGA GCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCA AGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTG GAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCT GAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCG ACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAA CTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCG TTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCT GACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAG AGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCG AAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTC GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAT GACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCT ACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGA ATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAA GGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGG TCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAG ATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGA AGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACC TGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAAC GAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGAC ACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAA GACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTC ATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGG AAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACA AGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGC GACGGATTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCAC GACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGC ACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACA TCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGA ATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGA	

	AATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAG AAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAG GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACAC CCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTA CCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGA CCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACG TCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACA GCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACG CAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACA AAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGG CAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAG ATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAG AAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGC GACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAA ATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAAC GCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAA GCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAA TCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACA TCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACG GAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGA GAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTT CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCA ACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTC AGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAA GCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGT ACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTC CTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAA GCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCA TGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTC	

	CTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCT GATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGA AAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAA CTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTA CGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCT GAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGT TCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCG AACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCA GACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACA TCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGG CAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAG AGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACT GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAA TCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC CCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCACCAGCCTC AAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCTACATAATACCA ACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCCCAAAATGTAGCC ATTCGTATCTGCTCCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACA TTCTCTCGAG	
Transcrito de Cas9 con AGG como los primeros tres nucleótidos para usar con CleanCap™, 5' UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204,	AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCAT GGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAG GTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGA ACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAA TGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAG AAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGA CACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATAC	261

secuencia de Kozak y 3' UTR de ALB	CACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAA GCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGA TCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGAC ACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGC GACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATAC AACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGG AGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCA AGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCG GGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGC ACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGG ACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAG ATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAA GAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG AGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAA GCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTG ACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGA AAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACG GATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAA GAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATG GACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGA AGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAA GCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCA ATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAG GACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAG AATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACA GCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACA ATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGG AGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACT TCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAG CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAA CTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAA GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCG	

	TCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCA AGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGC TTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGA TCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAAC GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTG TTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC ATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCT GAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGC AGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGG AAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGC AAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCT GACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCG GACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTG GCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC AGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAA GACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGA GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCA GAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGA ACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACC TGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTG GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACAT CGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACA ACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAG AGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGA TCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAG AGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCAT CAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGC ACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAG TACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGT CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAA	

	AGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACT ACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCG GAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGC GAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGA AAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGC AACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTT CTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCA GAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGA GAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGT CAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCA AGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAA AGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGC AAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGAT TCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCG CAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAA GCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCA AAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAA GCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAA GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAG GGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTT CCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAA CAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGAT CAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAA ACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGA GACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCA CCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATT CAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACA CAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCT GAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAG AAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAG	

	CATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGA AGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGT GTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTT AATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAA AATGGAAAGAACCTCGAG	
secuencia poli-A 30/30/39	No usado	262
secuencia poli-A 100	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA	263
ARN de guía única G209 dirigido al gen TTR de ratón	AAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAG AGCCACC	264
ORF que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis que usa codones de mínima uridina, con codones de inicio y parada	ATGGCAGCATTCAAGCCGAACTCGATCAACTACATCCTG GGACTGGACATCGGAATCGCATCGGTCGGATGGGCAAT GGTCGAAATCGACGAAGAAGAAAACCCGATCAGACTGA TCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTC CCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACT GGCAAGATCGGTCAGAAGACTGACAAGAAGAAGAGCAC ACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTGAAGAGAGAA GGAGTCCTGCAGGCAGCAAACTTCGACGAAAACGGACT GATCAAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGCAGCTGAGAG CAGCAGCACTGGACAGAAAGCTGACACCGCTGGAATGG TCGGCAGTCCTGCTGCACCTGATCAAGCACAGAGGATAC CTGTCGCAGAGAAAGAACGAAGGAGAAACAGCAGACAA GGAACTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTCGCAGGAAACG CACACGCACTGCAGACAGGAGACTTCAGAACACCGGCA GAACTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAGGAATCGGGACA CATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTCGCACACATTCTC GAGAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTCG AAAAGCAGAAGGAATTCGGAAACCCGCACGTCTCGGGA	265

	GGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTGATGACACA GAGACCGGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGC TGGGACACTGCACATTCGAACCGGCAGAACCGAAGGCA GCAAAGAACACATACACAGCAGAAAGATTCATCTGGCT GACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGAACAGGGAT CGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACACTG ATGGACGAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTGACATACGC ACAGGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGACACAGCAT TCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAACGCAGAA GCATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAAT CTCGAGAGCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGA AGTCGCCGCTGAACCTGTCGCCGGAACTGCAGGACGAA ATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACAGACGAAGAC ATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAAAT CCTGGAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTT CGTCCAGATCTCGCTGAAGGCACTGAGAAGAATCGTCCC GCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAAGCATGCG CAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAGAACACA GAAGAAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGA AATCAGAAACCCGGTCGTCCTGAGAGCACTGTCGCAGGC AAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTCAGAAGATACGGAT CGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAAGTC GGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAAAGAG ACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGAAAAGGCAGCA GCAAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGTCGGAGAA CCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGA ACAGCAGCACGGAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAAA TCAACCTGGGAAGACTGAACGAAAAGGGATACGTCGAA ATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACATGGGACGAC TCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCCTGGGATCGGAAAAC CAGAACAAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACTTCAA CGGAAAGGACAACTCGAGAGAATGGCAGGAATTCAAGG CAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAAG	

	CAGAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGATT CAAGGAAAGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACA GATTCCTGTGCCAGTTCGTCGCAGACAGAATGAGACTGA CAGGAAAGGGAAAGAAGAGAGTCTTCGCATCGAACGGA CAGATCACAAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAG AAAGGTCAGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACTGG ACGCAGTCGTCGTCGCATGCTCGACAGTCGCAATGCAGC AGAAGATCACAAGATTCGTCAGATACAAGGAAATGAAC GCATTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAGA AGTCCTGCACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGA ATTCTTCGCACAGGAAGTCATGATCAGAGTCTTCGGAAA GCCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAAGCAGACACAC TGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGCTGTCG TCGAGACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTCACACCGCT GTTCGTCTCGAGAGCACCGAACAGAAAGATGTCGGGAC AGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCAAAGAGACTG GACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCCGCTGACACA GCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAG AAAGAGAACCGAAGCTGTACGAAGCACTGAAGGCAAGA CTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCATTCGC AGAACCGTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACAGAA CACAGCAGGTCAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCCAG AAGACAGGAGTCTGGGTCAGAAACCACAACGGAATCGC AGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTCTTCGAAA AGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATCTACTCGTGGC AGGTCGCAAAGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCGTC CAGGGAAAGGACGAAGAAGACTGGCAGCTGATCGACGA CTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGCACCCGAACGACCT GGTCGAAGTCATCACAAAGAAGGCAAGAATGTTCGGAT ACTTCGCATCGTGCCACAGAGGAACAGGAAACATCAAC ATCAGAATCCACGACCTGGACCACAAGATCGGAAAGAA CGGAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGCACTGT CGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACTGGGAAAGGAA	

	ATCAGACCGTGCAGACTGAAGAAGAGACCGCCGGTCAG ATCCGGAAAGAGAACAGCAGACGGATCGGAATTCGAAT CGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCGAATGA	
ORF que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis que usa codones de mínima uridina (sin codones de inicio o parada; adecuado para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)	GCAGCATTCAAGCCGAACTCGATCAACTACATCCTGGGA CTGGACATCGGAATCGCATCGGTCGGATGGGCAATGGTC GAAATCGACGAAGAAGAAAACCCGATCAGACTGATCGA CCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTCCCGA AGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCA AGATCGGTCAGAAGACTGACAAGAAGAAGAGCACACAG ACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTGAAGAGAGAAGGAG TCCTGCAGGCAGCAAACTTCGACGAAAACGGACTGATC AAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGCAGCTGAGAGCAGC AGCACTGGACAGAAAGCTGACACCGCTGGAATGGTCGG CAGTCCTGCTGCACCTGATCAAGCACAGAGGATACCTGT CGCAGAGAAAGAACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGA ACTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTCGCAGGAAACGCAC ACGCACTGCAGACAGGAGACTTCAGAACACCGGCAGAA CTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAGGAATCGGGACACAT CAGAAACCAGAGATCGGACTACTCGCACACATTCTCGAG AAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTCGAAA AGCAGAAGGAATTCGGAAACCCGCACGTCTCGGGAGGA CTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTGATGACACAGAG ACCGGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGCTGG GACACTGCACATTCGAACCGGCAGAACCGAAGGCAGCA AAGAACACATACACAGCAGAAAGATTCATCTGGCTGAC AAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGAACAGGGATCGG AAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACACTGATG GACGAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTGACATACGCACA GGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGACACAGCATTCT TCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAACGCAGAAGCA TCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCTCG AGAGCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAGTC GCCGCTGAACCTGTCGCCGGAACTGCAGGACGAAATCG	266

	GAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACAGACGAAGACATCA CAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAAATCCTG GAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTTCGTC CAGATCTCGCTGAAGGCACTGAGAAGAATCGTCCCGCTG ATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAAGCATGCGCAGA AATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAGAACACAGAAG AAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAAATC AGAAACCCGGTCGTCCTGAGAGCACTGTCGCAGGCAAG AAAGGTCATCAACGGAGTCGTCAGAAGATACGGATCGC CGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAAGTCGGA AAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAAAGAGACA GGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGAAAAGGCAGCAGCA AAGTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGTCGGAGAACCG AAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAACA GCAGCACGGAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAAATCA ACCTGGGAAGACTGAACGAAAAGGGATACGTCGAAATC GACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACATGGGACGACTCG TTCAACAACAAGGTCCTGGTCCTGGGATCGGAAAACCAG AACAAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACTTCAACGG AAAGGACAACTCGAGAGAATGGCAGGAATTCAAGGCAA GAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAAGCAG AGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGATTCAA GGAAAGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGAT TCCTGTGCCAGTTCGTCGCAGACAGAATGAGACTGACAG GAAAGGGAAAGAAGAGAGTCTTCGCATCGAACGGACAG ATCACAAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAA GGTCAGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACTGGACG CAGTCGTCGTCGCATGCTCGACAGTCGCAATGCAGCAGA AGATCACAAGATTCGTCAGATACAAGGAAATGAACGCA TTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAGAAGT CCTGCACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATT CTTCGCACAGGAAGTCATGATCAGAGTCTTCGGAAAGCC GGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAAGCAGACACACTGG	

	AAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGCTGTCGTCG AGACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTCACACCGCTGTTC GTCTCGAGAGCACCGAACAGAAAGATGTCGGGACAGGG ACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCAAAGAGACTGGACG AAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCCGCTGACACAGCTGA AGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAGAAAGA GAACCGAAGCTGTACGAAGCACTGAAGGCAAGACTGGA AGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCATTCGCAGAAC CGTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACAGAACACAG CAGGTCAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCCAGAAGAC AGGAGTCTGGGTCAGAAACCACAACGGAATCGCAGACA ACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTCTTCGAAAAGGGA GACAAGTACTACCTGGTCCCGATCTACTCGTGGCAGGTC GCAAAGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCGTCCAGGG AAAGGACGAAGAAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCGT TCAACTTCAAGTTCTCGCTGCACCCGAACGACCTGGTCG AAGTCATCACAAAGAAGGCAAGAATGTTCGGATACTTC GCATCGTGCCACAGAGGAACAGGAAACATCAACATCAG AATCCACGACCTGGACCACAAGATCGGAAAGAACGGAA TCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGCACTGTCGTTCC AGAAGTACCAGATCGACGAACTGGGAAAGGAAATCAGA CCGTGCAGACTGAAGAAGAGACCGCCGGTCAGATCCGG AAAGAGAACAGCAGACGGATCGGAATTCGAATCGCCGA AGAAGAAGAGAAAGGTCGAA	
Transcrito que comprende la SEQ ID NO: 265 (que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis)	GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGG ATCCGCCACCATGGCAGCATTCAAGCCGAACTCGATCAA CTACATCCTGGGACTGGACATCGGAATCGCATCGGTCGG ATGGGCAATGGTCGAAATCGACGAAGAAGAAAACCCGA TCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAG CAGAAGTCCCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCA AGAAGACTGGCAAGATCGGTCAGAAGACTGACAAGAAG AAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTGA AGAGAGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACTTCGACGAA	267

	AACGGACTGATCAAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGCA GCTGAGAGCAGCAGCACTGGACAGAAAGCTGACACCGC TGGAATGGTCGGCAGTCCTGCTGCACCTGATCAAGCACA GAGGATACCTGTCGCAGAGAAAGAACGAAGGAGAAACA GCAGACAAGGAACTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTCGC AGGAAACGCACACGCACTGCAGACAGGAGACTTCAGAA CACCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAGGAA TCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTCGCA CACATTCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCT GCTGTTCGAAAAGCAGAAGGAATTCGGAAACCCGCACG TCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTG ATGACACAGAGACCGGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCA GAAGATGCTGGGACACTGCACATTCGAACCGGCAGAAC CGAAGGCAGCAAAGAACACATACACAGCAGAAAGATTC ATCTGGCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGA ACAGGGATCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAG CAACACTGATGGACGAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTG ACATACGCACAGGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGA CACAGCATTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACA ACGCAGAAGCATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATAC CACGCAATCTCGAGAGCACTGGAAAAGGAAGGACTGAA GGACAAGAAGTCGCCGCTGAACCTGTCGCCGGAACTGC AGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACA GACGAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCA GCCGGAAATCCTGGAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTT CGACAAGTTCGTCCAGATCTCGCTGAAGGCACTGAGAAG AATCGTCCCGCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGACG AAGCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAG AAGAACACAGAAGAAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCC GGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTCGTCCTGAGAGCAC TGTCGCAGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTCAGA AGATACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGC AAGAGAAGTCGGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAA	

	TCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGA AAAGGCAGCAGCAAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAACT TCGTCGGAGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTG AGACTGTACGAACAGCAGCACGGAAAGTGCCTGTACTC GGGAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACTGAACGAAAAGG GATACGTCGAAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAA CATGGGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCCTGG GATCGGAAAACCAGAACAAGGGAAACCAGACACCGTAC GAATACTTCAACGGAAAGGACAACTCGAGAGAATGGCA GGAATTCAAGGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGA GATCGAAGAAGCAGAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGAC GAAGACGGATTCAAGGAAAGAAACCTGAACGACACAAG ATACGTCAACAGATTCCTGTGCCAGTTCGTCGCAGACAG AATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAAGAGAGTCTTCG CATCGAACGGACAGATCACAAACCTGCTGAGAGGATTCT GGGGACTGAGAAAGGTCAGAGCAGAAAACGACAGACAC CACGCACTGGACGCAGTCGTCGTCGCATGCTCGACAGTC GCAATGCAGCAGAAGATCACAAGATTCGTCAGATACAA GGAAATGAACGCATTCGACGGAAAGACAATCGACAAGG AAACAGGAGAAGTCCTGCACCAGAAGACACACTTCCCG CAGCCGTGGGAATTCTTCGCACAGGAAGTCATGATCAGA GTCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGA AGCAGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAG AAAAGCTGTCGTCGAGACCGGAAGCAGTCCACGAATAC GTCACACCGCTGTTCGTCTCGAGAGCACCGAACAGAAAG ATGTCGGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGC AAAGAGACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCC CGCTGACACAGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATG GTCAACAGAGAAAGAGAACCGAAGCTGTACGAAGCACT GAAGGCAAGACTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAA AGGCATTCGCAGAACCGTTCTACAAGTACGACAAGGCA GGAAACAGAACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAGAGTCGA ACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTCAGAAACCACA	

	ACGGAATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGAC GTCTTCGAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATC TACTCGTGGCAGGTCGCAAAGGGAATCCTGCCGGACAG AGCAGTCGTCCAGGGAAAGGACGAAGAAGACTGGCAGC TGATCGACGACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGCACC CGAACGACCTGGTCGAAGTCATCACAAAGAAGGCAAGA ATGTTCGGATACTTCGCATCGTGCCACAGAGGAACAGGA AACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGACCACAAGAT CGGAAAGAACGGAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGA CAGCACTGTCGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACTGG GAAAGGAAATCAGACCGTGCAGACTGAAGAAGAGACCG CCGGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCAGACGGATCGGA ATTCGAATCGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCGAATGAT AGCTAGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGA TCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTG TTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGC CACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGC ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGG TGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATG G	
Secuencia de aminoácidos de Cas9 de Neisseria meningitidis	MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLG VRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRT RRLLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKL TPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGV AGNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSDYSHT FSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQR PALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKL NNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLL GLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEG LKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEI LEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIY GDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVING	268

	VVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDRE KAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGK EINLGRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQ NKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRI LLQKFDEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKG KKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVV ACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKT HFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLA EKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSAK RLDEGVSVLRVPLTQLKLKDLEKMVNREREPKLYEALKAR LEAHKDDPAKAFAEPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQK TGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYSWQ VAKGILPDRAVVQGKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVE VITKKARMFGYFASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGI GVKTALSFQKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTADGS EFESPKKKRKVE	
ARN de guía única G390 dirigido al gen TTR de rata	mG*mC*mC*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	269
ARNtr	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	270
	Not Used	271
ARN de guía única G534 dirigido al gen TTR de rata	mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	272
Secuencia modificada de ARNsg G000395	mG*mC*mA*AUGGUGUAGCGGGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*	273

inactiva truncada 5’	mU	
NLS de SV40	PKKKRKV	274
NLS de SV40 alterno	PKKKRRV	275
NLS de nucleoplasmina	KRPAATKKAGQAKKKK	276
Secuencia de Kozak ejemplar	gccRccAUGG	277
Secuencia de Kozak ejemplar	gccgccRccAUGG	278

* = Enlace PS; 'm' = nucleótido 2'-O-Me

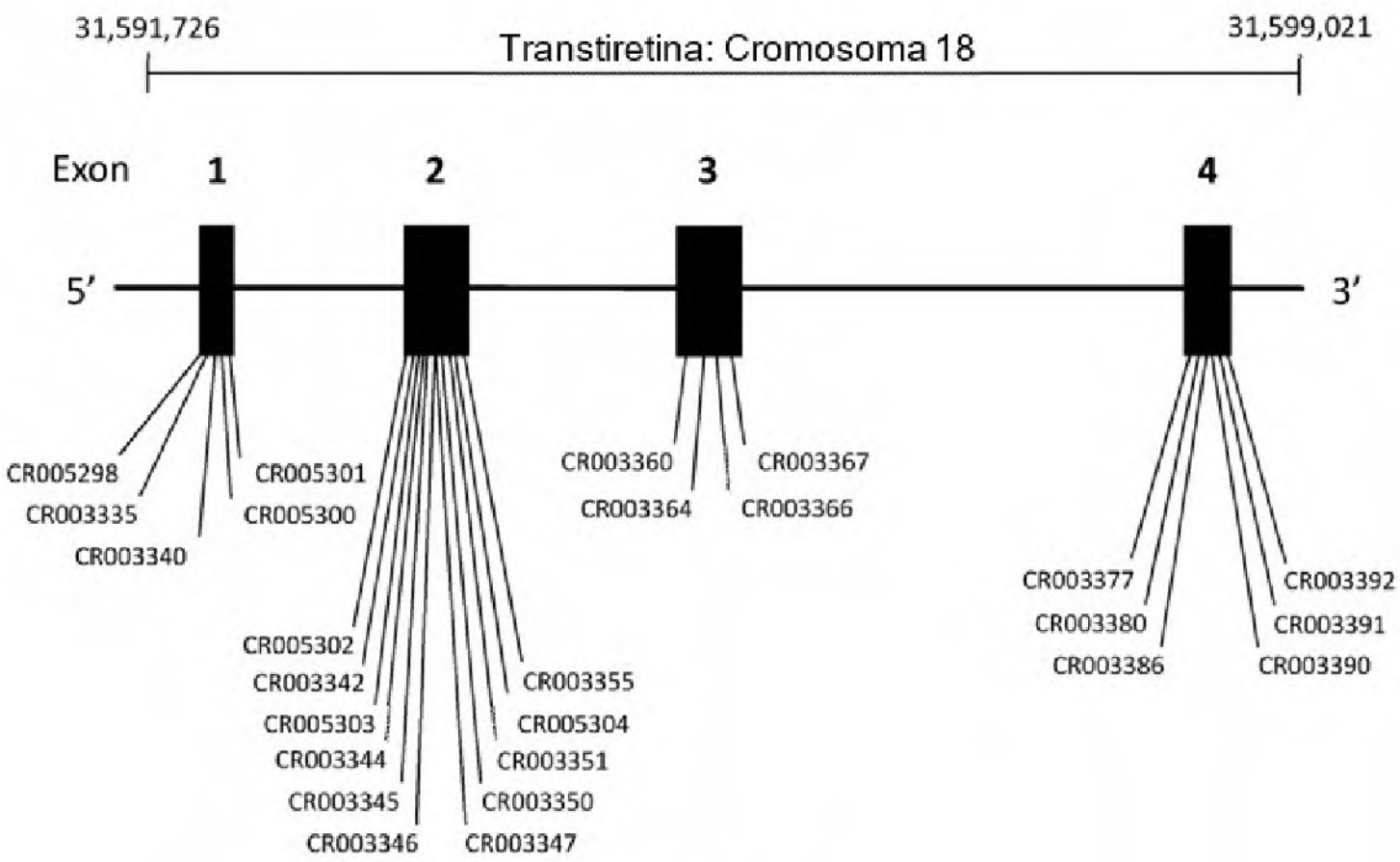

31,591,726
Transtiretina: Cromosoma 18
31,599,021
Exon
1
2
3
4
5'
3'
CR005298
CR003335
CR003340
CR005301
CR005300
CR005302
CR003342
CR005303
CR003344
CR003345
CR003346
CR003347
CR003350
CR003351
CR005304
CR003355
CR003360
CR003364
CR003367
CR003366
CR003377
CR003380
CR003386
CR003392
CR003391
CR003390

Figura 1

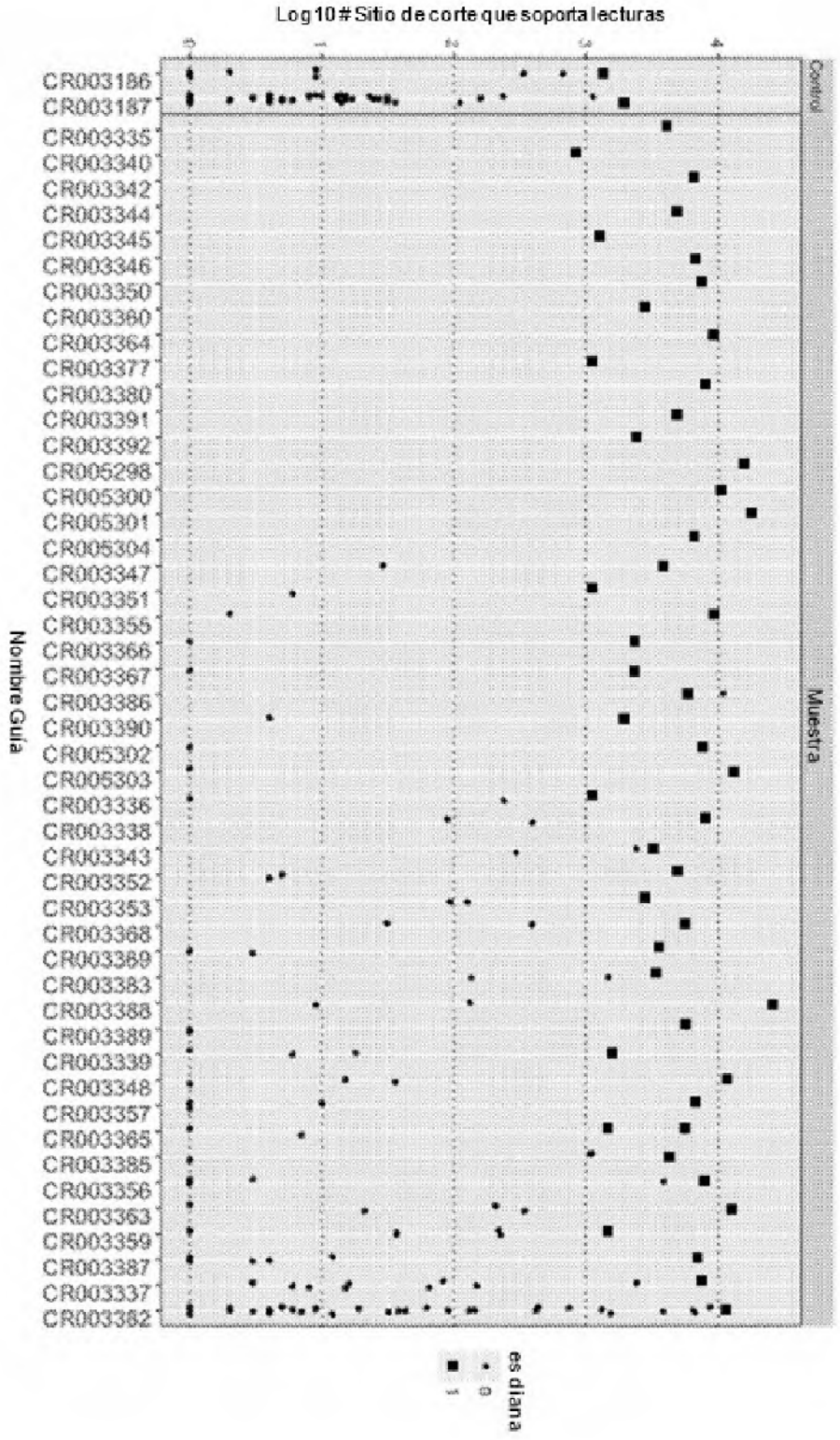

Log10 # Sitio de corte que soporta lecturas
Nombre Guía
CR003186
CR003187
CR003335
CR003340
CR003342
CR003344
CR003345
CR003346
CR003350
CR003360
CR003364
CR003377
CR003380
CR003391
CR003392
CR005298
CR005300
CR005301
CR005304
CR003347
CR003351
CR003355
CR003366
CR003367
CR003386
CR003390
CR005302
CR005303
CR003336
CR003338
CR003343
CR003352
CR003353
CR003368
CR003369
CR003383
CR003388
CR003389
CR003339
CR003348
CR003357
CR003365
CR003385
CR003356
CR003363
CR003359
CR003387
CR003337
CR003382
Control
Muestra
es diana
0
1

Figura 2

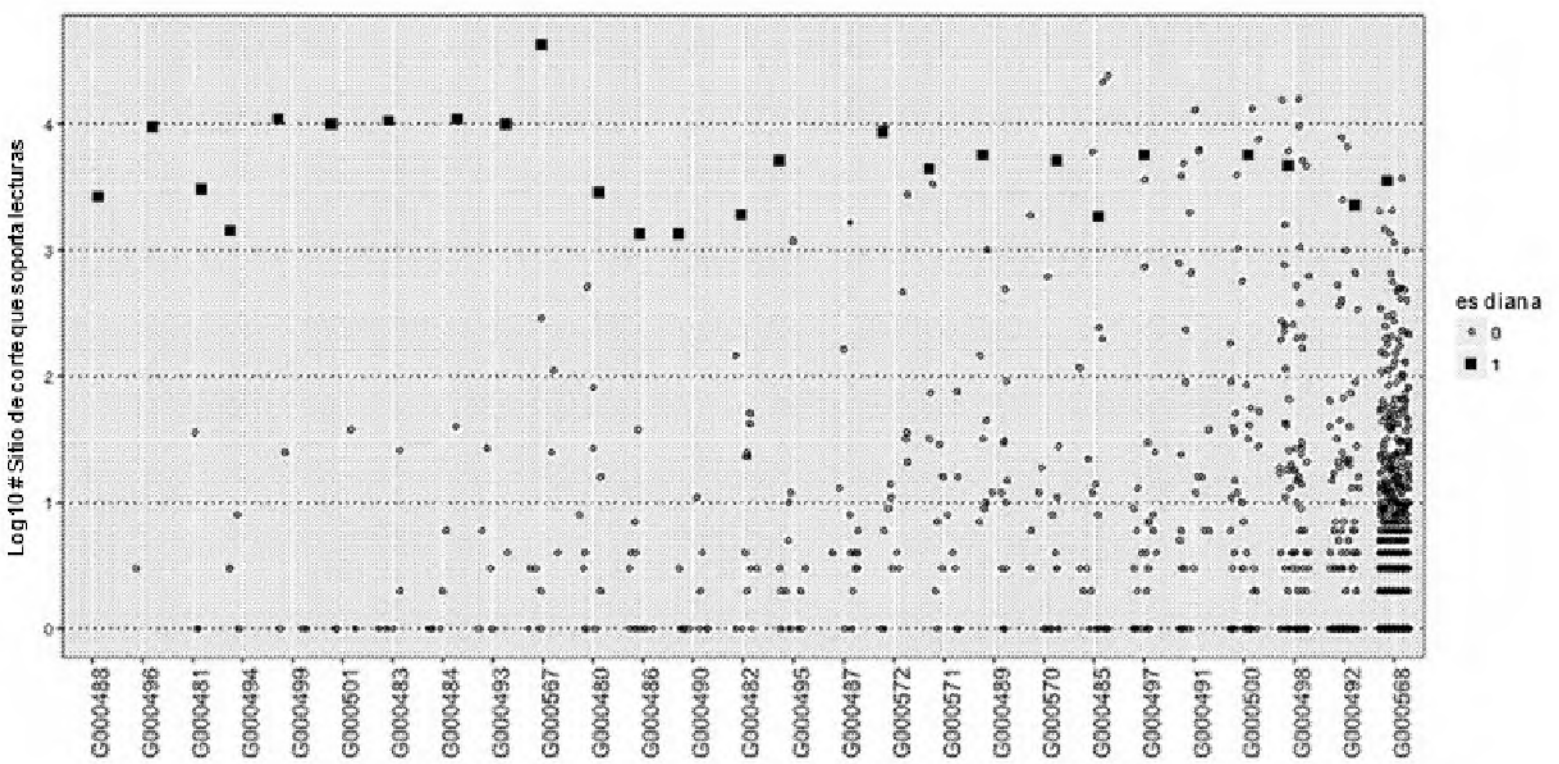

Log10 # Sitio de corte que soporta lecturas
0
1
2
3
4
G000488
G000496
G000481
G000494
G000499
G000501
G000483
G000484
G000493
G000567
G000480
G000486
G000490
G000482
G000495
G000487
G000572
G000571
G000489
G000570
G000485
G000497
G000491
G000500
G000498
G000492
G000568
es diana
0
1

Figura 3

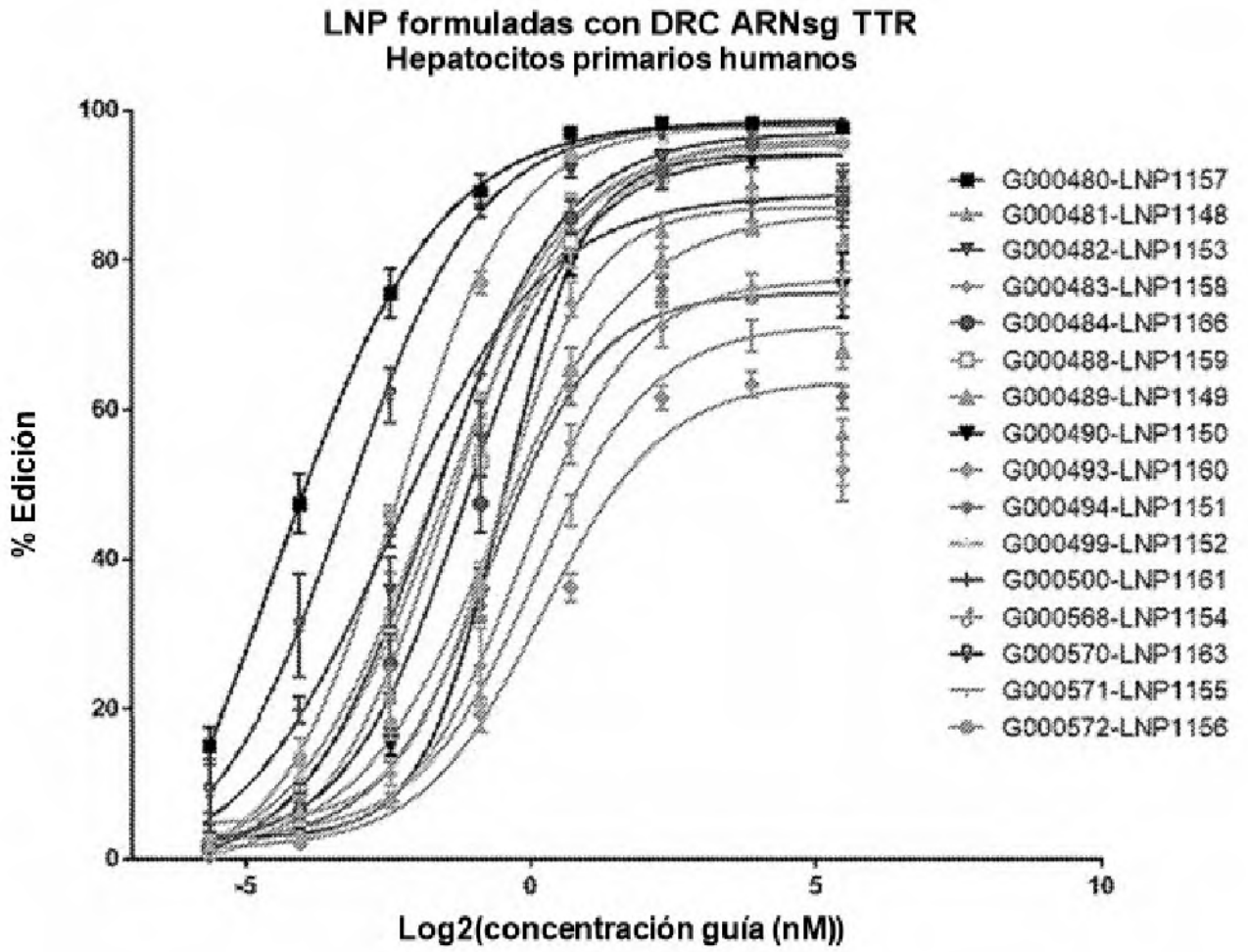

LNP formuladas con DRC ARNsg TTR
Hepatocitos primarios humanos
% Edición
100
80
60
40
20
0
-5
0
5
10
Log2(concentración guía (nM))
G000480-LNP1157
G000481-LNP1148
G000482-LNP1153
G000483-LNP1158
G000484-LNP1166
G000488-LNP1159
G000489-LNP1149
G000490-LNP1150
G000493-LNP1160
G000494-LNP1151
G000499-LNP1152
G000500-LNP1161
G000568-LNP1154
G000570-LNP1163
G000571-LNP1155
G000572-LNP1156

Figura 4

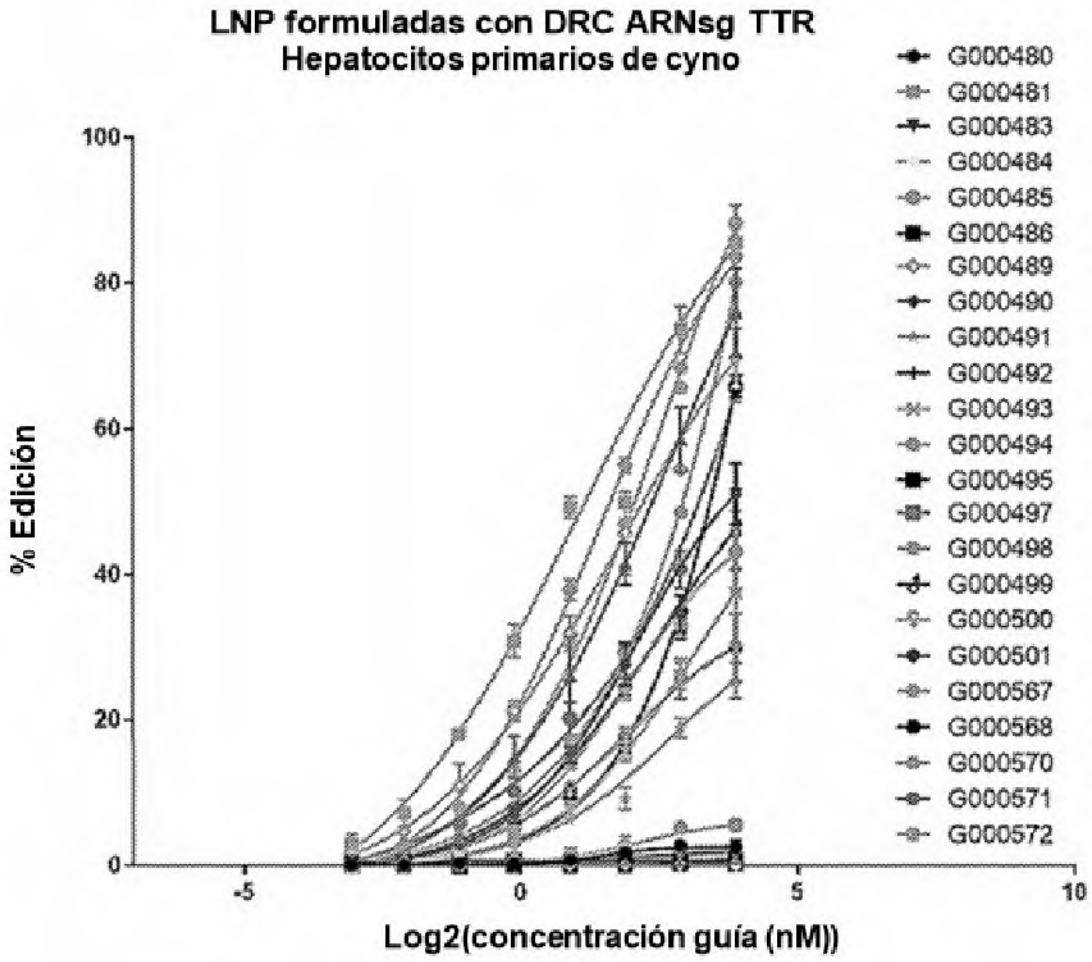

LNP formuladas con DRC ARNsg TTR
Hepatocitos primarios de cyno
% Edición
100
80
60
40
20
0
-5
0
5
10
Log2(concentración guía (nM))
G000480
G000481
G000483
G000484
G000485
G000486
G000489
G000490
G000491
G000492
G000493
G000494
G000495
G000497
G000498
G000499
G000500
G000501
G000567
G000568
G000570
G000571
G000572

Figura 5

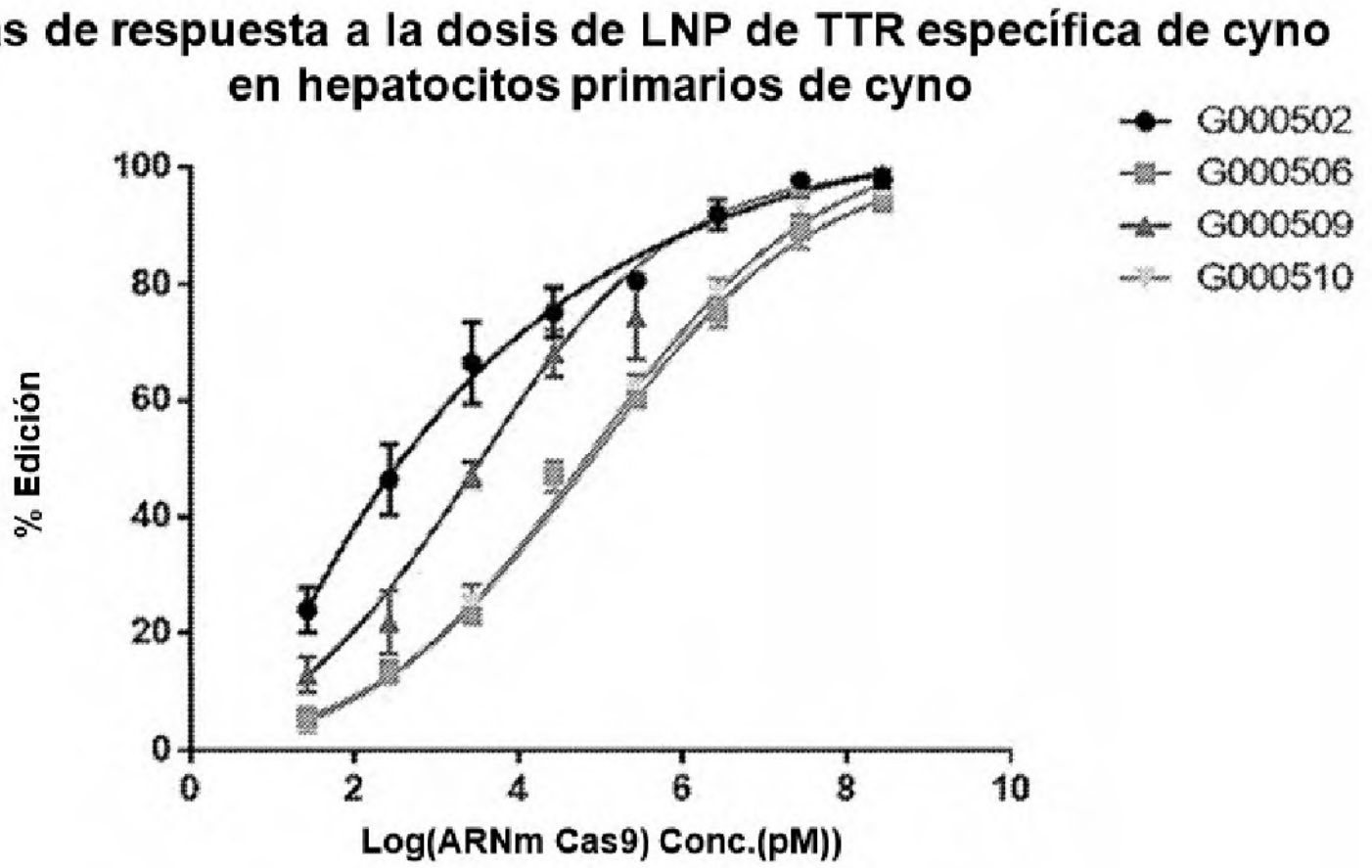

Curvas de respuesta a la dosis de LNP de TTR específica de cyno en hepatocitos primarios de cyno
G000502
G000506
G000509
G000510
% Edición
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
Log(ARNm Cas9) Conc.(pM))

Figura 6

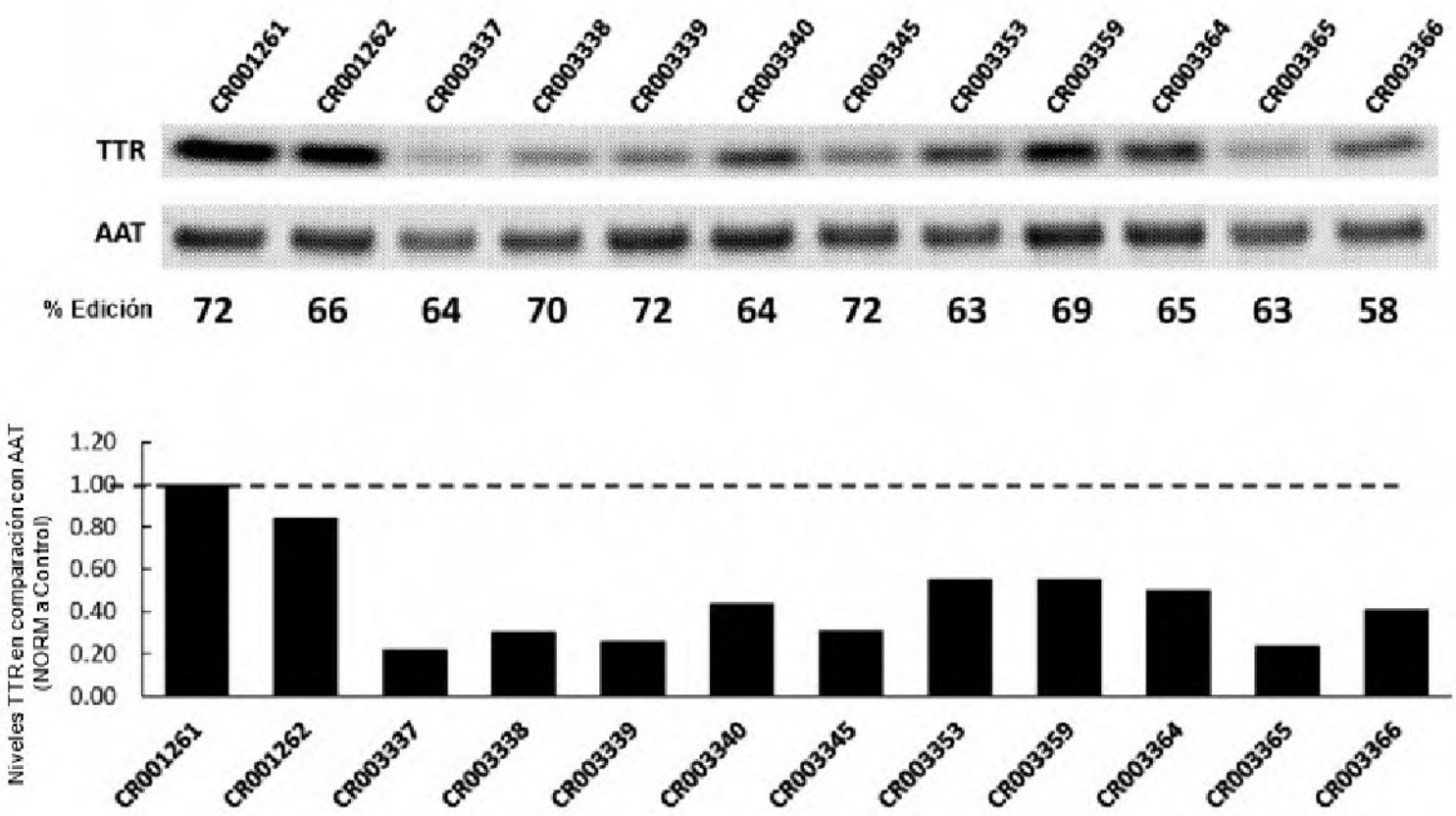

CR001261
CR001262
CR003337
CR003338
CR003339
CR003340
CR003345
CR003353
CR003359
CR003364
CR003365
CR003366
TTR
AAT
% Edición
72
66
64
70
72
64
72
63
69
65
63
58
Niveles TTR en comparación con AAT (NORM a Control)
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00

Figura 7

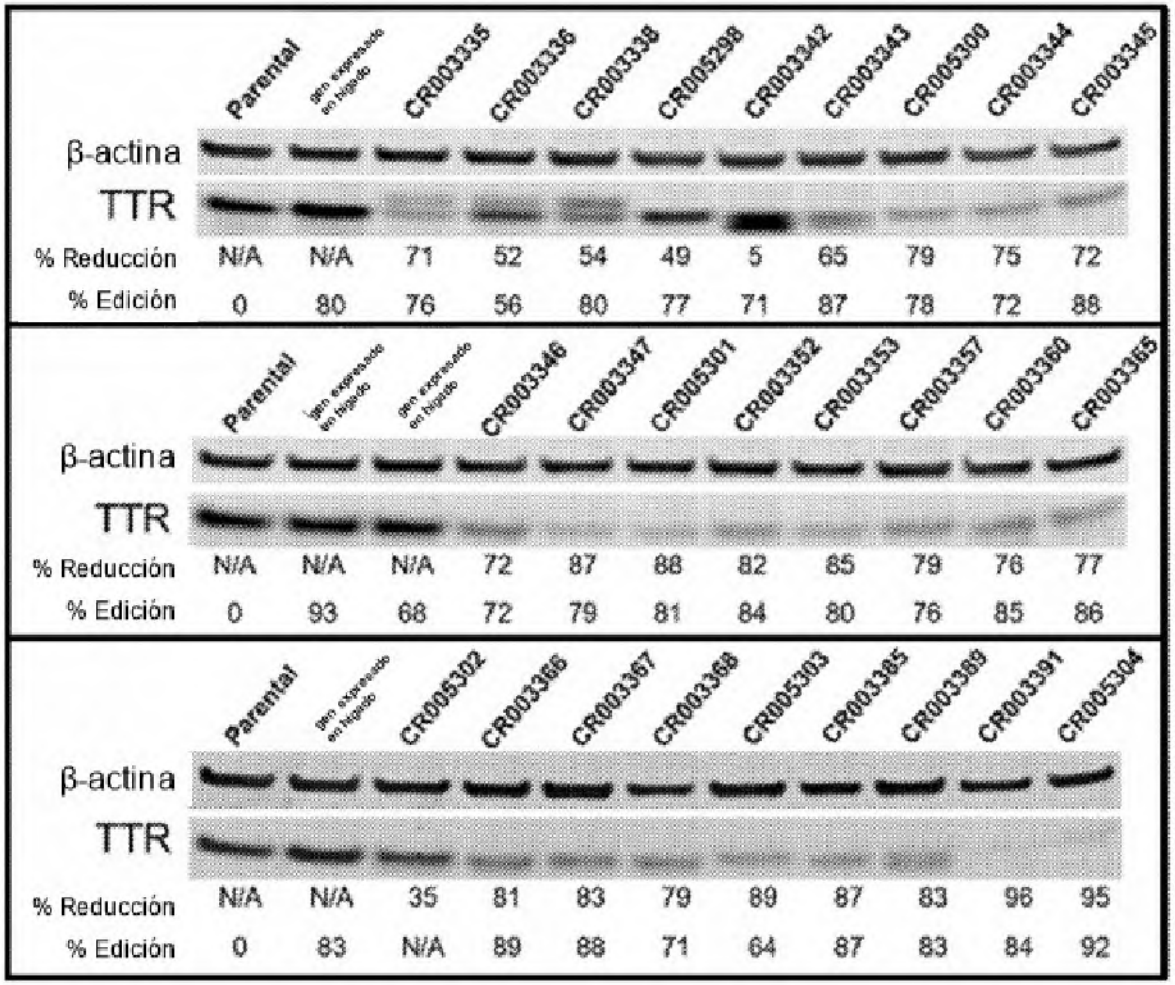

Parental
gen expresado en hígado
CR003335
CR003336
CR003338
CR005298
CR003342
CR003343
CR005300
CR003344
CR003345
β-actina
TTR
% Reducción N/A N/A 71 52 54 49 5 65 79 75 72
% Edición 0 80 76 56 80 77 71 87 78 72 88
Parental
gen expresado en hígado
gen expresado en hígado
CR003346
CR003347
CR005301
CR003352
CR003353
CR003357
CR003360
CR003365
β-actina
TTR
% Reducción N/A N/A N/A 72 87 88 82 85 79 76 77
% Edición 0 93 68 72 79 81 84 80 76 85 86
Parental
gen expresado en hígado
CR005302
CR003366
CR003367
CR003368
CR005303
CR003385
CR003389
CR003391
CR005304
β-actina
TTR
% Reducción N/A N/A 35 81 83 79 89 87 83 96 95
% Edición 0 83 N/A 89 88 71 64 87 83 84 92

Figura 8

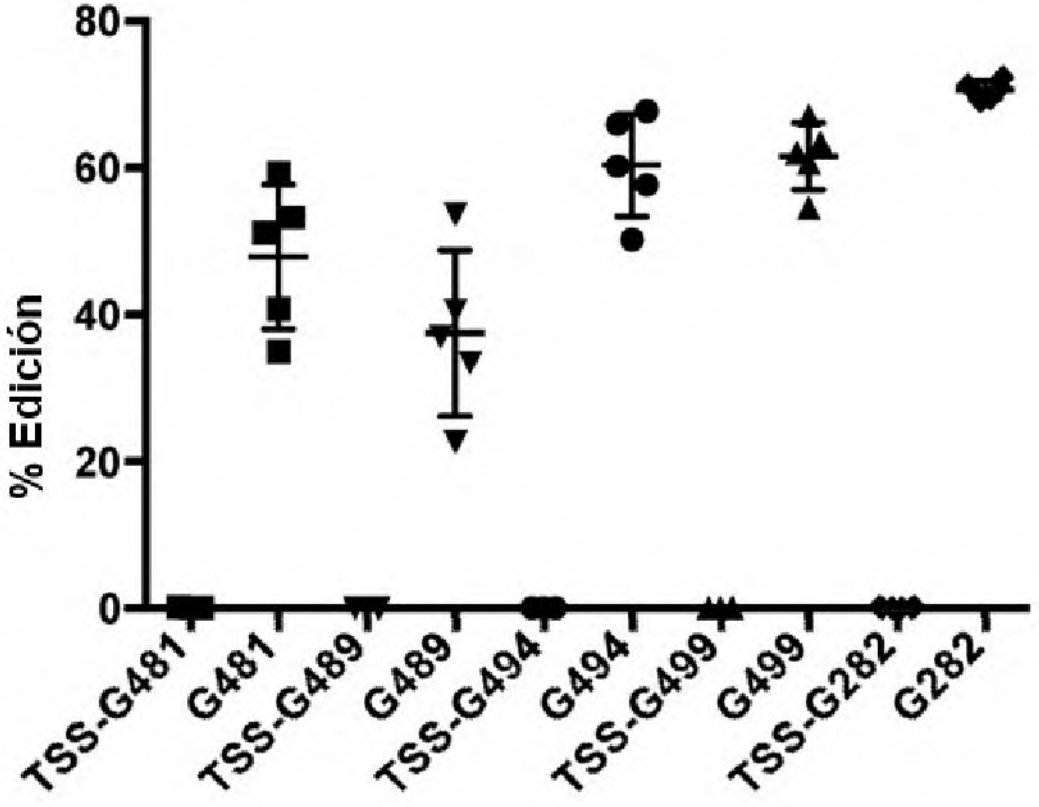

80
60
40
20
0
% Edición
TSS-G481
G481
TSS-G489
G489
TSS-G494
G494
TSS-G499
G499
TSS-G282
G282

Figura 9

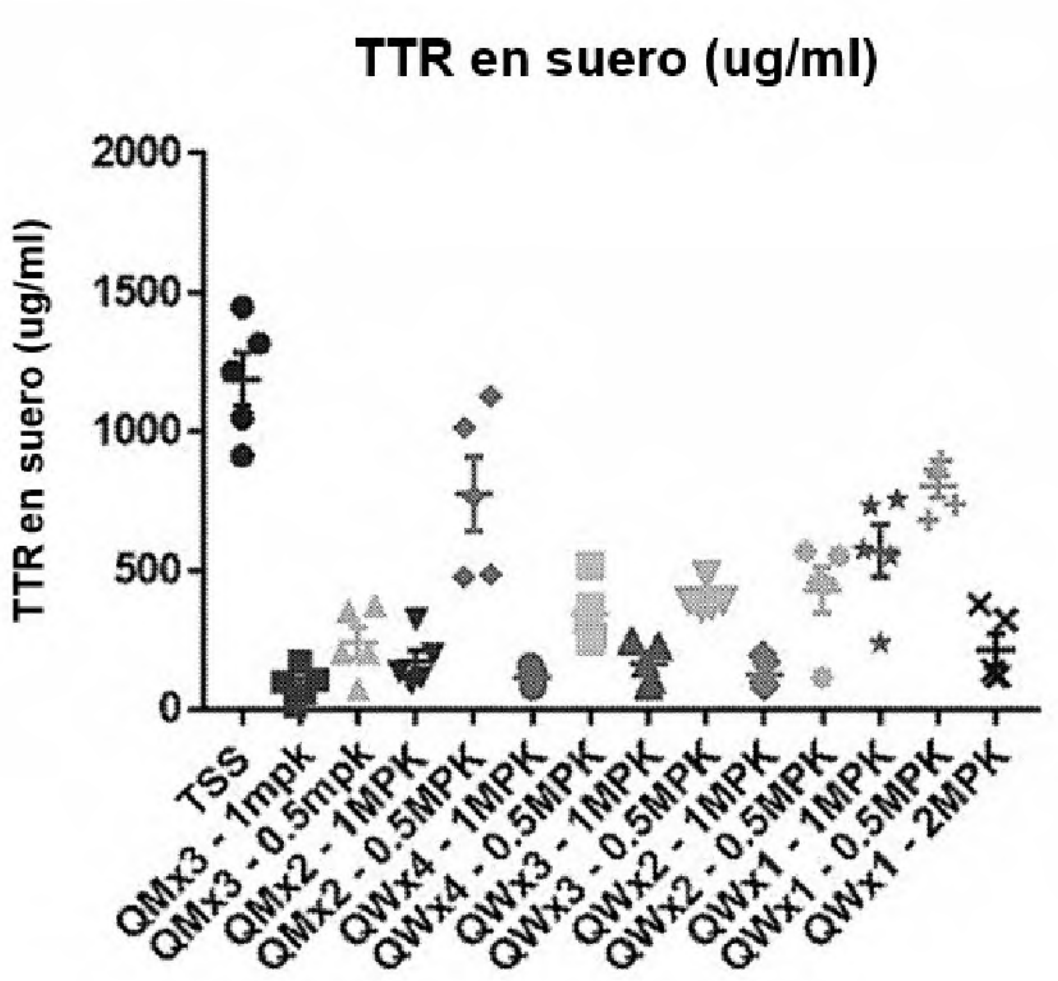

TTR en suero (ug/ml)
TTR en suero (ug/ml)
2000
1500
1000
500
0
TSS
QMx3 - 1mpk
QMx3 - 0.5mpk
QMx2 - 1MPK
QMx2 - 0.5MPK
QWx4 - 1MPK
QWx4 - 0.5MPK
QWx3 - 1MPK
QWx3 - 0.5MPK
QWx2 - 1MPK
QWx2 - 0.5MPK
QWx1 - 1MPK
QWx1 - 0.5MPK
QWx1 - 2MPK

Figura 10A

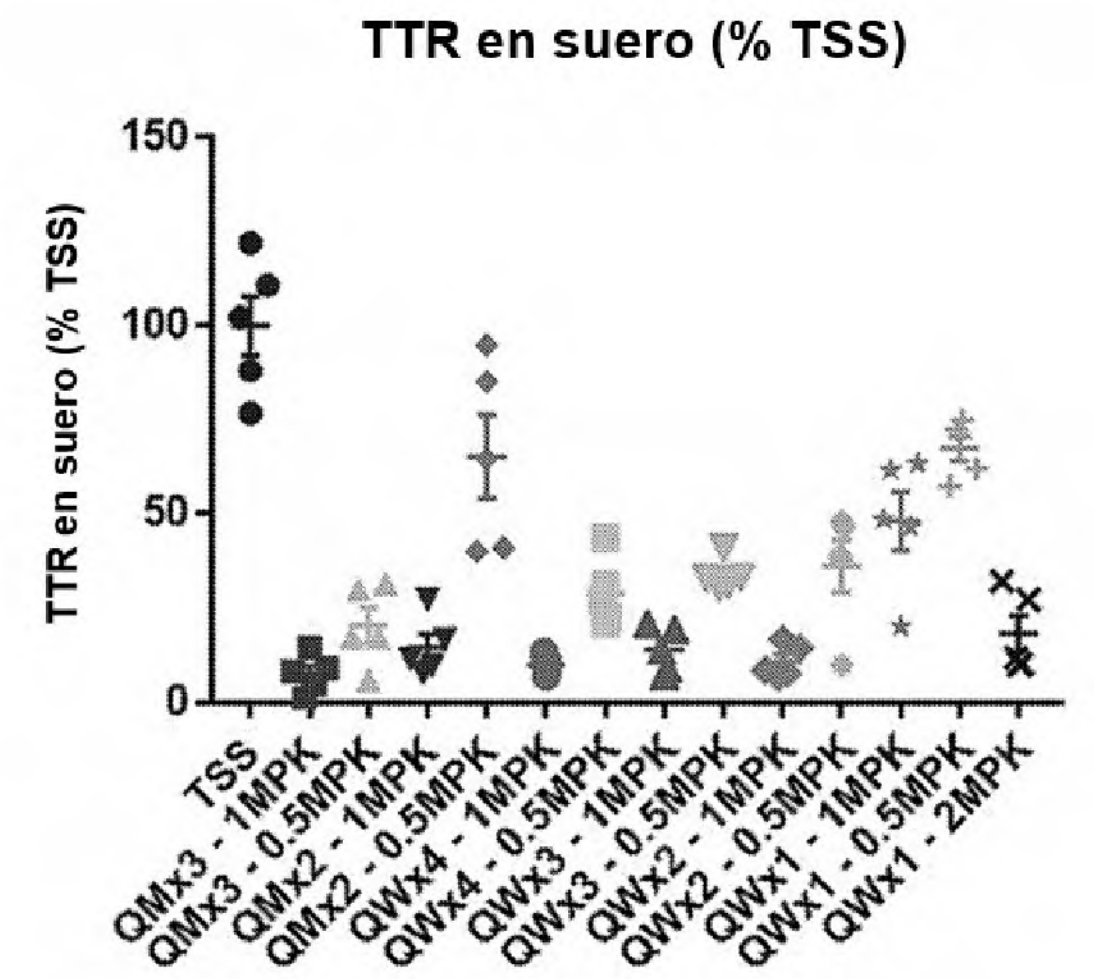

TTR en suero (% TSS)
TTR en suero (% TSS)
150
100
50
0
TSS
QMx3 - 1MPK
QMx3 - 0.5MPK
QMx2 - 1MPK
QMx2 - 0.5MPK
QWx4 - 1MPK
QWx4 - 0.5MPK
QWx3 - 1MPK
QWx3 - 0.5MPK
QWx2 - 1MPK
QWx2 - 0.5MPK
QWx1 - 1MPK
QWx1 - 0.5MPK
QWx1 - 2MPK

Figura 10B

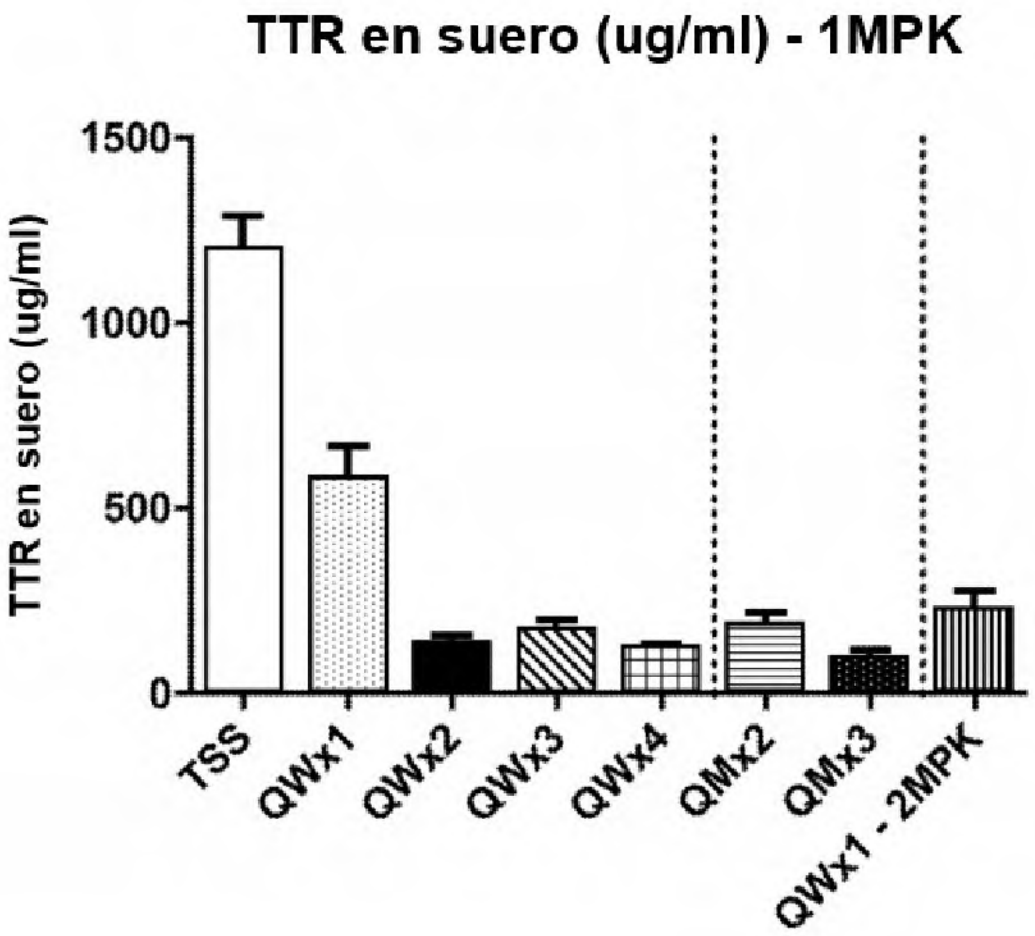

TTR en suero (ug/ml) - 1MPK
TTR en suero (ug/ml)
1500
1000
500
0
TSS
QWx1
QWx2
QWx3
QWx4
QMx2
QMx3
QWx1 - 2MPK

Figura 11A

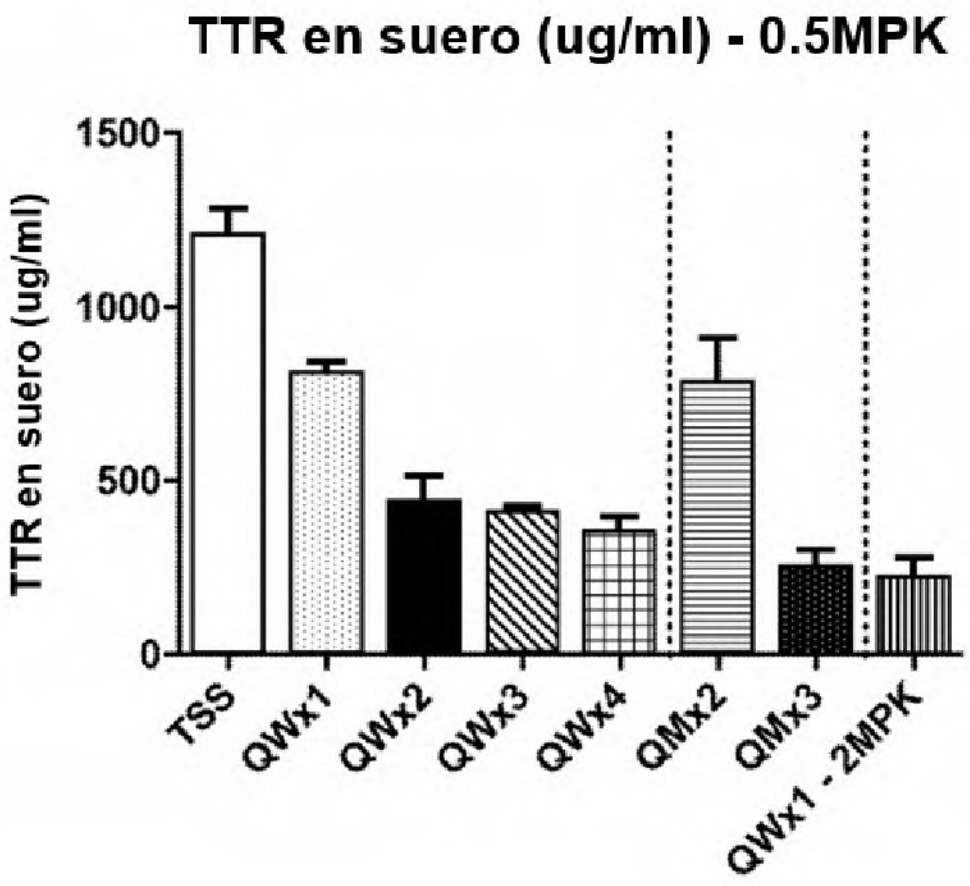

TTR en suero (ug/ml) - 0.5MPK
TTR en suero (ug/ml)
1500
1000
500
0
TSS
QWx1
QWx2
QWx3
QWx4
QMx2
QMx3
QWx1 - 2MPK

Figura 11B

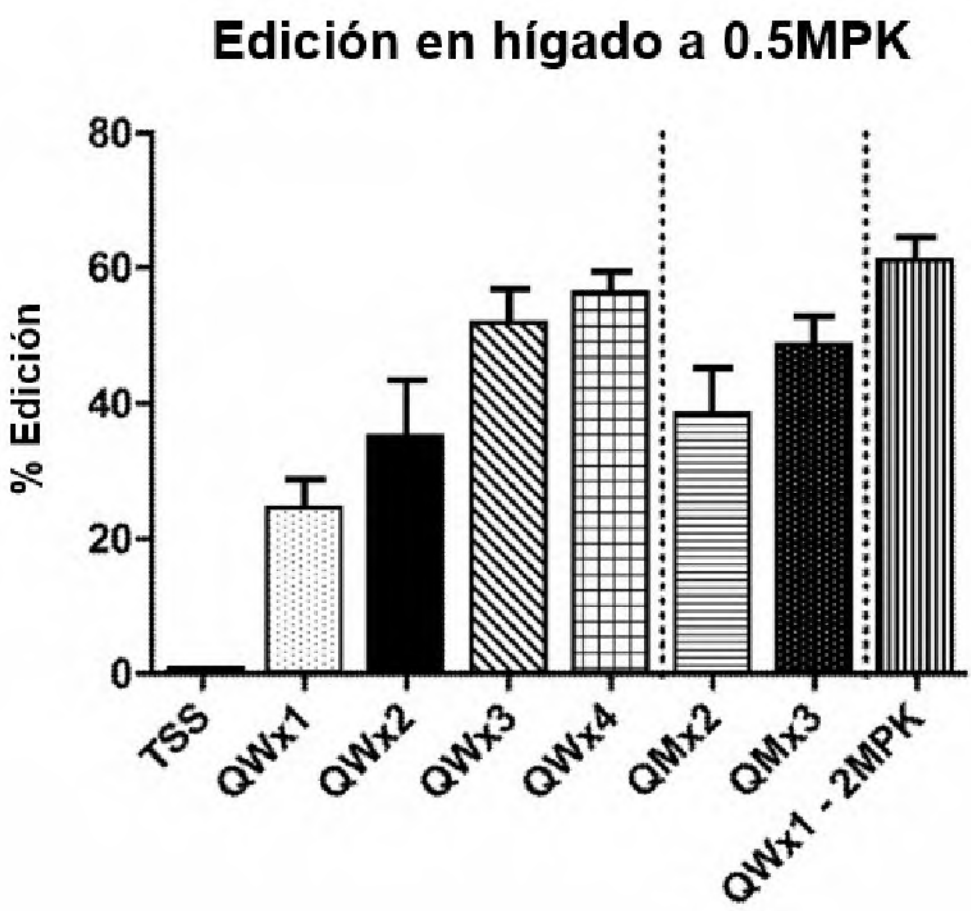

Edición en hígado a 0.5MPK
% Edición
80
60
40
20
0
TSS
QWx1
QWx2
QWx3
QWx4
QMx2
QMx3
QWx1 - 2MPK

Figura 12A

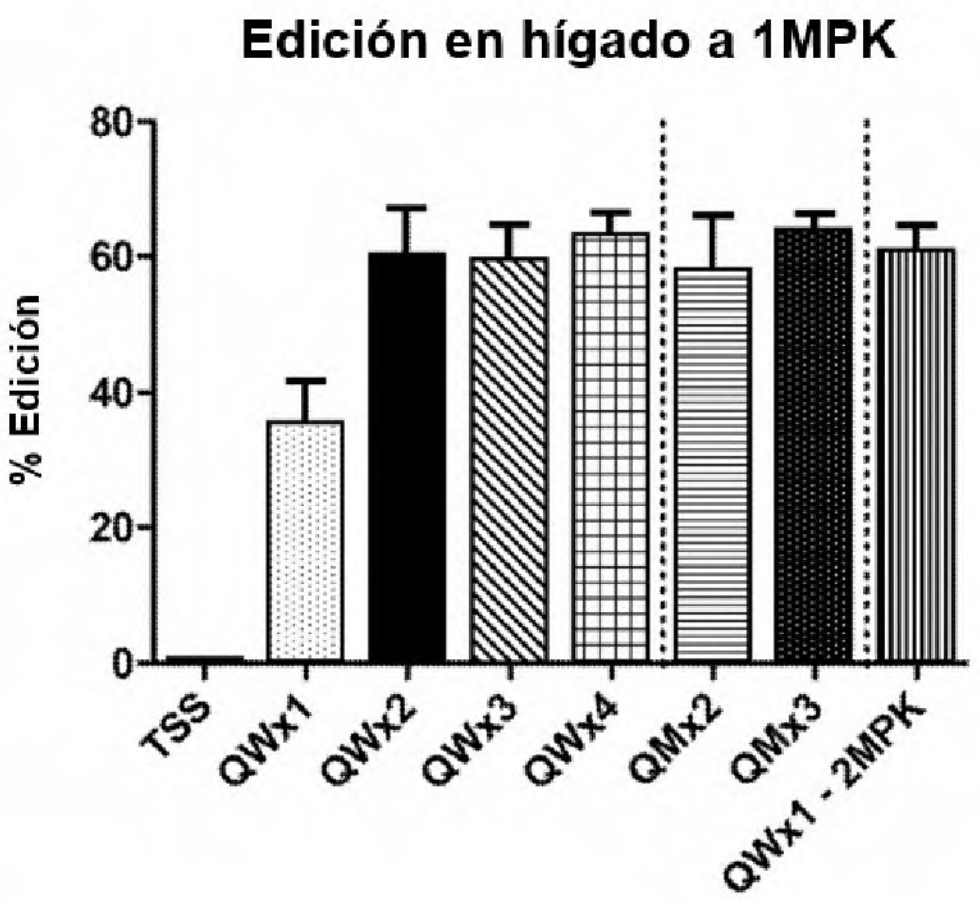

Edición en hígado a 1MPK
% Edición
80
60
40
20
0
TSS
QWx1
QWx2
QWx3
QWx4
QMx2
QMx3
QWx1 - 2MPK

Figura 12B

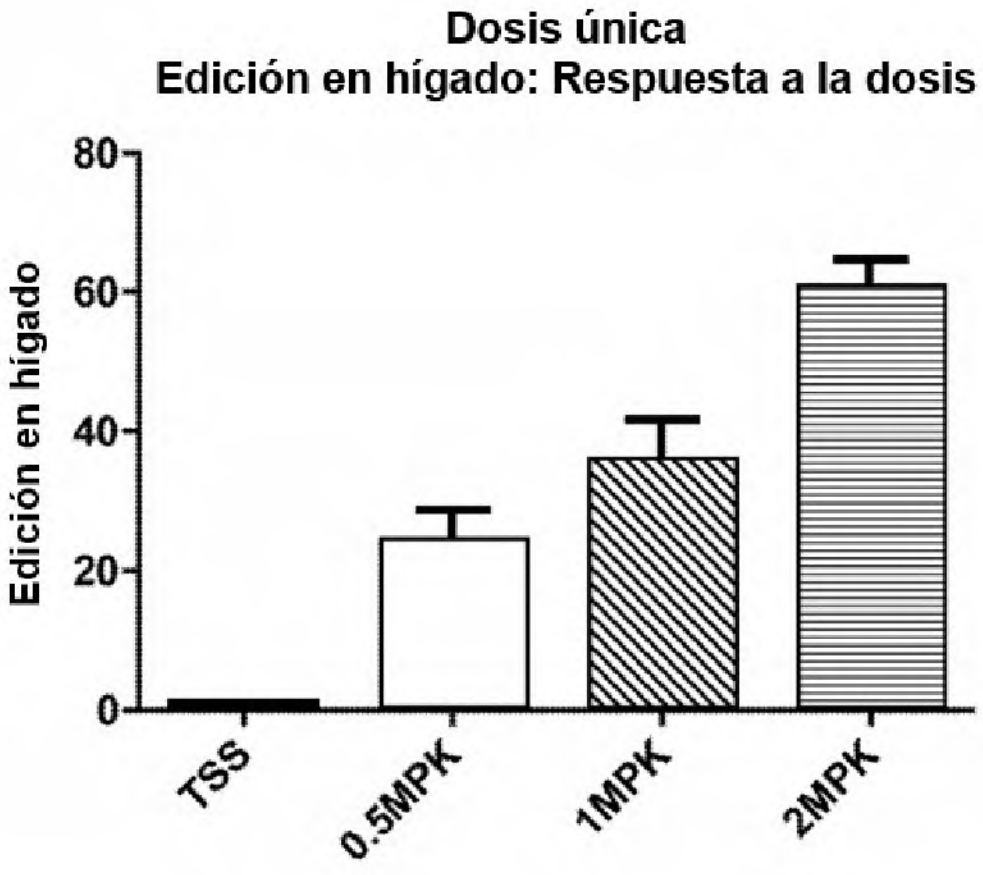

Dosis única
Edición en hígado: Respuesta a la dosis
Edición en hígado
80
60
40
20
0
TSS
0.5MPK
1MPK
2MPK

Figura 12C

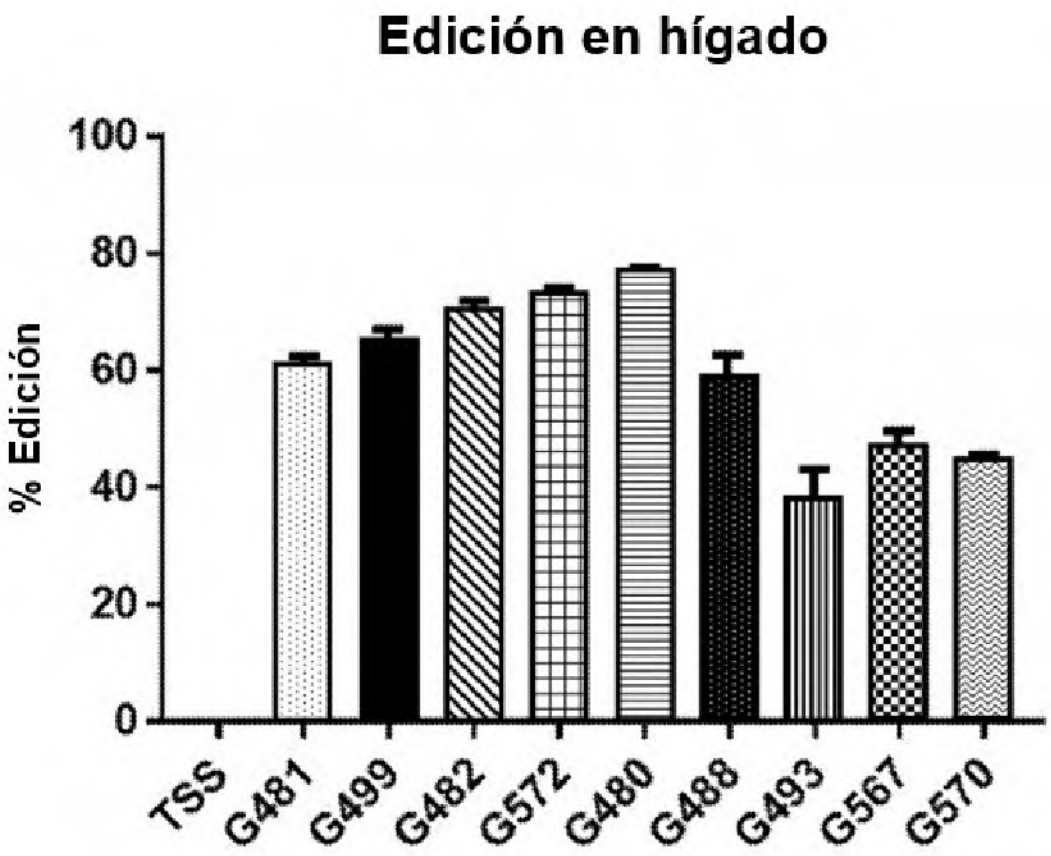

Edición en hígado
% Edición
100
80
60
40
20
0
TSS
G481
G499
G482
G572
G480
G488
G493
G567
G570

Figura 13

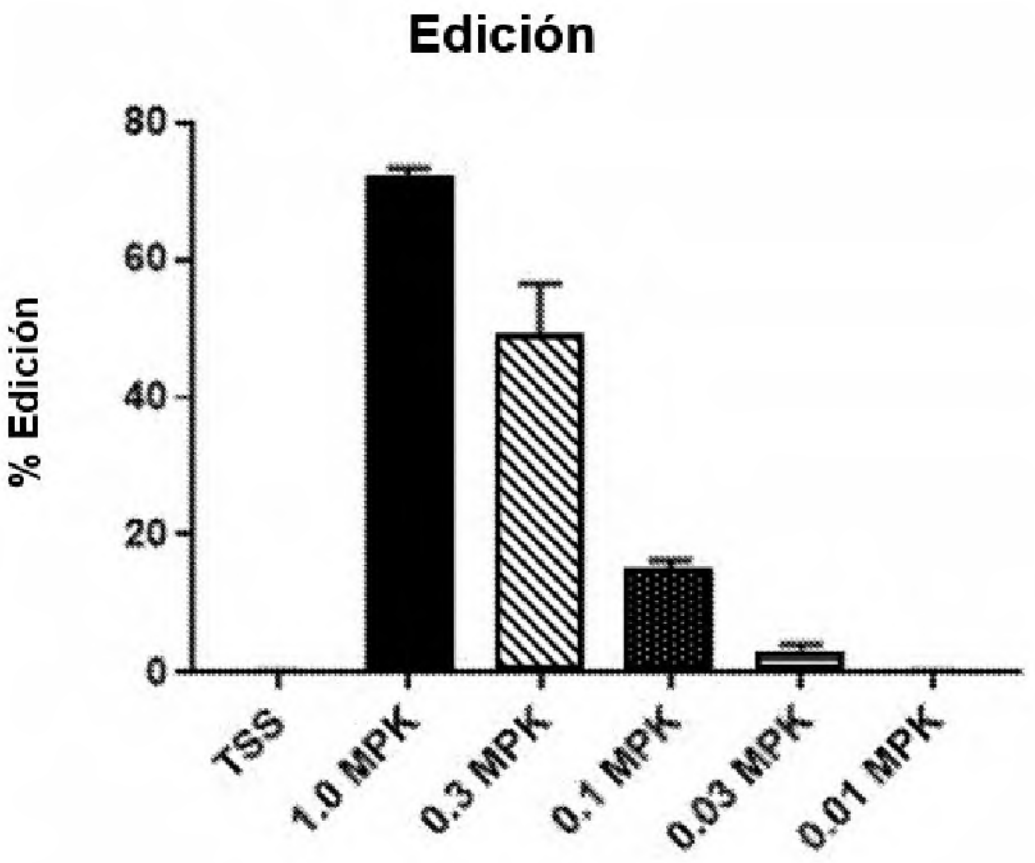

Edición
% Edición
80
60
40
20
0
TSS
1.0 MPK
0.3 MPK
0.1 MPK
0.03 MPK
0.01 MPK

Figura 15A

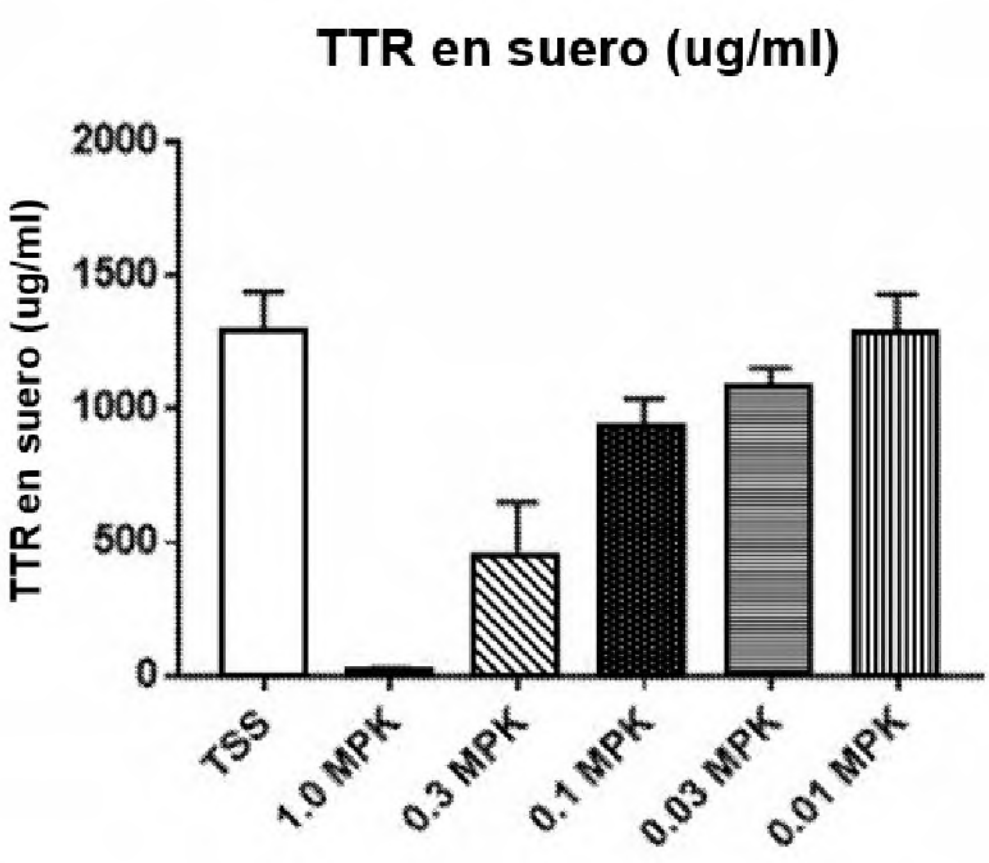

TTR en suero (ug/ml)
TTR en suero (ug/ml)
2000
1500
1000
500
0
TSS
1.0 MPK
0.3 MPK
0.1 MPK
0.03 MPK
0.01 MPK

Figura 15B

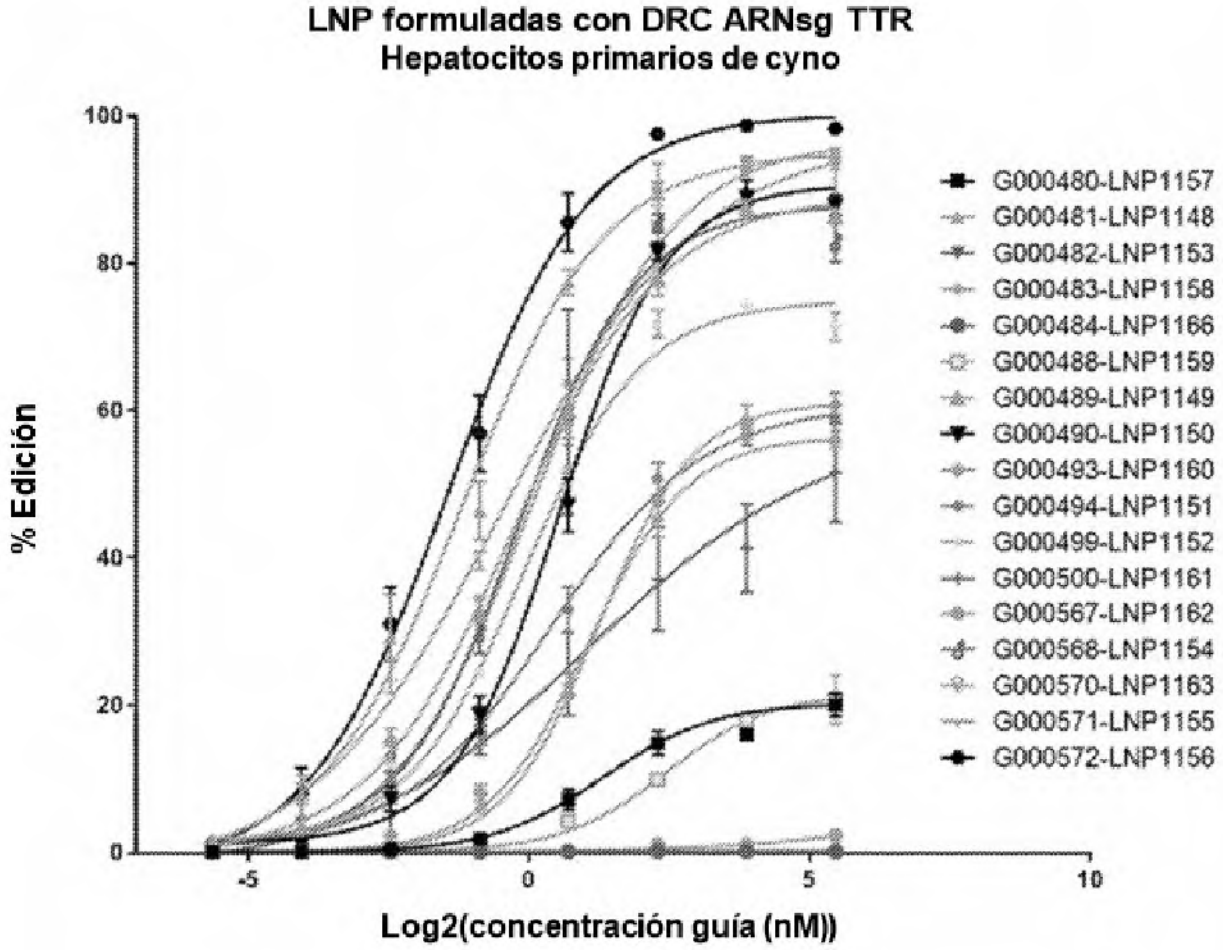

LNP formuladas con DRC ARNsg TTR
Hepatocitos primarios de cyno
% Edición
100
80
60
40
20
0
-5
0
5
10
Log2(concentración guía (nM))
G000480-LNP1157
G000481-LNP1148
G000482-LNP1153
G000483-LNP1158
G000484-LNP1166
G000488-LNP1159
G000489-LNP1149
G000490-LNP1150
G000493-LNP1160
G000494-LNP1151
G000499-LNP1152
G000500-LNP1161
G000567-LNP1162
G000568-LNP1154
G000570-LNP1163
G000571-LNP1155
G000572-LNP1156

Figura 16

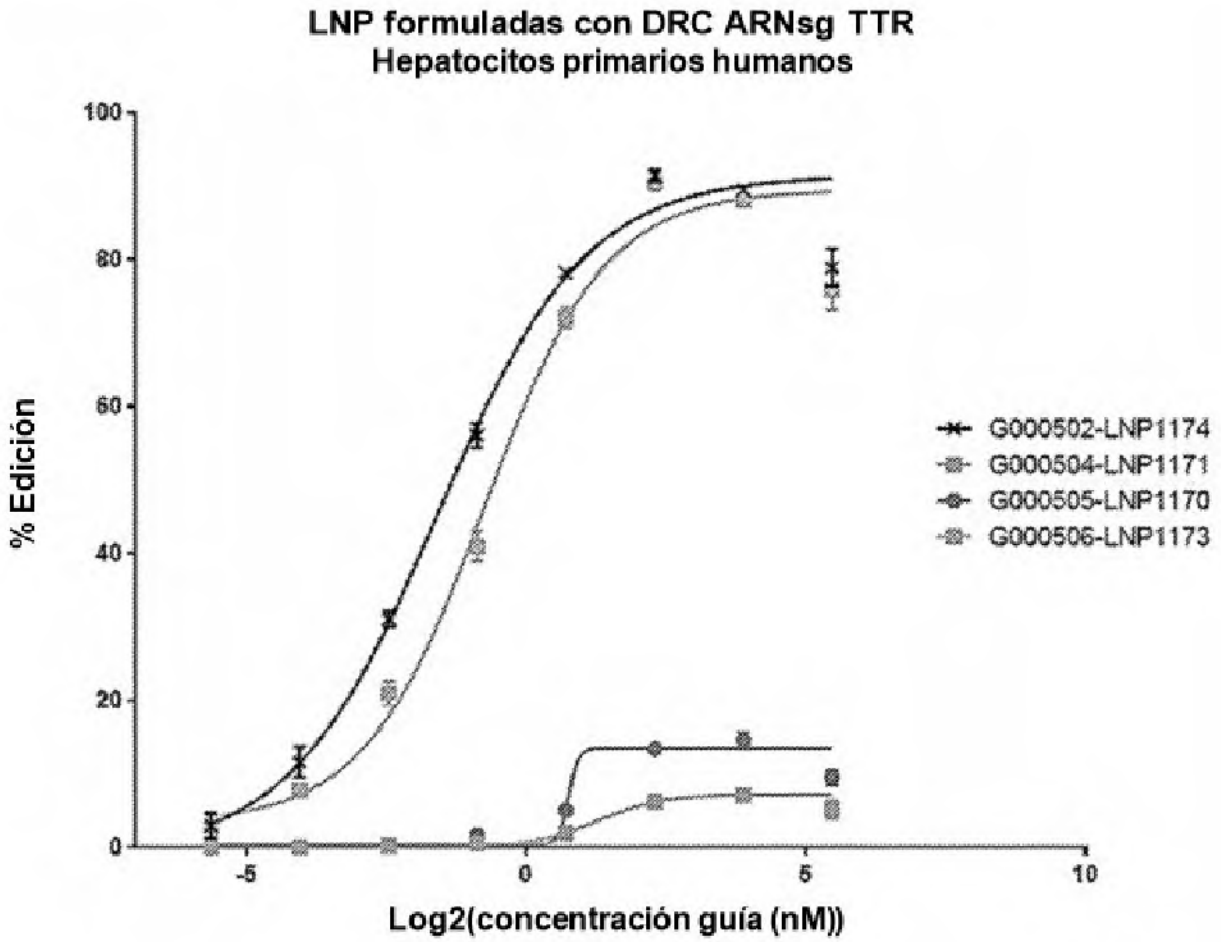

LNP formuladas con DRC ARNsg TTR
Hepatocitos primarios humanos
% Edición
100
80
60
40
20
0
-5
0
5
10
Log2(concentración guía (nM))
G000502-LNP1174
G000504-LNP1171
G000505-LNP1170
G000506-LNP1173

Figura 17

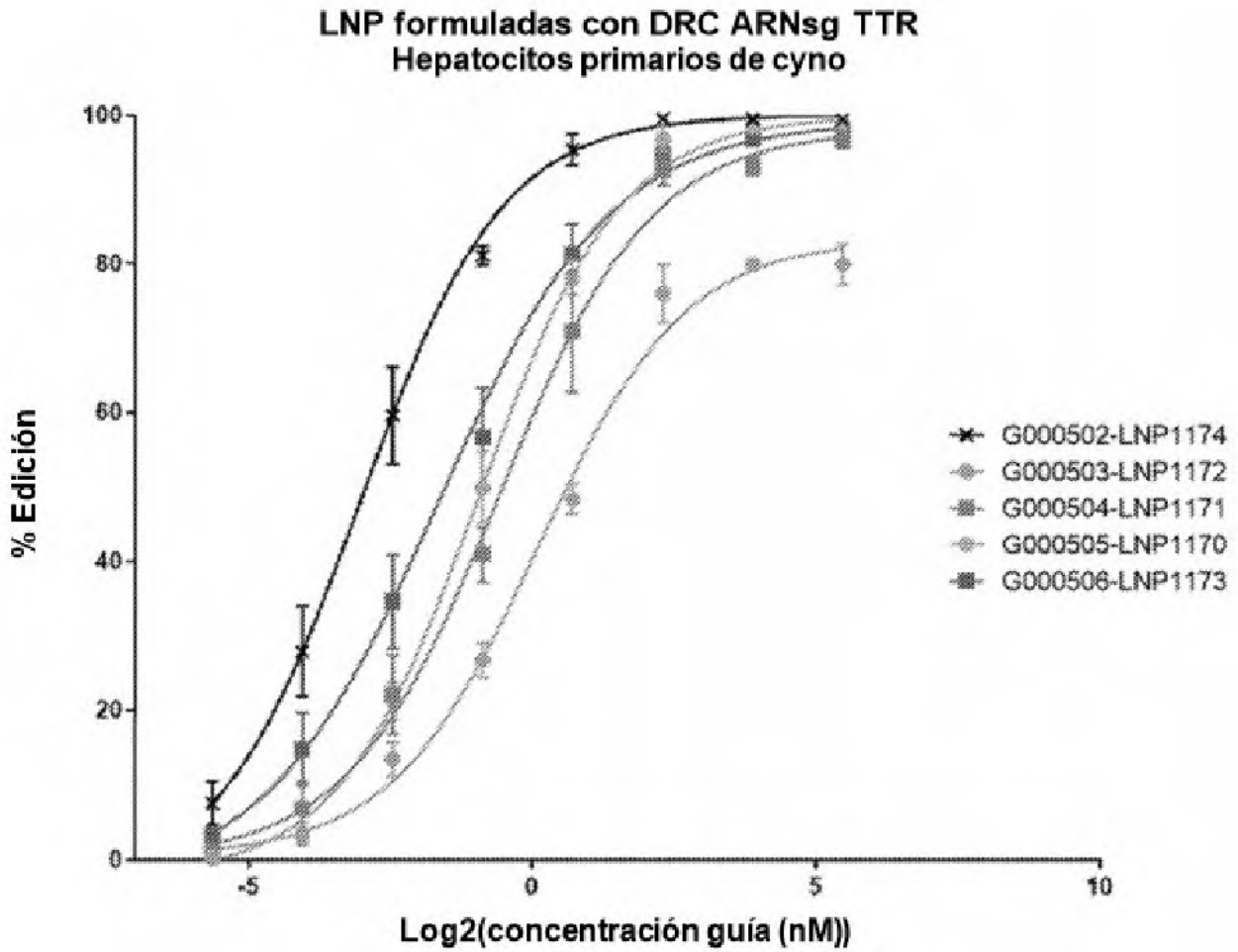

LNP formuladas con DRC ARNsg TTR
Hepatocitos primarios de cyno
% Edición
100
80
60
40
20
0
-5
0
5
10
Log2(concentración guía (nM))
G000502-LNP1174
G000503-LNP1172
G000504-LNP1171
G000505-LNP1170
G000506-LNP1173

Figura 18

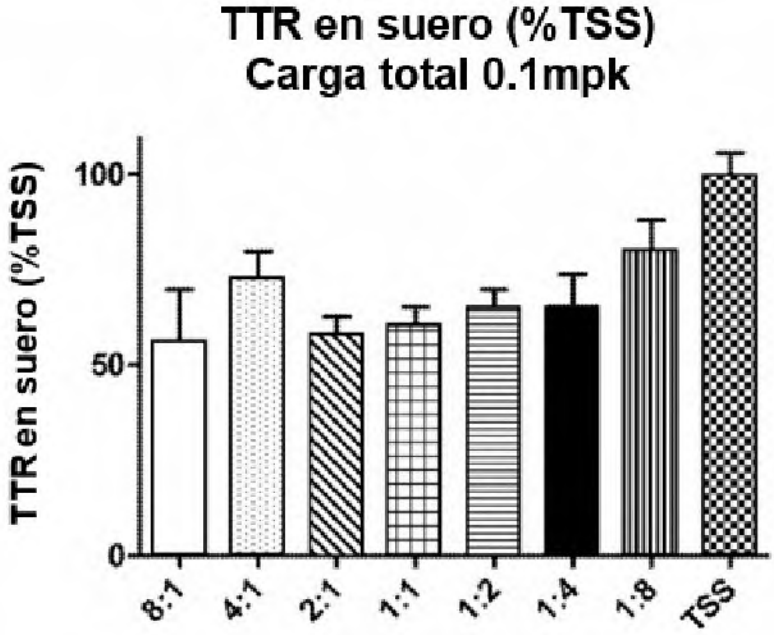


Figura 19A

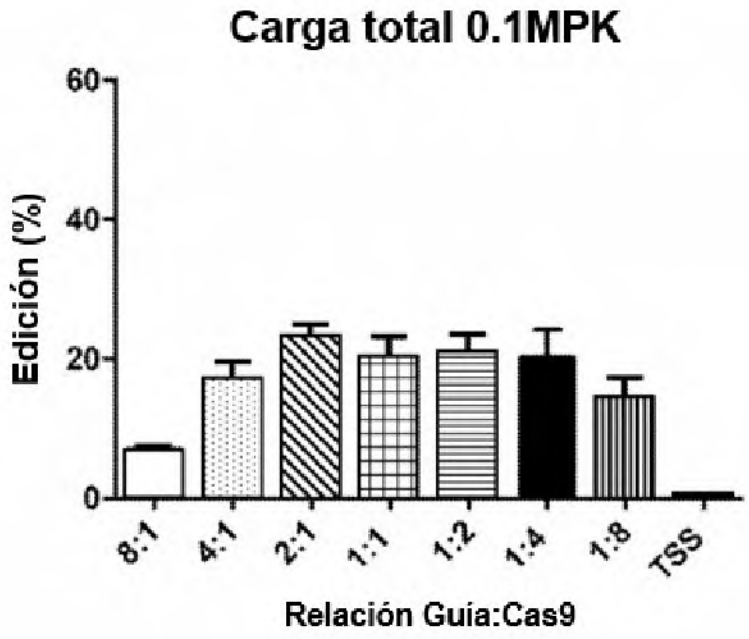


Figura 19B

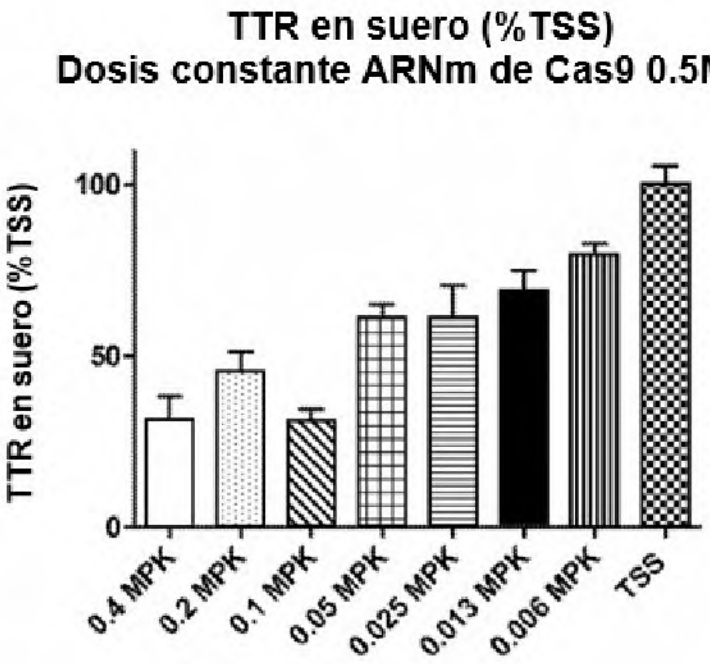


Figura 19C

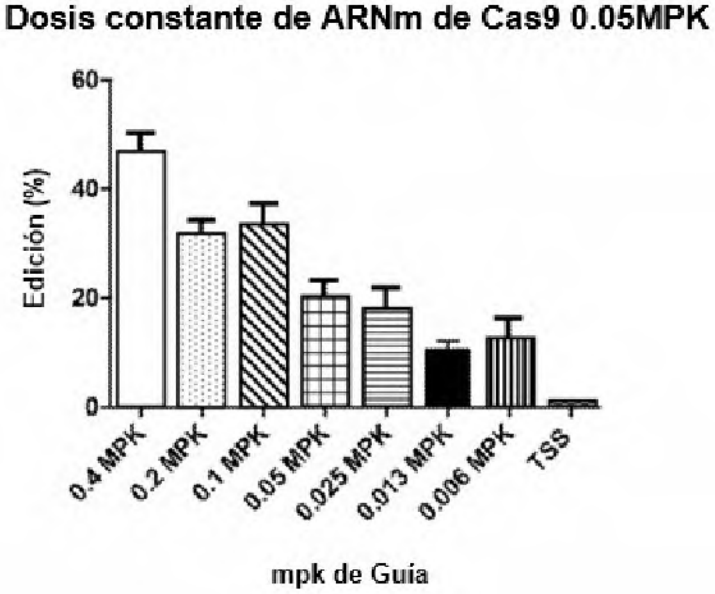


Figura 19D

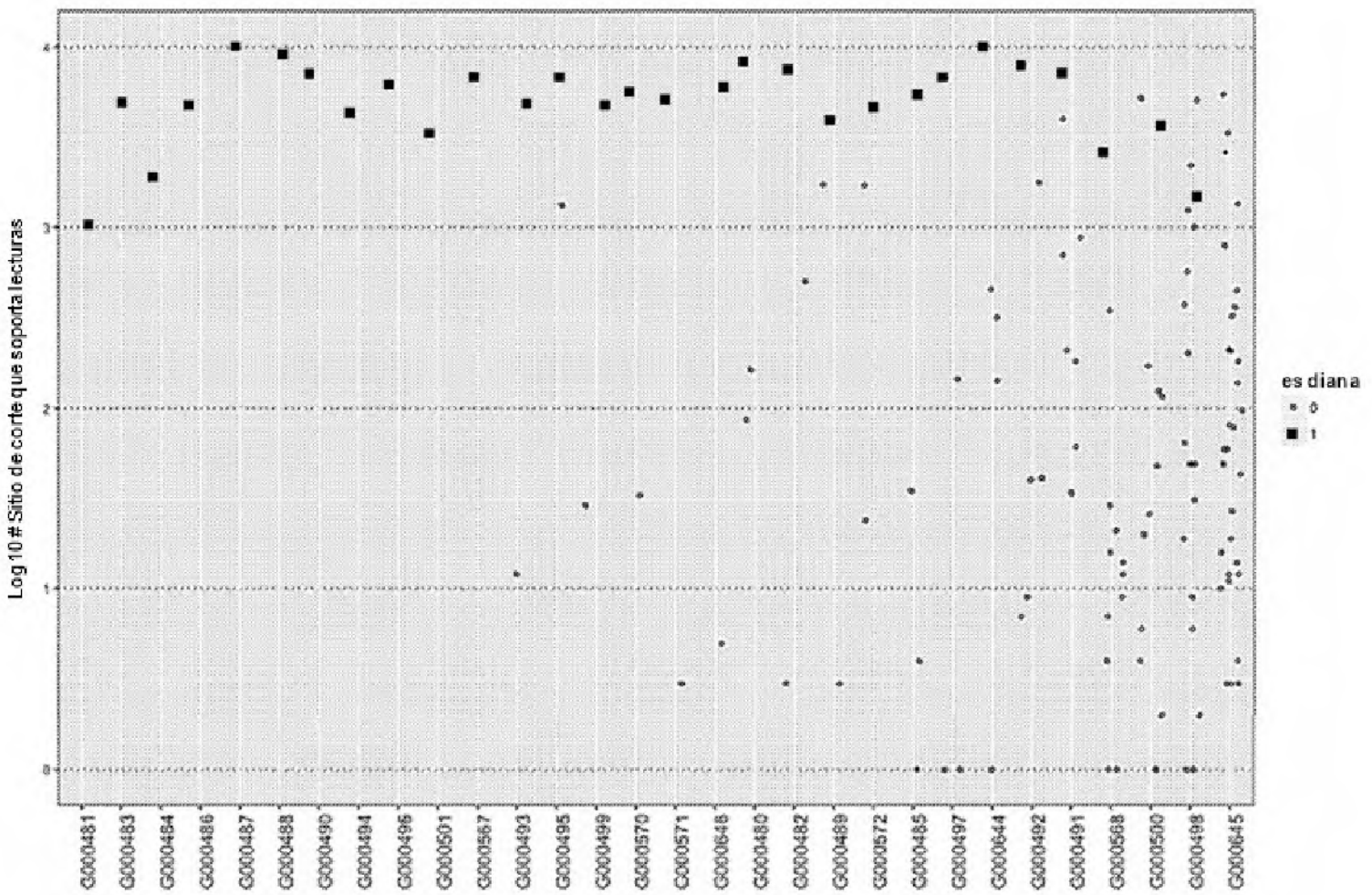

Log 10 # Sitio de corte que soporta lecturas
0
1
2
3
4
es diana
0
1
G0000481
G0000483
G0000484
G0000486
G0000487
G0000488
G0000490
G0000494
G0000496
G0000501
G0000567
G0000493
G0000495
G0000499
G0000570
G0000571
G0000648
G0000480
G0000482
G0000489
G0000572
G0000485
G0000497
G0000644
G0000492
G0000491
G0000568
G0000500
G0000498
G0000645

Figura 20

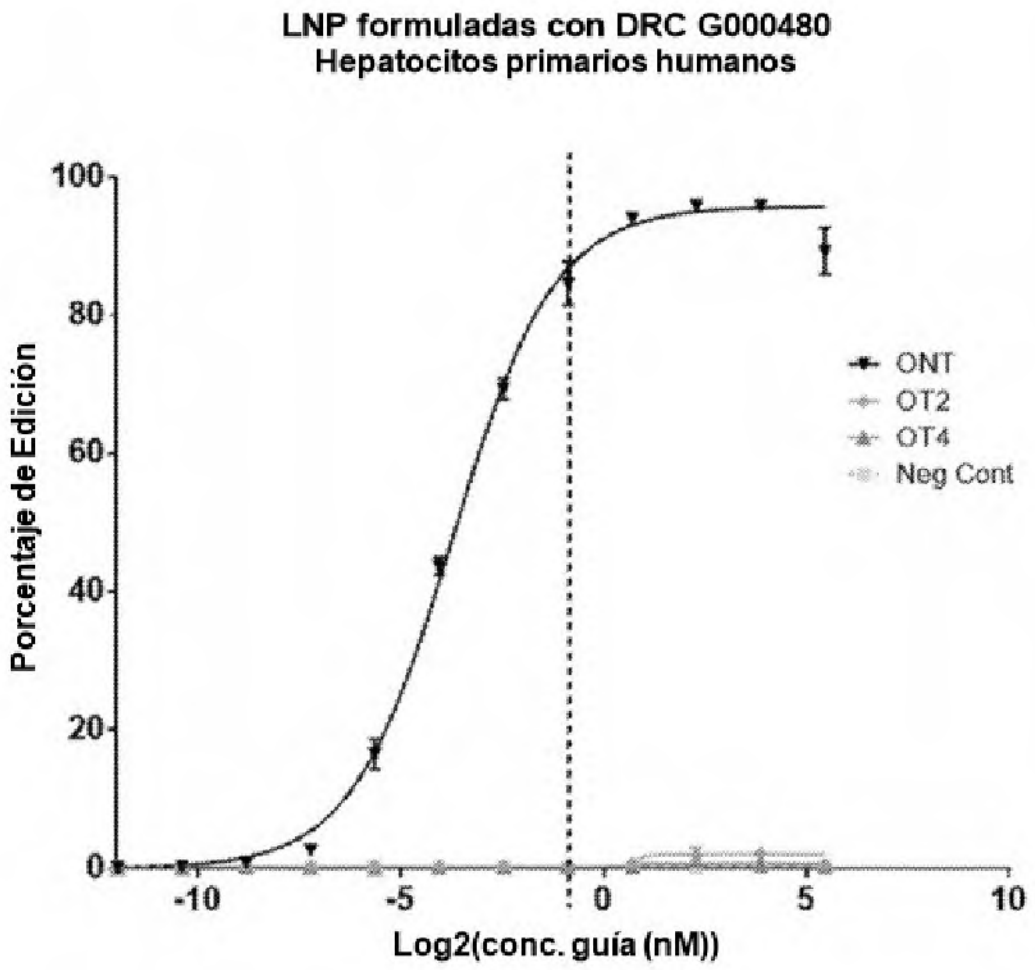

LNP formuladas con DRC G000480
Hepatocitos primarios humanos
Porcentaje de Edición
100
80
60
40
20
0
-10
-5
0
5
10
Log2(conc. guía (nM))
ONT
OT2
OT4
Neg Cont

Figura 21A

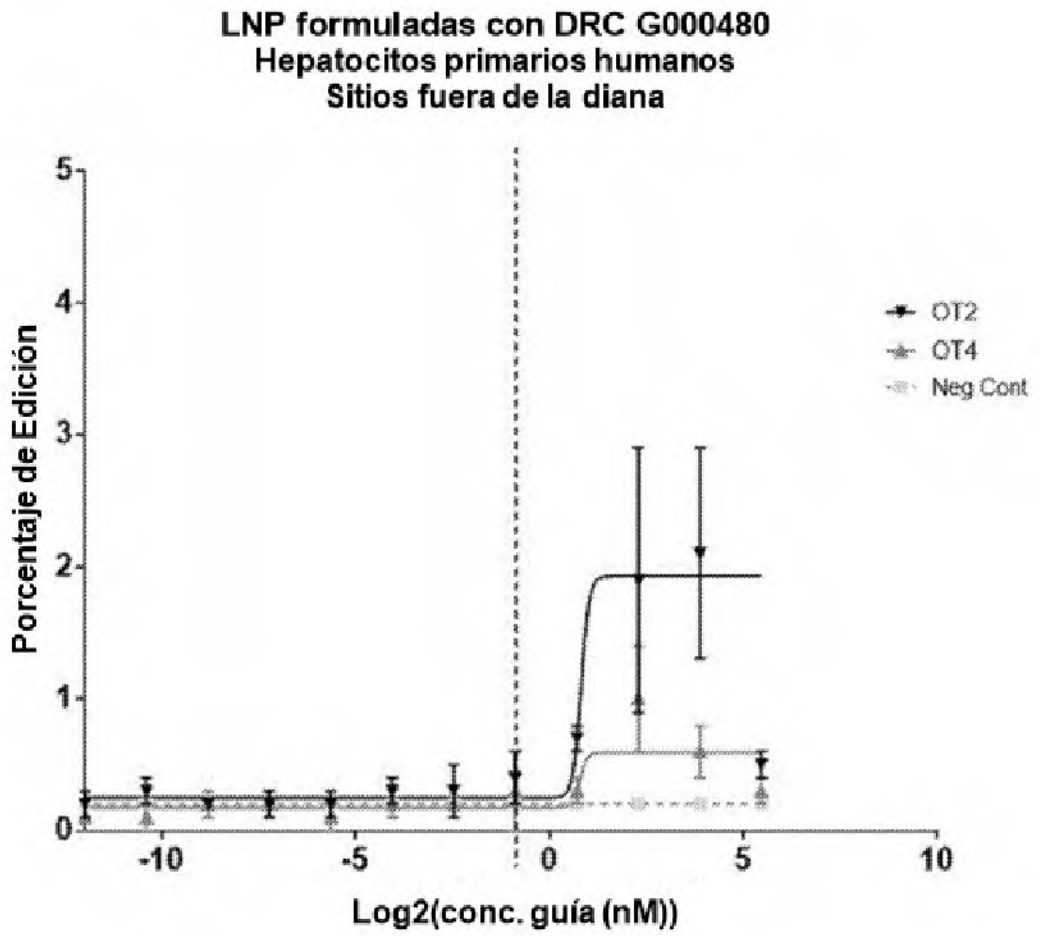

LNP formuladas con DRC G000480
Hepatocitos primarios humanos
Sitios fuera de la diana
Porcentaje de Edición
0
1
2
3
4
5
-10
-5
0
5
10
Log2(conc. guía (nM))
OT2
OT4
Neg Cont

Figura 21B

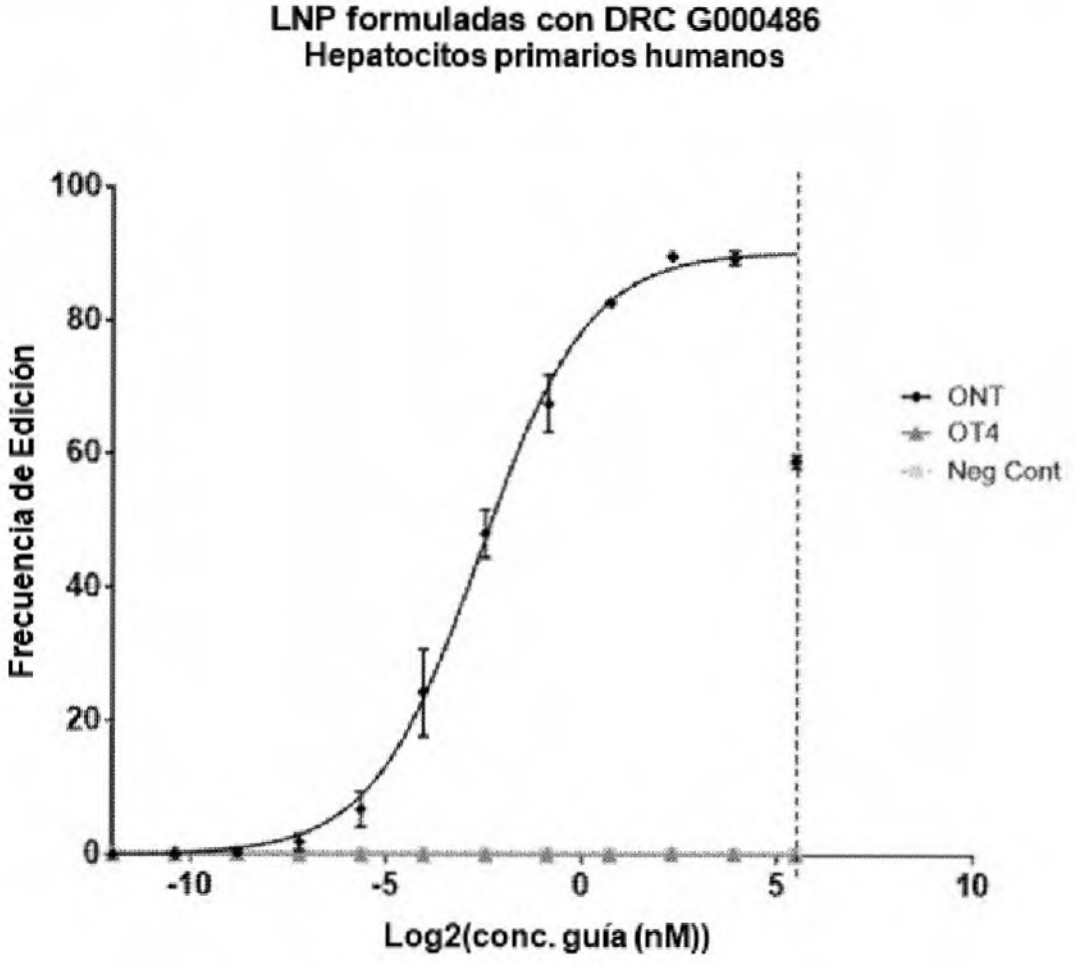

LNP formuladas con DRC G000486
Hepatocitos primarios humanos
Frecuencia de Edición
100
80
60
40
20
0
-10
-5
0
5
10
Log2(conc. guía (nM))
ONT
OT4
Neg Cont

Figura 22A

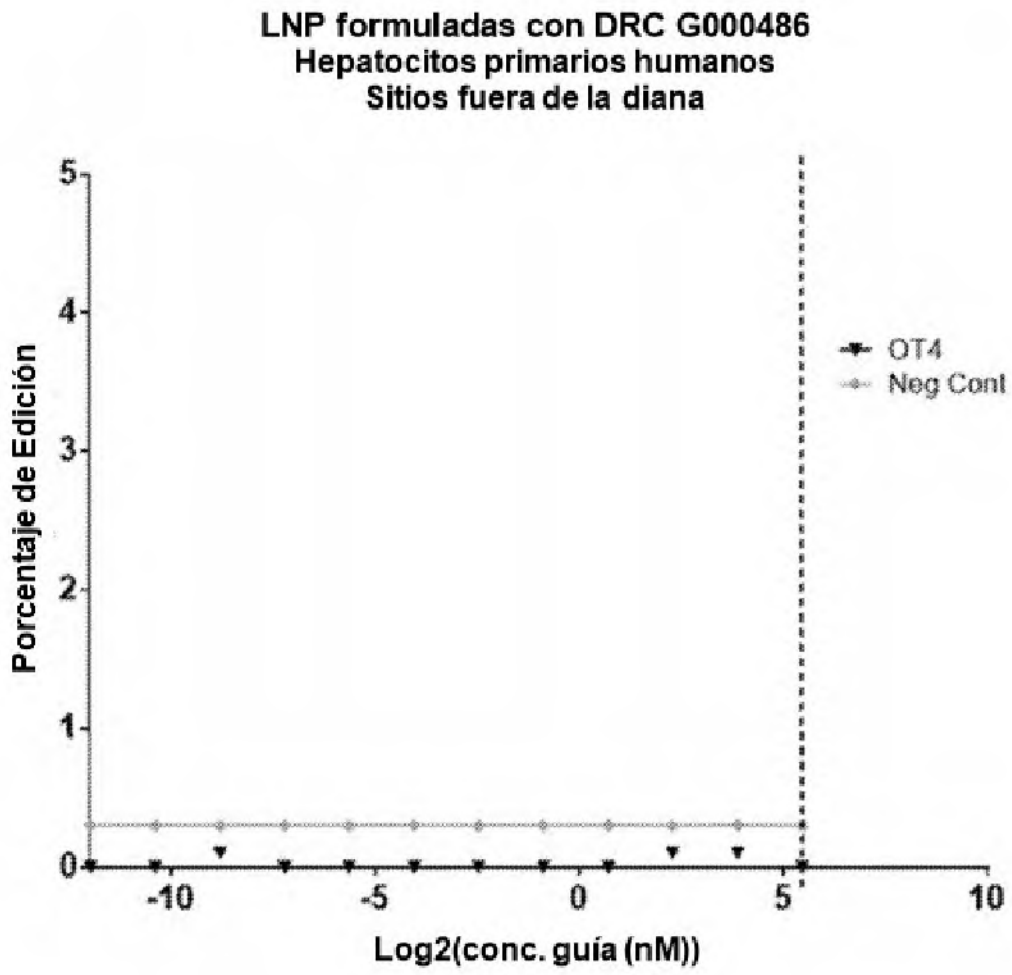

LNP formuladas con DRC G000486
Hepatocitos primarios humanos
Sitios fuera de la diana
Porcentaje de Edición
0
1
2
3
4
5
-10
-5
0
5
10
Log2(conc. guía (nM))
OT4
Neg Cont

Figura 22B

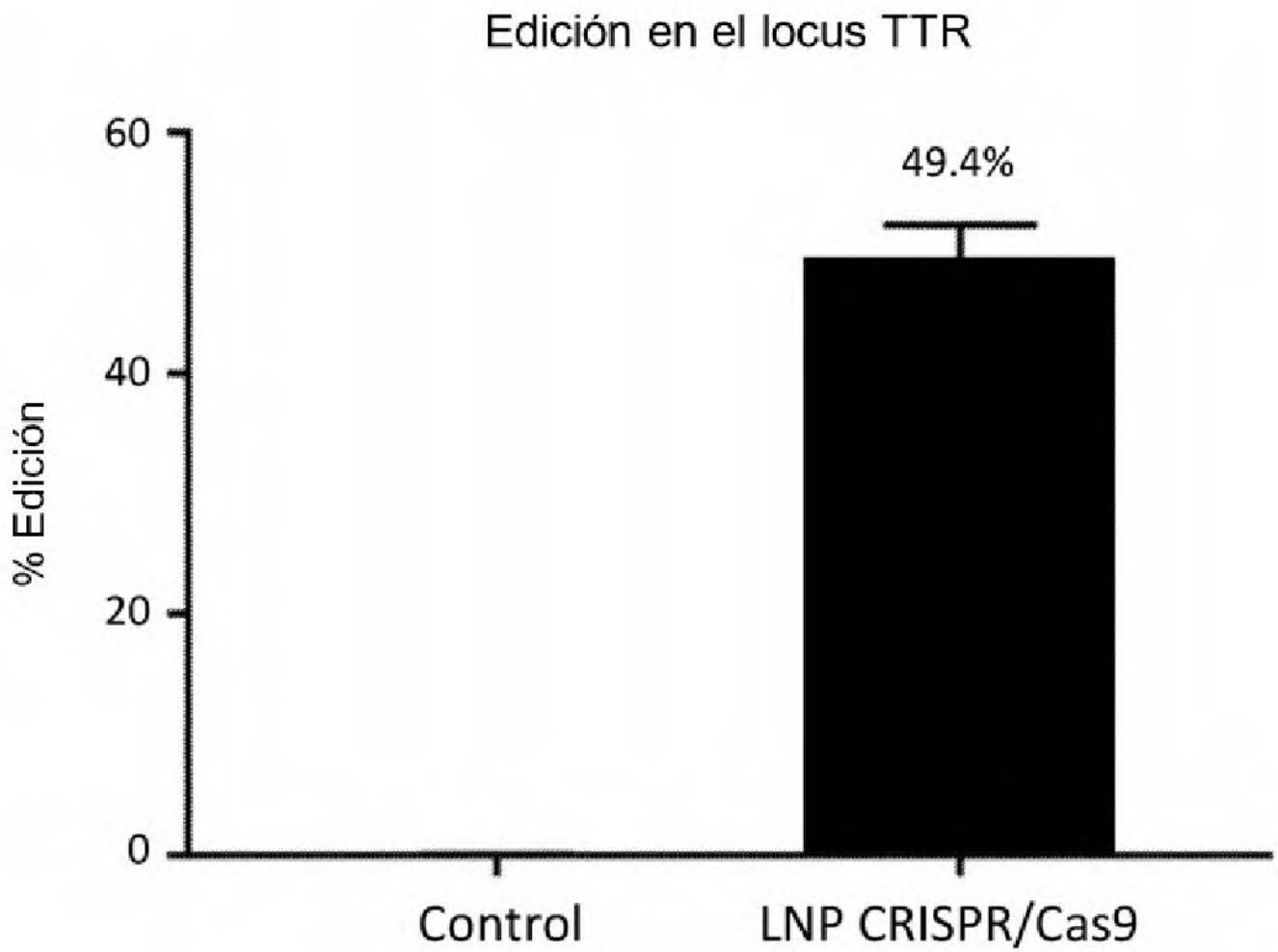

Edición en el locus TTR
60
40
20
0
% Edición
49.4%
Control
LNP CRISPR/Cas9

Figura 23A

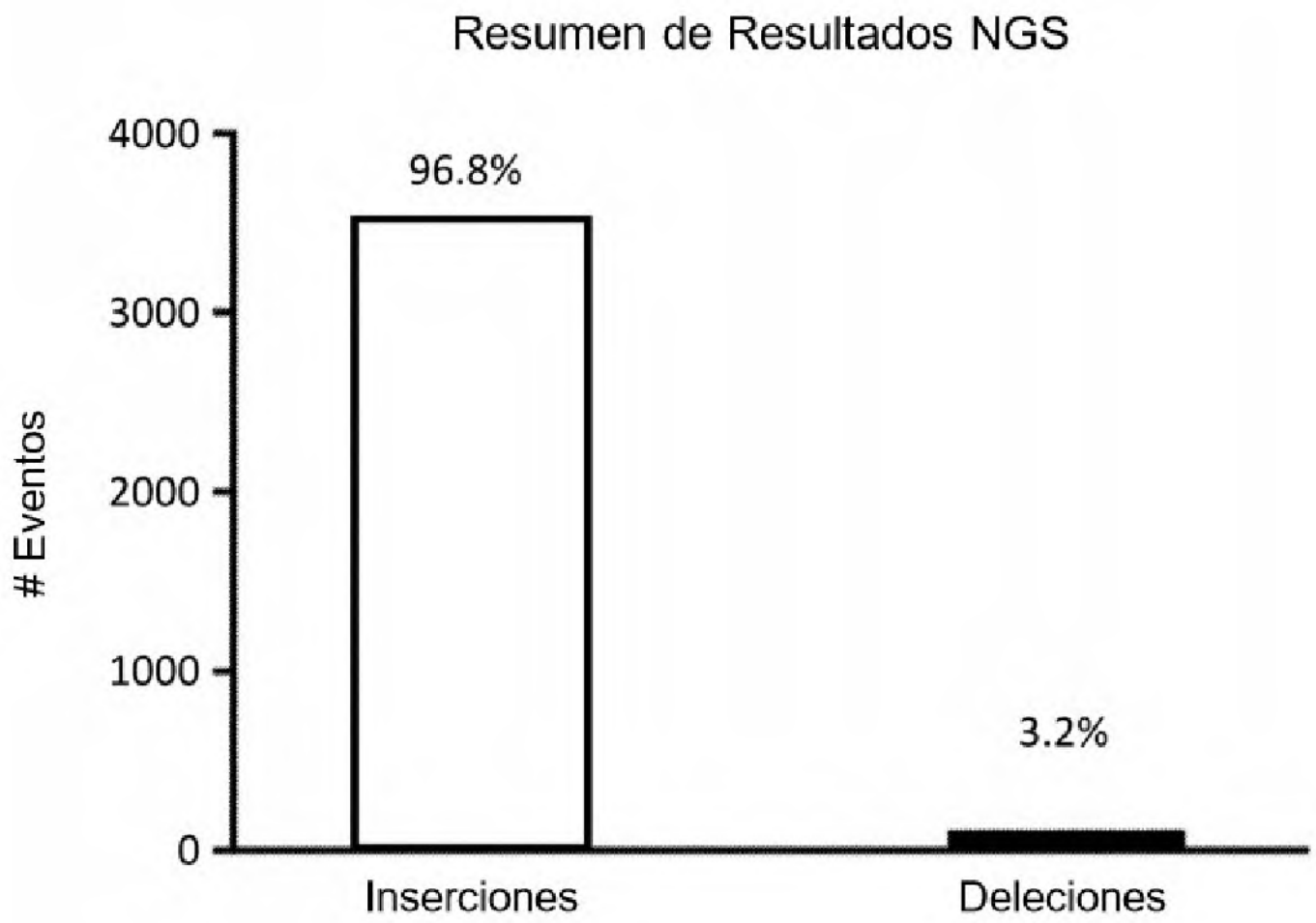

Resumen de Resultados NGS
4000
3000
2000
1000
0
Eventos
96.8%
3.2%
Inserciones
Deleciones

Figura 23B

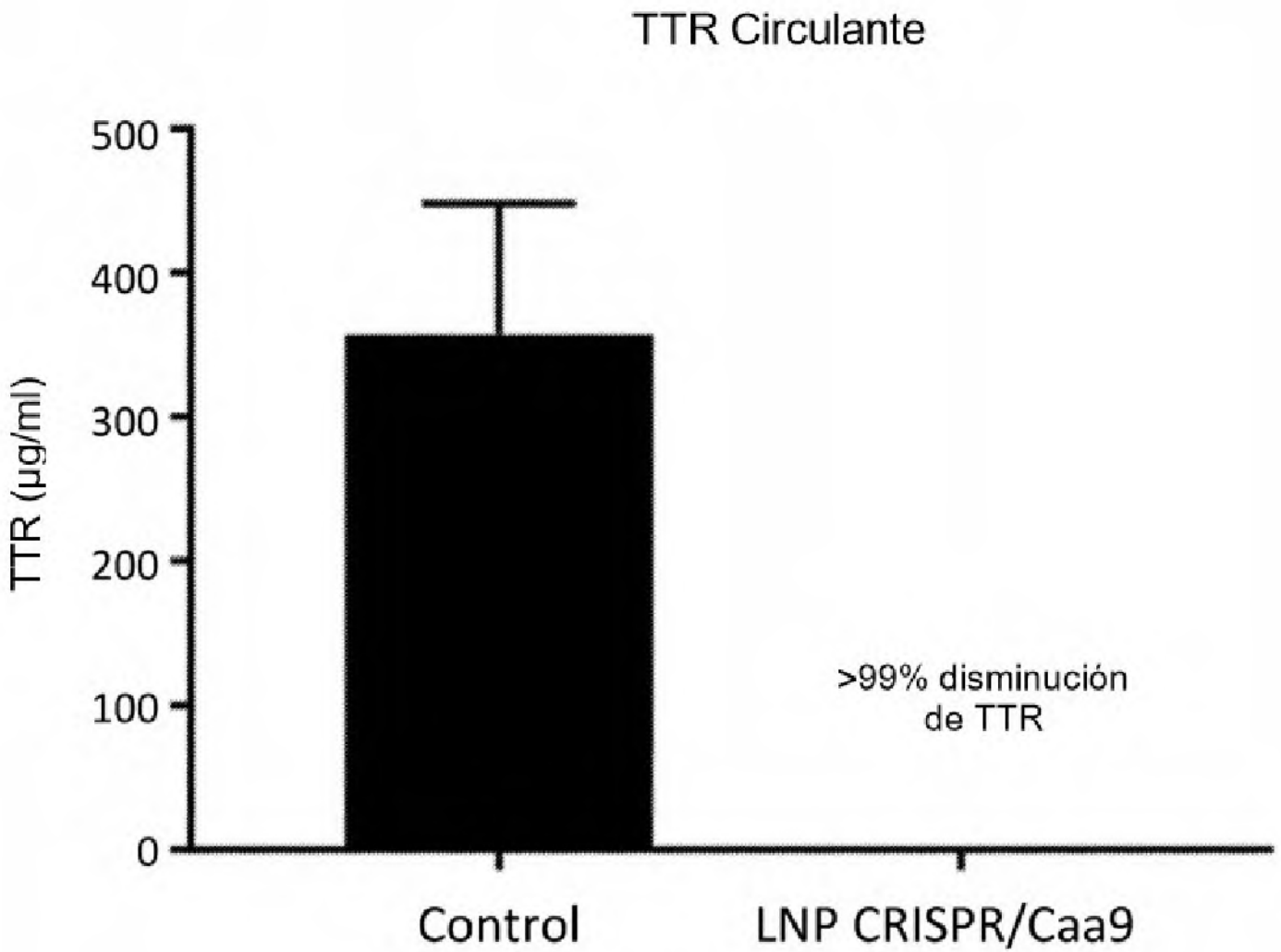

TTR Circulante
500
400
300
200
100
0
TTR (µg/ml)
>99% disminución
de TTR
Control
LNP CRISPR/Caa9

Figura 24A

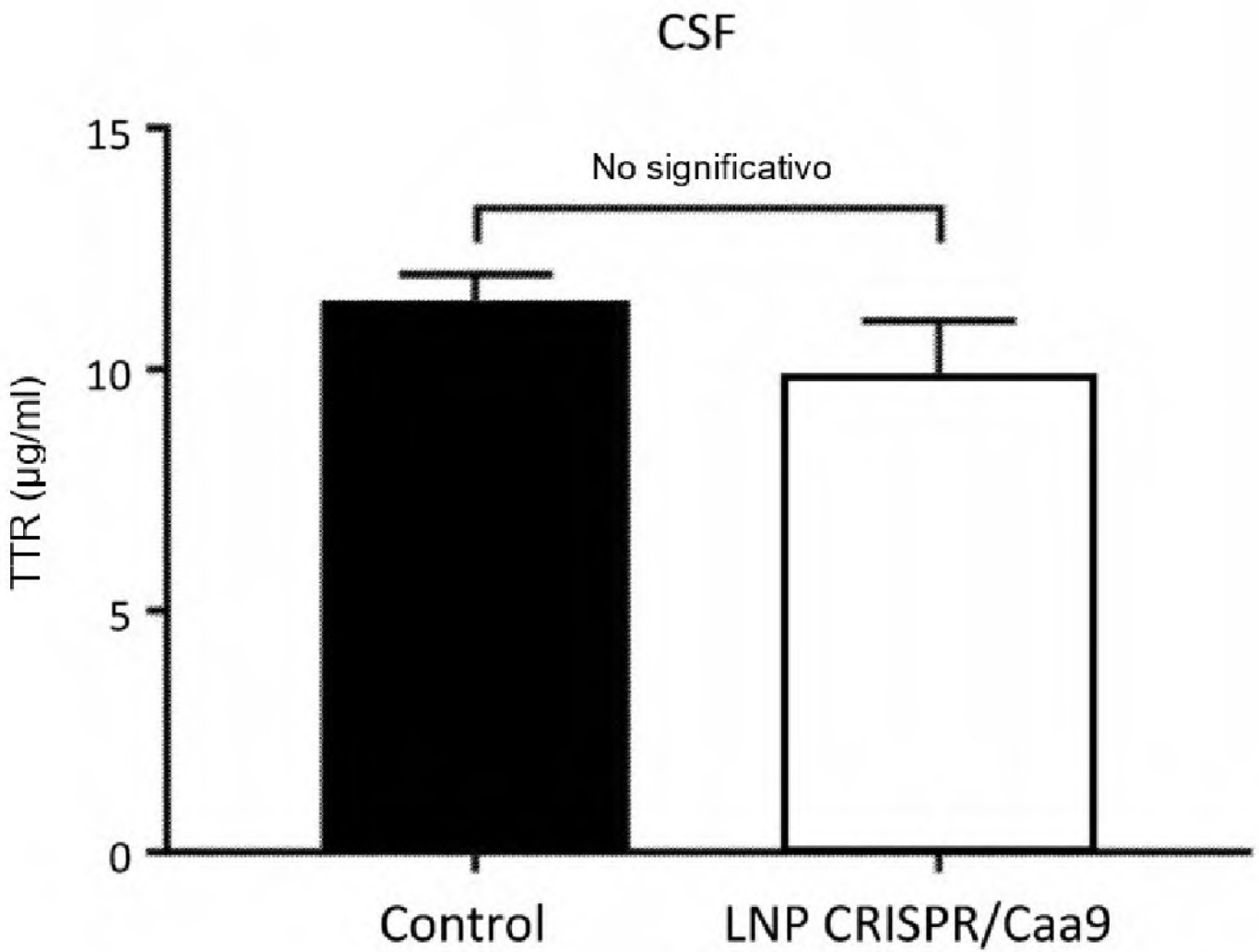

CSF
No significativo
15
10
5
0
TTR (µg/ml)
Control
LNP CRISPR/Caa9

Figura 24B

Figura 25C

Figura 25D

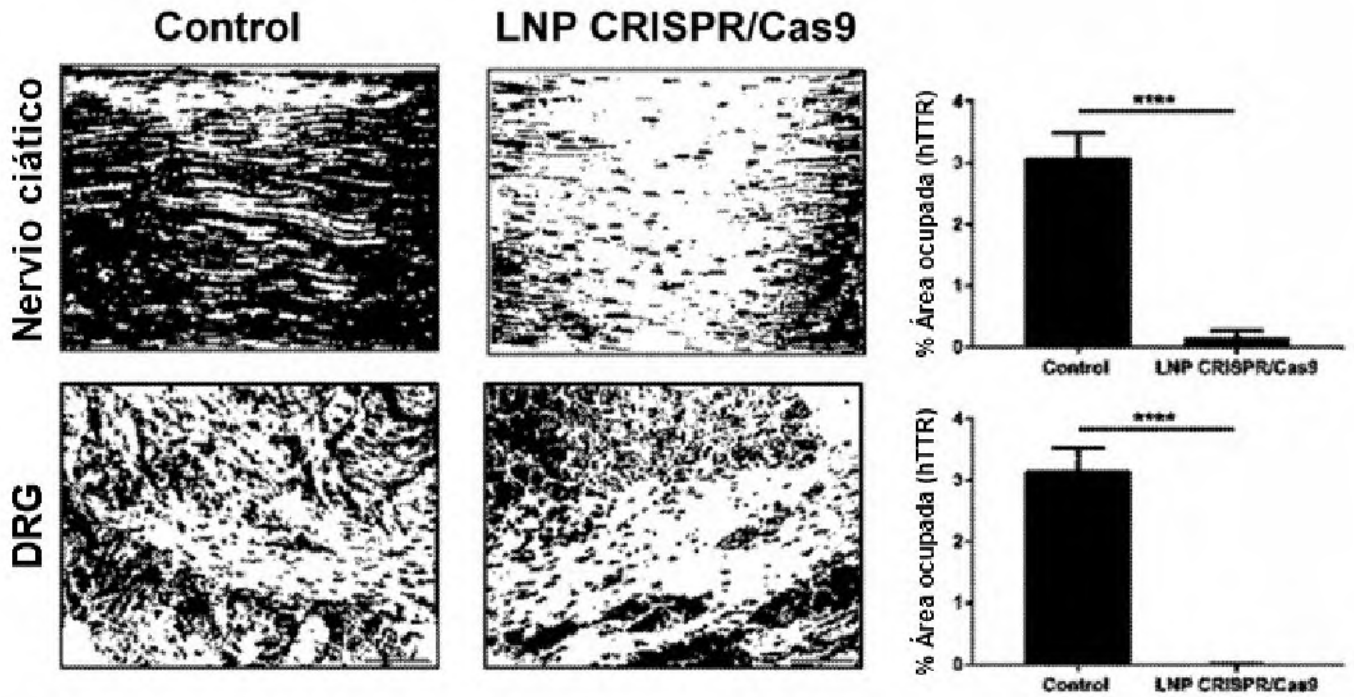
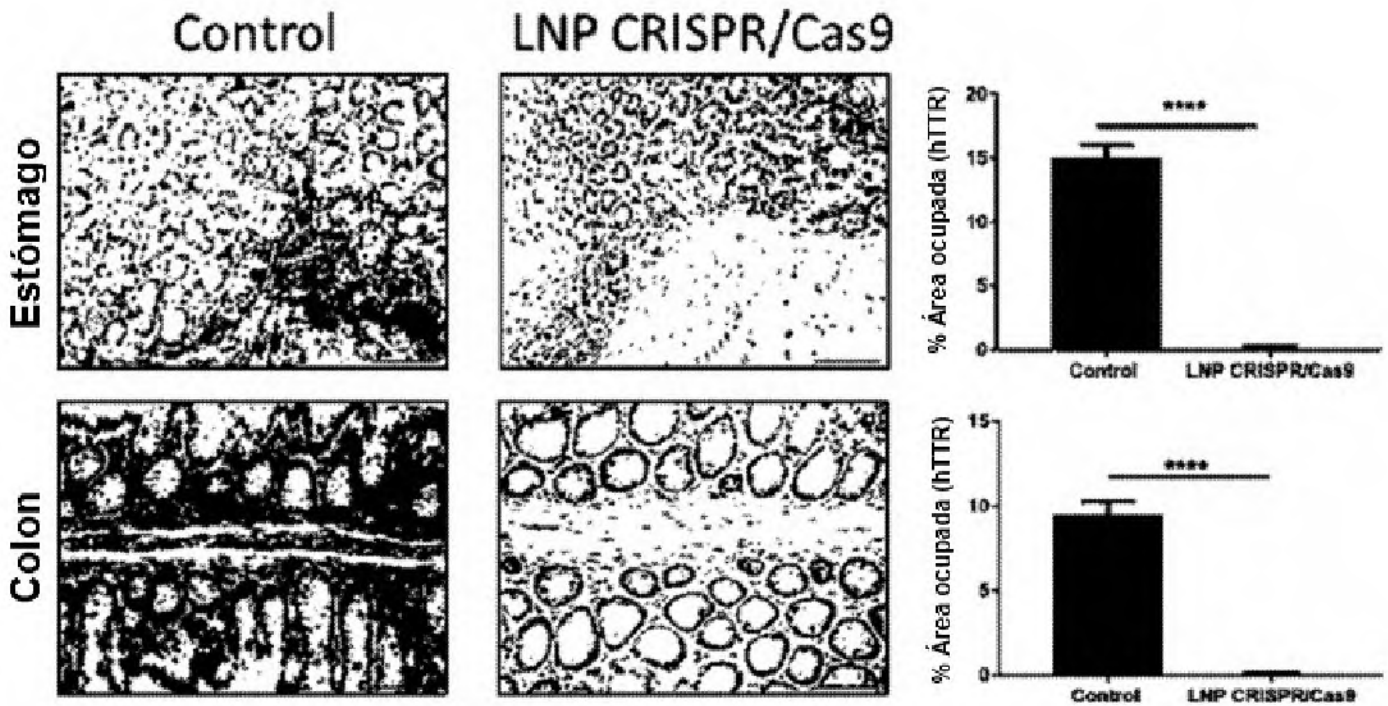


Figura 25A

Figura 25B



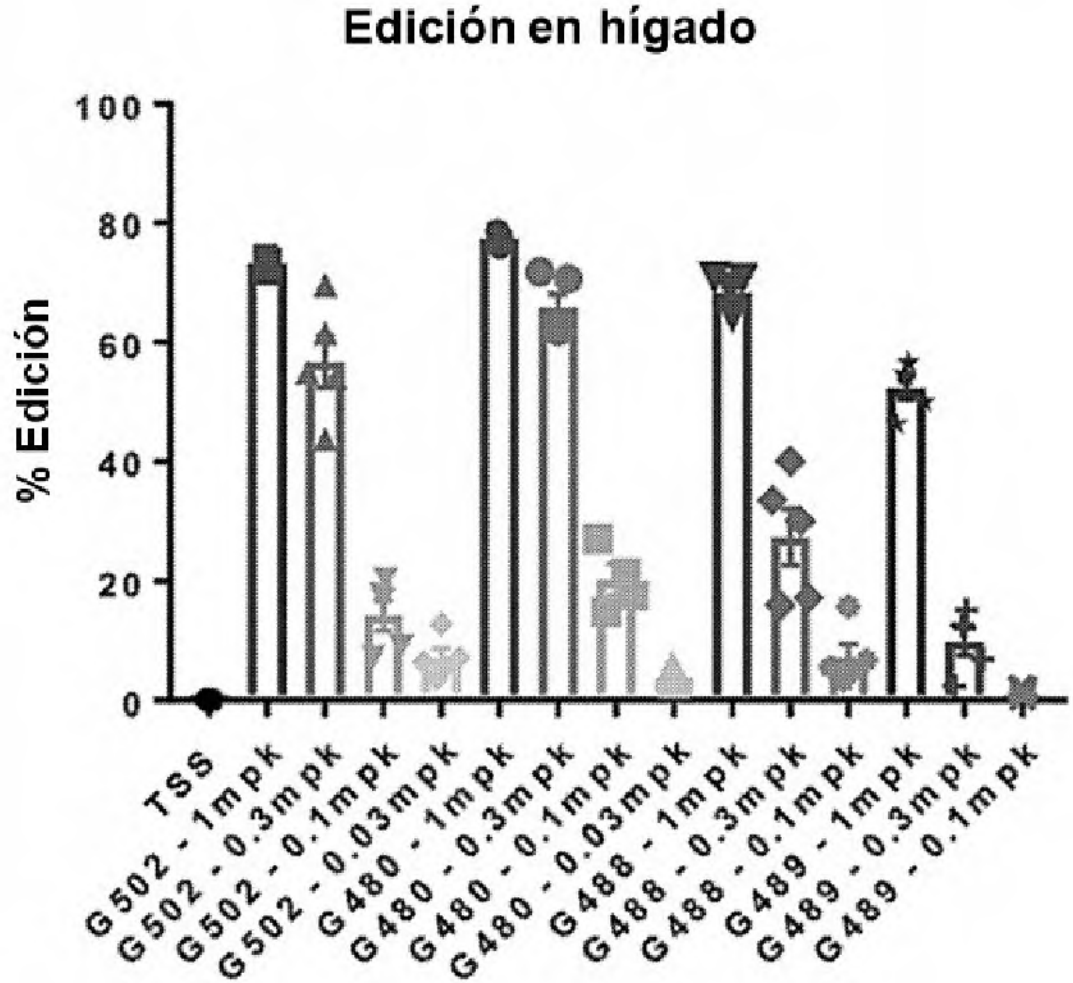

Edición en hígado
% Edición
100
80
60
40
20
0
TSS
G502 - 1mpk
G502 - 0.3mpk
G502 - 0.1mpk
G502 - 0.03mpk
G480 - 1mpk
G480 - 0.3mpk
G480 - 0.1mpk
G480 - 0.03mpk
G488 - 1mpk
G488 - 0.3mpk
G488 - 0.1mpk
G489 - 1mpk
G489 - 0.3mpk
G489 - 0.1mpk

Figura 26A

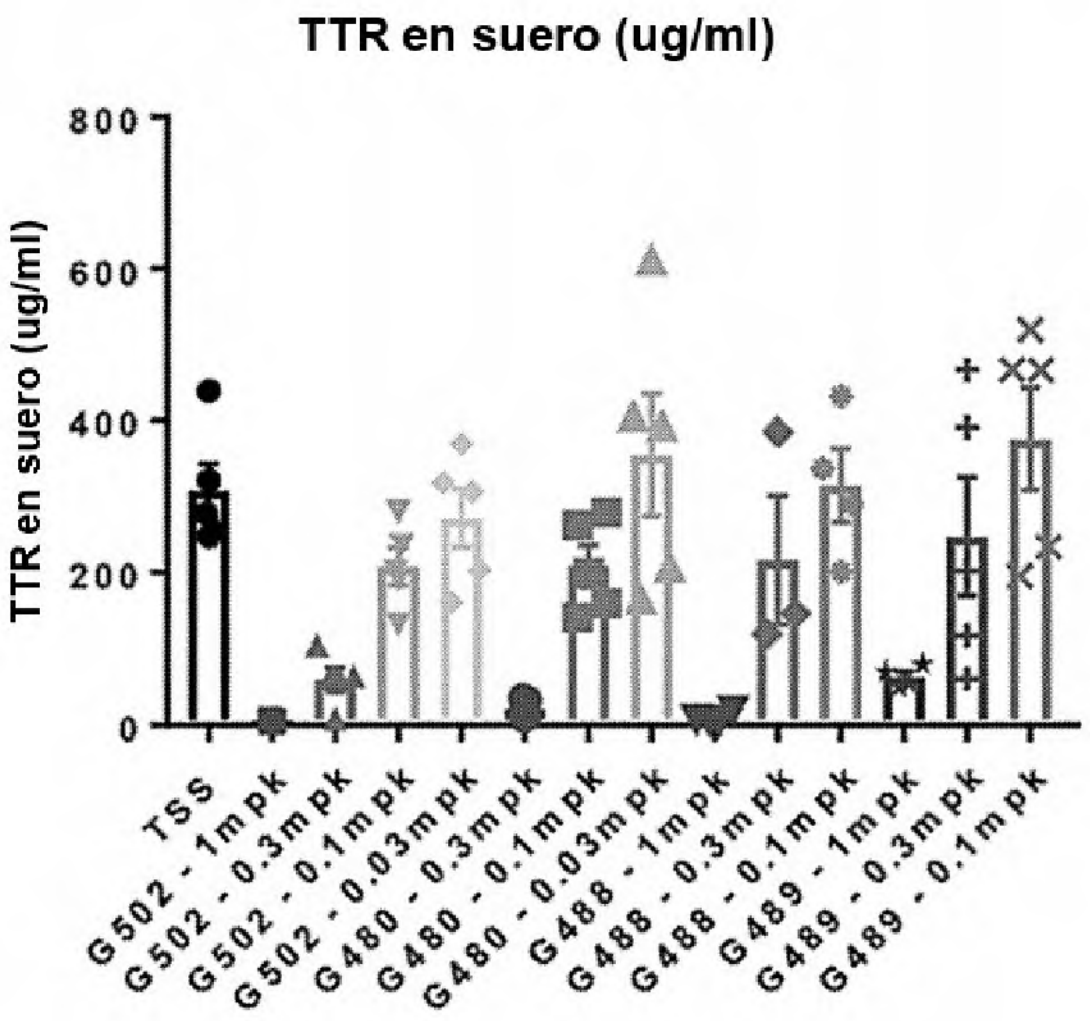

TTR en suero (ug/ml)
TTR en suero (ug/ml)
800
600
400
200
0
TSS
G502 - 1mpk
G502 - 0.3mpk
G502 - 0.1mpk
G502 - 0.03mpk
G480 - 0.3mpk
G480 - 0.1mpk
G480 - 0.03mpk
G488 - 1mpk
G488 - 0.3mpk
G488 - 0.1mpk
G489 - 1mpk
G489 - 0.3mpk
G489 - 0.1mpk

Figura 26B

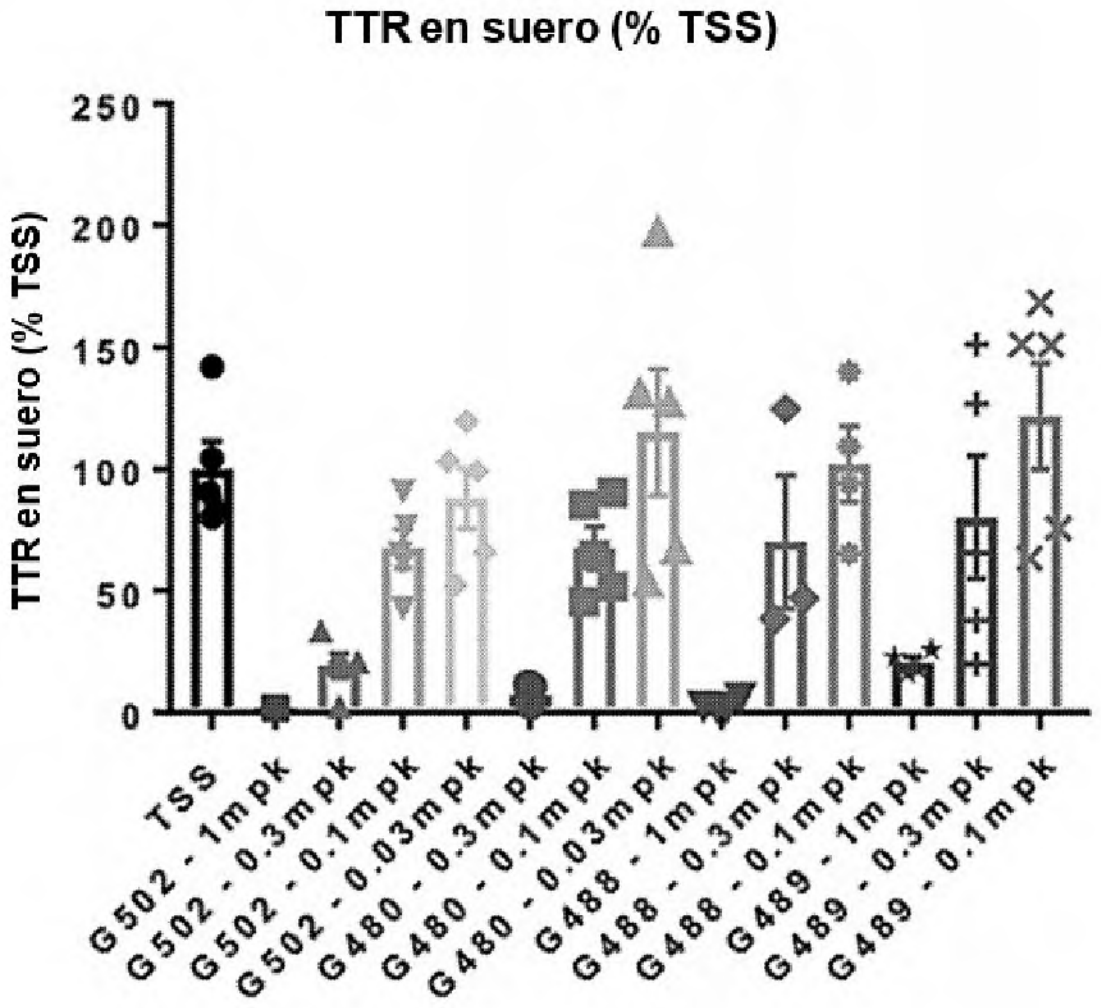

TTR en suero (% TSS)
TTR en suero (% TSS)
250
200
150
100
50
0
TSS
G502 - 1mpk
G502 - 0.3mpk
G502 - 0.1mpk
G502 - 0.03mpk
G480 - 0.3mpk
G480 - 0.1mpk
G480 - 0.03mpk
G488 - 1mpk
G488 - 0.3mpk
G488 - 0.1mpk
G489 - 1mpk
G489 - 0.3mpk
G489 - 0.1mpk

Figura 26C

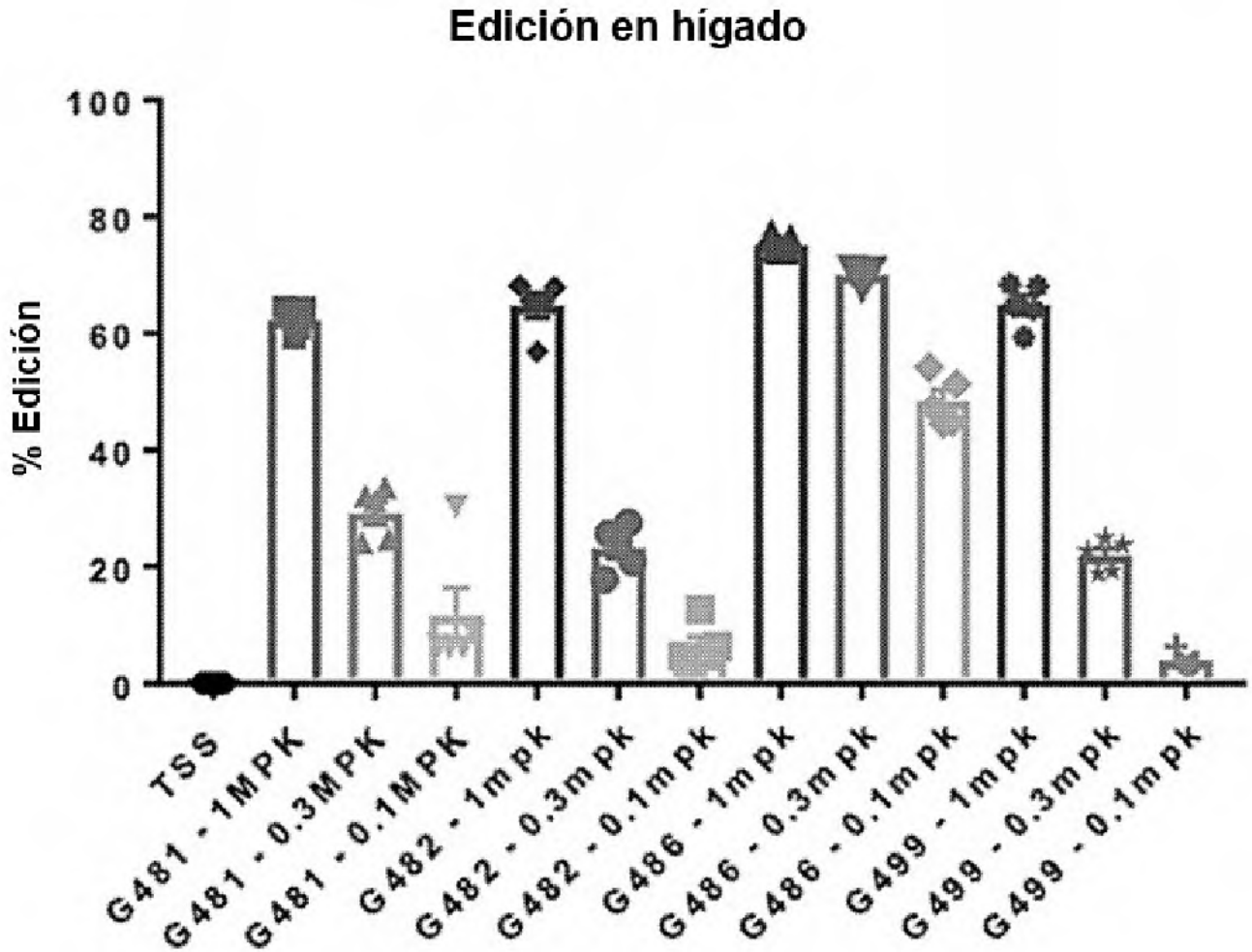

Edición en hígado
% Edición
100
80
60
40
20
0
TSS
G481 - 1MPK
G481 - 0.3MPK
G481 - 0.1MPK
G482 - 1mpk
G482 - 0.3mpk
G482 - 0.1mpk
G486 - 1mpk
G486 - 0.3mpk
G486 - 0.1mpk
G499 - 1mpk
G499 - 0.3mpk
G499 - 0.1mpk

Figura 27A

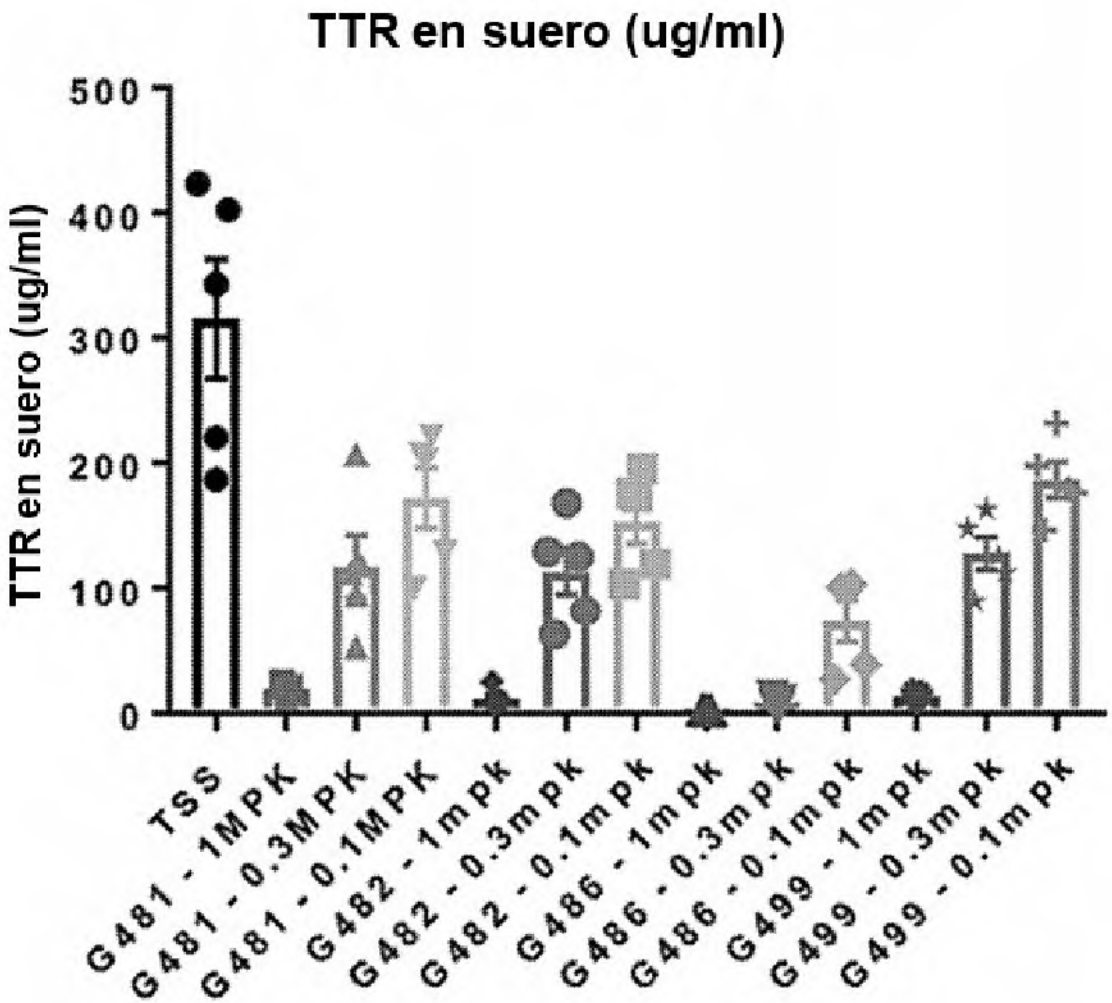

TTR en suero (ug/ml)
TTR en suero (ug/ml)
500
400
300
200
100
0
TSS
G481 - 1MPK
G481 - 0.3MPK
G481 - 0.1MPK
G482 - 1mpk
G482 - 0.3mpk
G482 - 0.1mpk
G486 - 1mpk
G486 - 0.3mpk
G486 - 0.1mpk
G499 - 1mpk
G499 - 0.3mpk
G499 - 0.1mpk

Figura 27B

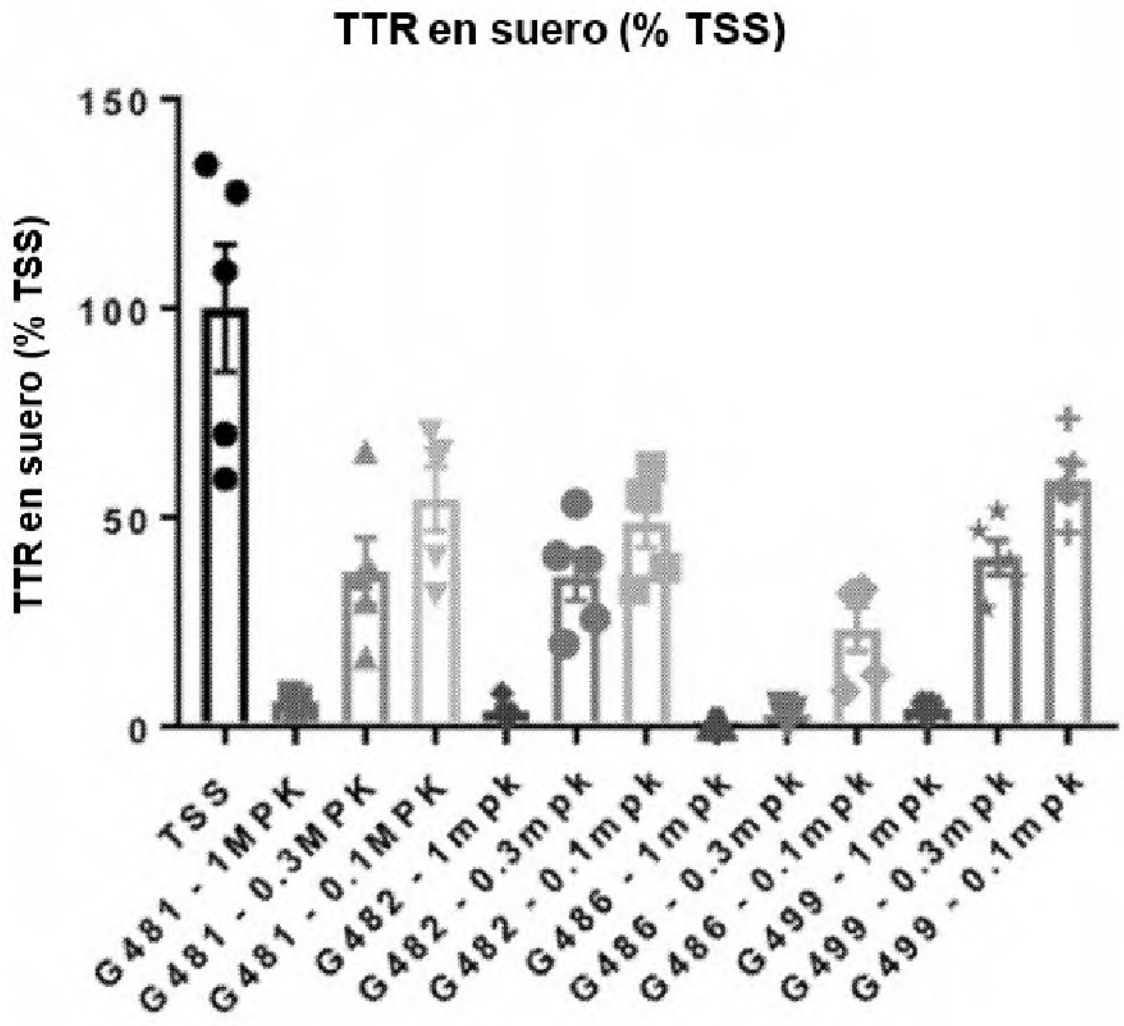

TTR en suero (% TSS)
TTR en suero (% TSS)
150
100
50
0
TSS
G481 - 1MPK
G481 - 0.3MPK
G481 - 0.1MPK
G482 - 1mpk
G482 - 0.3mpk
G482 - 0.1mpk
G486 - 1mpk
G486 - 0.3mpk
G486 - 0.1mpk
G499 - 1mpk
G499 - 0.3mpk
G499 - 0.1mpk

Figura 27C

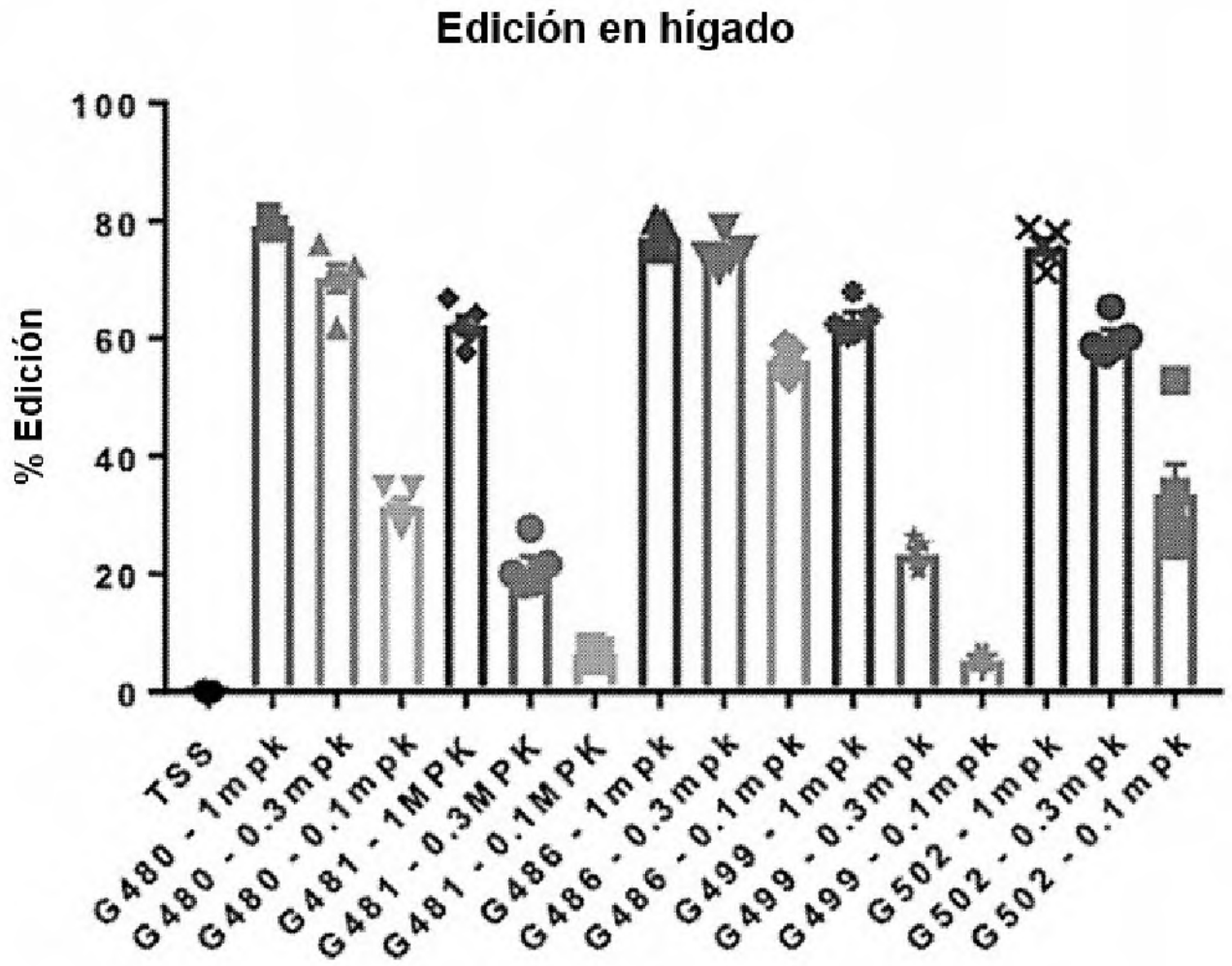

Edición en hígado
% Edición
100
80
60
40
20
0
TSS
G480 - 1mpk
G480 - 0.3mpk
G480 - 0.1mpk
G481 - 1MPK
G481 - 0.3MPK
G481 - 0.1MPK
G486 - 1mpk
G486 - 0.3mpk
G486 - 0.1mpk
G499 - 1mpk
G499 - 0.3mpk
G499 - 0.1mpk
G502 - 1mpk
G502 - 0.3mpk
G502 - 0.1mpk

Figura 28A

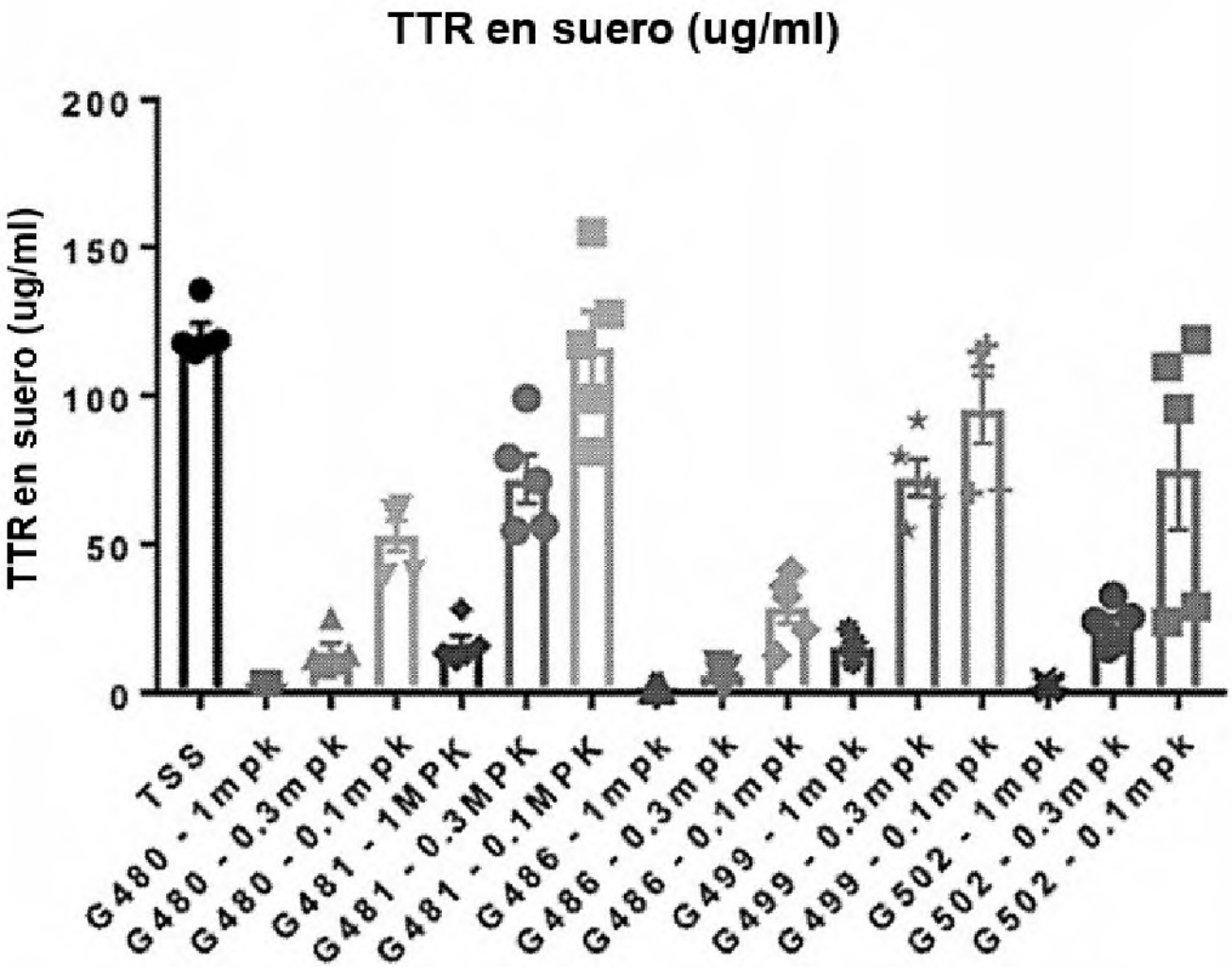

TTR en suero (ug/ml)
TTR en suero (ug/ml)
200
150
100
50
0
TSS
G480 - 1mpk
G480 - 0.3mpk
G480 - 0.1mpk
G481 - 1MPK
G481 - 0.3MPK
G481 - 0.1MPK
G486 - 1mpk
G486 - 0.3mpk
G486 - 0.1mpk
G499 - 1mpk
G499 - 0.3mpk
G499 - 0.1mpk
G502 - 1mpk
G502 - 0.3mpk
G502 - 0.1mpk

Figura 28B

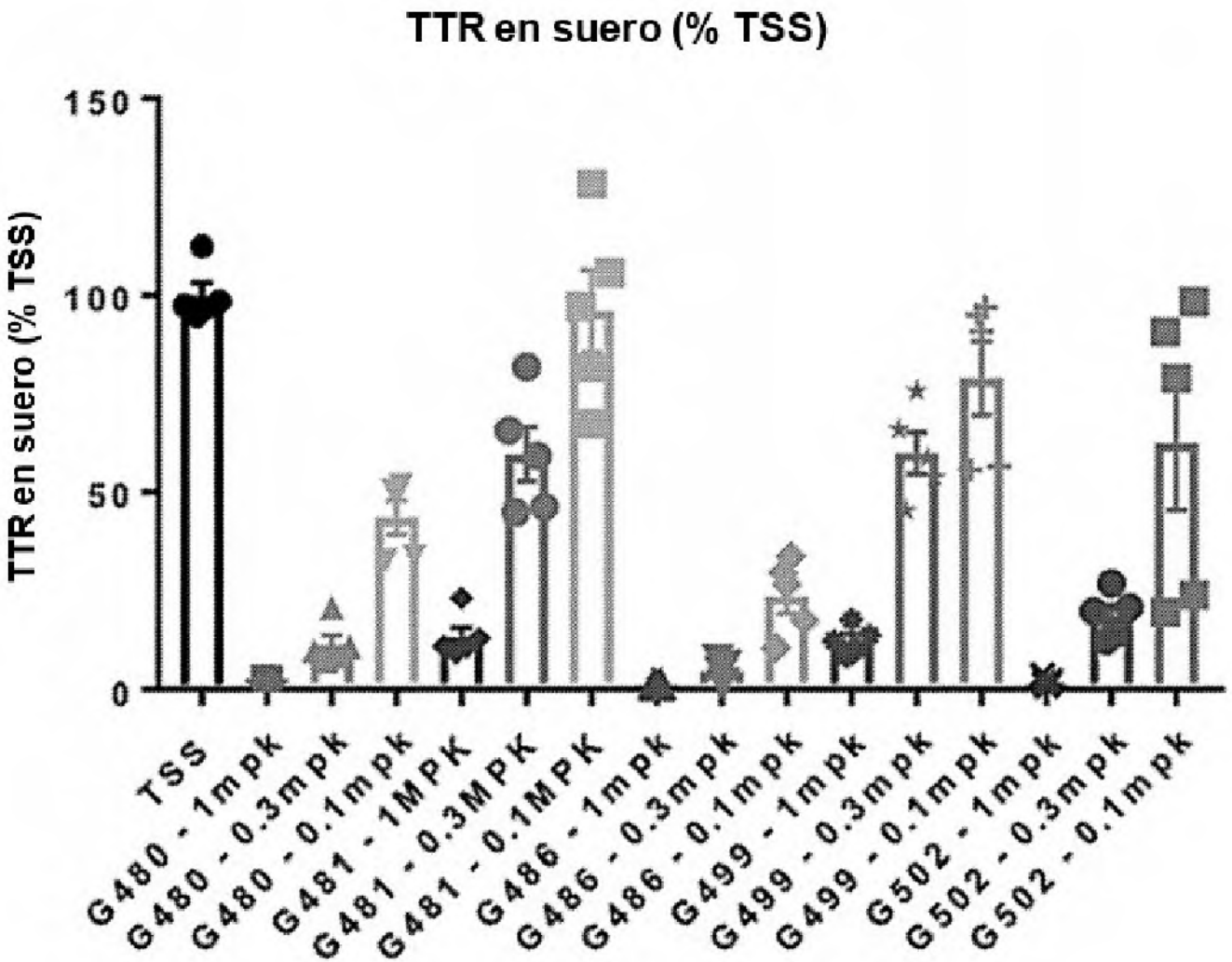

TTR en suero (% TSS)
TTR en suero (% TSS)
150
100
50
0
TSS
G480 - 1mpk
G480 - 0.3mpk
G480 - 0.1mpk
G481 - 1MPK
G481 - 0.3MPK
G481 - 0.1MPK
G486 - 1mpk
G486 - 0.3mpk
G486 - 0.1mpk
G499 - 1mpk
G499 - 0.3mpk
G499 - 0.1mpk
G502 - 1mpk
G502 - 0.3mpk
G502 - 0.1mpk

Figura 28C

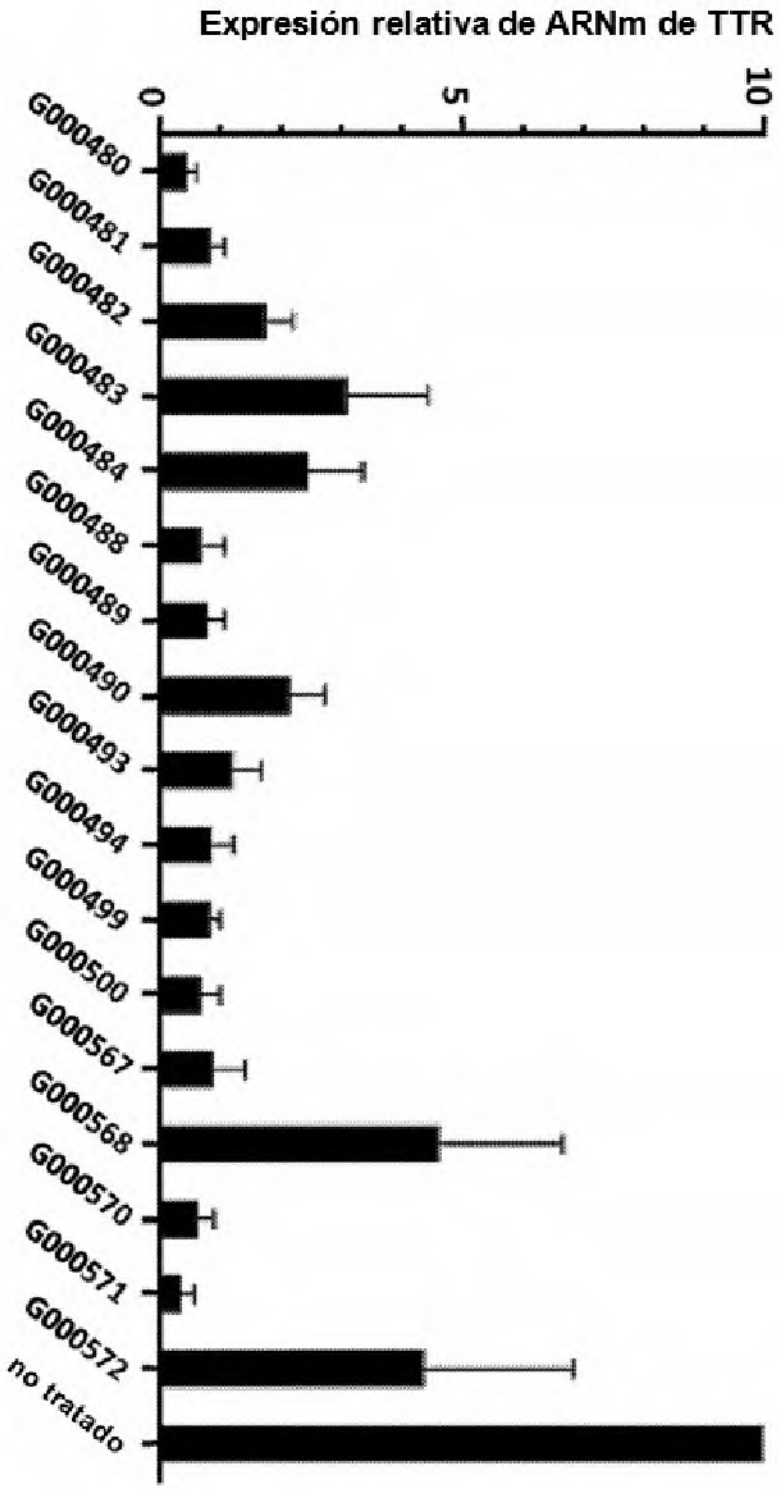

Expresión relativa de ARNm de TTR
0
5
10
G000480
G000481
G000482
G000483
G000484
G000488
G000489
G000490
G000493
G000494
G000499
G000500
G000567
G000568
G000570
G000571
G000572
no tratado

Figura 29

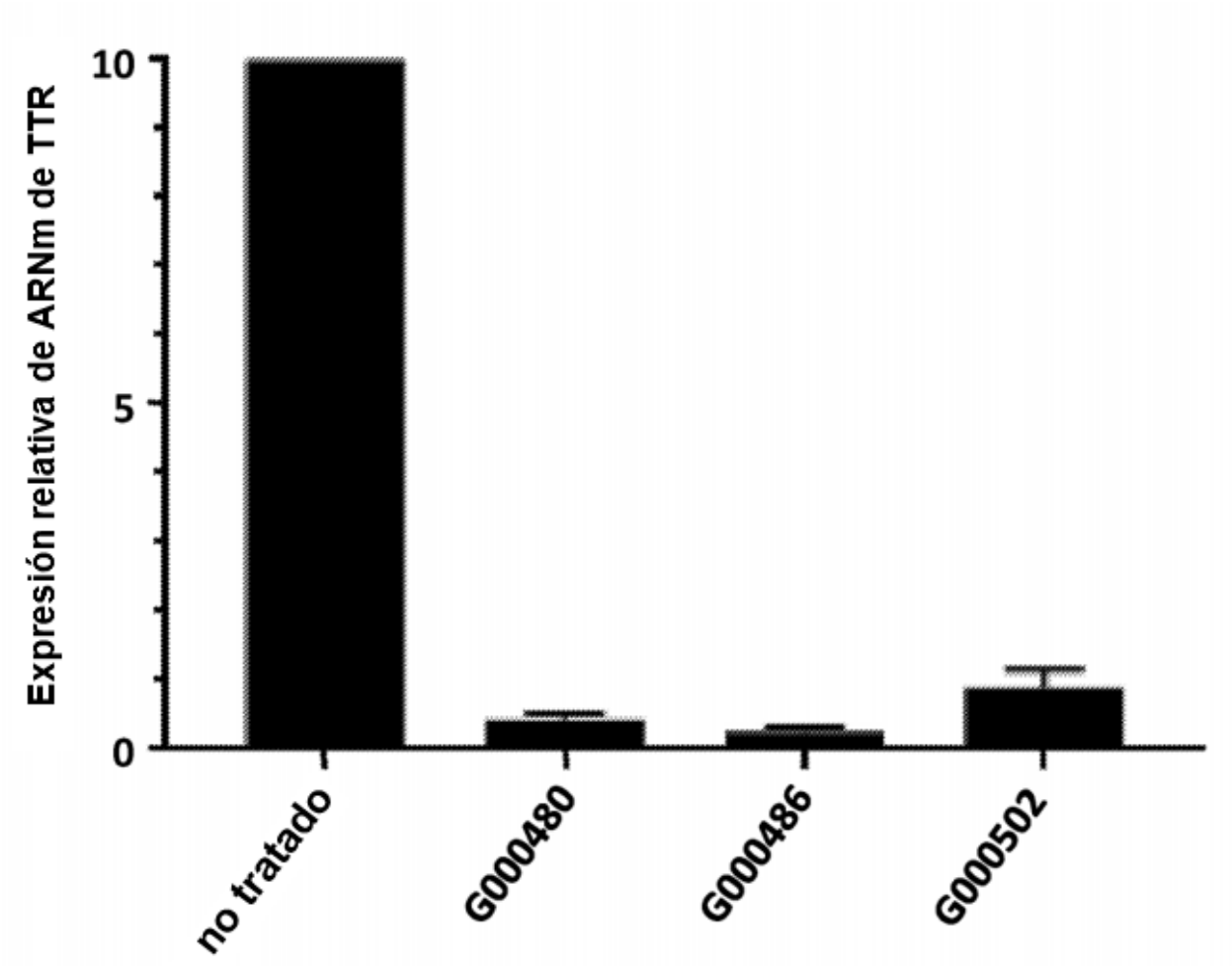

Expresión relativa de ARNm de TTR
10
5
0
no tratado
G000480
G000486
G000502

Figura 30

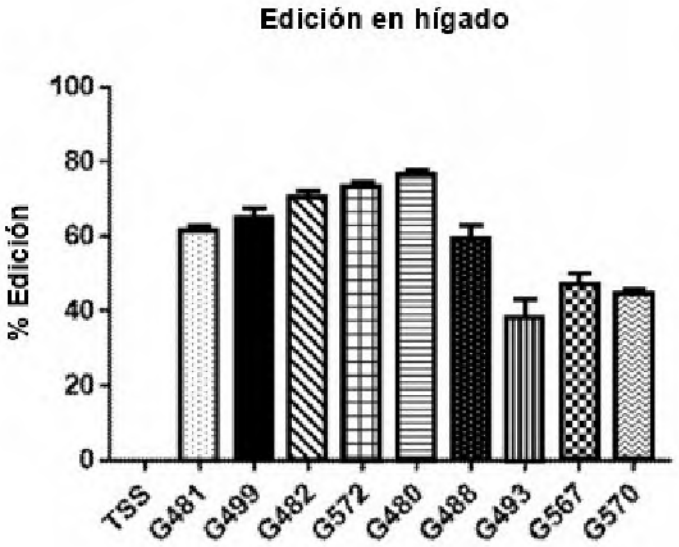


Figura 14A

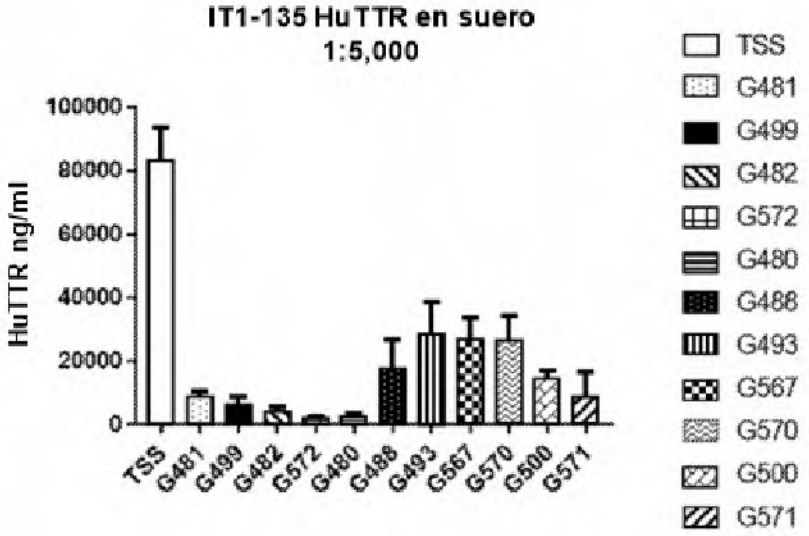


Figura 14B

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INTELLIA THERAPEUTICS, INC.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA EDICIÓN DEL GEN TTR Y EL TRATAMIENTO DE LA AMILOIDOSIS ATTR

<130> 01155-0013-00PCT

<150> US 62/566,236
<151> 2017-09-29

<150> US 62/671,902
<151> 2018-05-15

<160> 278

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 4411
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con 5 UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, secuencia de Kozak, y 3 UTR de ALB

<400> 1
gggtcccgca gtcggcgtcc agcggctctg cttgttcgtg tgtgtgtcgt tgcaggcctt 60

attcggatcc gccaccatgg acaagaagta cagcatcgga ctggacatcg gaacaaacag 120

cgtcggatgg gcagtcatca cagacgaata caaggtcccg agcaagaagt tcaaggtcct 180

gggaaacaca gacagacaca gcatcaagaa gaacctgatc ggagcactgc tgttcgacag 240

cggagaaaca gcagaagcaa caagactgaa gagaacagca agaagaagat acacaagaag 300

aaagaacaga atctgctacc tgcaggaaat cttcagcaac gaaatggcaa aggtcgacga 360

cagcttcttc cacagactgg aagaaagctt cctggtcgaa gaagacaaga agcacgaaag 420

acacccgatc ttcggaaaca tcgtcgacga agtcgcatac cacgaaaagt acccgacaat 480

ctaccacctg agaaagaagc tggtcgacag cacagacaag gcagacctga gactgatcta 540

cctggcactg gcacacatga tcaagttcag aggacacttc ctgatcgaag gagacctgaa 600

cccggacaac agcgacgtcg acaagctgtt catccagctg gtccagacat acaaccagct 660

gttcgaagaa aacccgatca acgcaagcgg agtcgacgca aaggcaatcc tgagcgcaag 720

actgagcaag agcagaagac tggaaaacct gatcgcacag ctgccgggag aaaagaagaa 780

cggactgttc ggaaacctga tcgcactgag cctgggactg acaccgaact tcaagagcaa 840

cttcgacctg gcagaagacg caaagctgca gctgagcaag gacacatacg acgacgacct 900

ggacaacctg ctggcacaga tcggagacca gtacgcagac ctgttcctgg cagcaaagaa 960

cctgagcgac gcaatcctgc tgagcgacat cctgagagtc aacacagaaa tcacaaaggc 1020

accgctgagc gcaagcatga tcaagagata cgacgaacac caccaggacc tgacactgct 1080

gaaggcactg gtcagacagc agctgccgga aaagtacaag gaaatcttct tcgaccagag 1140

caagaacgga tacgcaggat acatcgacgg aggagcaagc caggaagaat tctacaagtt 1200

catcaagccg atcctggaaa agatggacgg aacagaagaa ctgctggtca agctgaacag 1260

agaagacctg ctgagaaagc agagaacatt cgacaacgga agcatcccgc accagatcca 1320

cctgggagaa ctgcacgcaa tcctgagaag acaggaagac ttctacccgt tcctgaagga 1380

caacagagaa aagatcgaaa agatcctgac attcagaatc ccgtactacg tcggaccgct 1440

ggcaagagga aacagcagat tcgcatggat gacaagaaag agcgaagaaa caatcacacc 1500

gtggaacttc gaagaagtcg tcgacaaggg agcaagcgca cagagcttca tcgaaagaat 1560

gacaaacttc gacaagaacc tgccgaacga aaaggtcctg ccgaagcaca gcctgctgta 1620

cgaatacttc acagtctaca acgaactgac aaaggtcaag tacgtcacag aaggaatgag 1680

aaagccggca ttcctgagcg gagaacagaa gaaggcaatc gtcgacctgc tgttcaagac 1740

aaacagaaag gtcacagtca agcagctgaa ggaagactac ttcaagaaga tcgaatgctt 1800

cgacagcgtc gaaatcagcg gagtcgaaga cagattcaac gcaagcctgg gaacatacca 1860

cgacctgctg aagatcatca aggacaagga cttcctggac aacgaagaaa acgaagacat 1920

cctggaagac atcgtcctga cactgacact gttcgaagac agagaaatga tcgaagaaag 1980

actgaagaca tacgcacacc tgttcgacga caaggtcatg aagcagctga agagaagaag 2040

atacacagga tggggaagac tgagcagaaa gctgatcaac ggaatcagag acaagcagag 2100

cggaaagaca atcctggact tcctgaagag cgacggattc gcaaacagaa acttcatgca 2160

gctgatccac gacgacagcc tgacattcaa ggaagacatc cagaaggcac aggtcagcgg 2220

acagggagac agcctgcacg aacacatcgc aaacctggca ggaagcccgg caatcaagaa 2280

gggaatcctg cagacagtca aggtcgtcga cgaactggtc aaggtcatgg gaagacacaa 2340

gccggaaaac atcgtcatcg aaatggcaag agaaaaccag acaacacaga agggacagaa 2400

gaacagcaga gaaagaatga agagaatcga agaaggaatc aaggaactgg gaagccagat 2460

cctgaaggaa cacccggtcg aaaacacaca gctgcagaac gaaaagctgt acctgtacta 2520

cctgcagaac ggaagagaca tgtacgtcga ccaggaactg gacatcaaca gactgagcga 2580

ctacgacgtc gaccacatcg tcccgcagag cttcctgaag gacgacagca tcgacaacaa 2640

ggtcctgaca agaagcgaca agaacagagg aaagagcgac aacgtcccga gcgaagaagt 2700

cgtcaagaag atgaagaact actggagaca gctgctgaac gcaaagctga tcacacagag 2760

aaagttcgac aacctgacaa aggcagagag aggaggactg agcgaactgg acaaggcagg 2820

attcatcaag agacagctgg tcgaaacaag acagatcaca aagcacgtcg cacagatcct 2880

ggacagcaga atgaacacaa agtacgacga aaacgacaag ctgatcagag aagtcaaggt 2940

catcacactg aagagcaagc tggtcagcga cttcagaaag gacttccagt tctacaaggt 3000

cagagaaatc aacaactacc accacgcaca cgacgcatac ctgaacgcag tcgtcggaac 3060

agcactgatc aagaagtacc cgaagctgga aagcgaattc gtctacggag actacaaggt 3120

ctacgacgtc agaaagatga tcgcaaagag cgaacaggaa atcggaaagg caacagcaaa 3180

gtacttcttc tacagcaaca tcatgaactt cttcaagaca gaaatcacac tggcaaacgg 3240

agaaatcaga aagagaccgc tgatcgaaac aaacggagaa acaggagaaa tcgtctggga 3300

caagggaaga gacttcgcaa cagtcagaaa ggtcctgagc atgccgcagg tcaacatcgt 3360

caagaagaca gaagtccaga caggaggatt cagcaaggaa agcatcctgc cgaagagaaa 3420

cagcgacaag ctgatcgcaa gaaagaagga ctgggacccg aagaagtacg gaggattcga 3480

cagcccgaca gtcgcataca gcgtcctggt cgtcgcaaag gtcgaaaagg gaaagagcaa 3540

gaagctgaag agcgtcaagg aactgctggg aatcacaatc atggaaagaa gcagcttcga 3600

aaagaacccg atcgacttcc tggaagcaaa gggatacaag gaagtcaaga aggacctgat 3660

catcaagctg ccgaagtaca gcctgttcga actggaaaac ggaagaaaga gaatgctggc 3720

aagcgcagga gaactgcaga agggaaacga actggcactg ccgagcaagt acgtcaactt 3780

cctgtacctg gcaagccact acgaaaagct gaagggaagc ccggaagaca acgaacagaa 3840

gcagctgttc gtcgaacagc acaagcacta cctggacgaa atcatcgaac agatcagcga 3900

attcagcaag agagtcatcc tggcagacgc aaacctggac aaggtcctga gcgcatacaa 3960

caagcacaga gacaagccga tcagagaaca ggcagaaaac atcatccacc tgttcacact 4020

gacaaacctg ggagcaccgg cagcattcaa gtacttcgac acaacaatcg acagaaagag 4080

atacacaagc acaaaggaag tcctggacgc aacactgatc caccagagca tcacaggact 4140

gtacgaaaca agaatcgacc tgagccagct gggaggagac ggaggaggaa gcccgaagaa 4200

gaagagaaag gtctagctag ccatcacatt taaaagcatc tcagcctacc atgagaataa 4260

gagaaagaaa atgaagatca atagcttatt catctctttt tctttttcgt tggtgtaaag 4320

ccaacaccct gtctaaaaaa cataaatttc tttaatcatt ttgcctcttt tctctgtgct 4380

tcaattaata aaaaatggaa agaacctcga g 4411

<210> 2
<211> 4403
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 que comprende ORF de Cas9 correspondiente a la SEQ ID NO: 205 que usa codones con expresión generalmente alta en humanos

<400> 2
gggtcccgca gtcggcgtcc agcggctctg cttgttcgtg tgtgtgtcgt tgcaggcctt 60

attcggatcc atgcctaaga aaaagcggaa ggtcgacggg gataagaagt actcaatcgg 120

gctggatatc ggaactaatt ccgtgggttg ggcagtgatc acggatgaat acaaagtgcc 180

gtccaagaag ttcaaggtcc tggggaacac cgatagacac agcatcaaga aaaatctcat 240

cggagccctg ctgtttgact ccggcgaaac cgcagaagcg acccggctca aacgtaccgc 300

gaggcgacgc tacacccggc ggaagaatcg catctgctat ctgcaagaga tcttttcgaa 360

cgaaatggca aaggtcgacg acagcttctt ccaccgcctg gaagaatctt tcctggtgga 420

ggaggacaag aagcatgaac ggcatcctat ctttggaaac atcgtcgacg aagtggcgta 480

ccacgaaaag tacccgacca tctaccatct gcggaagaag ttggttgact caactgacaa 540

ggccgacctc agattgatct acttggccct cgcccatatg atcaaattcc gcggacactt 600

cctgatcgaa ggcgatctga accctgataa ctccgacgtg gataagcttt tcattcaact 660

ggtgcagacc tacaaccaac tgttcgaaga aaacccaatc aatgctagcg gcgtcgatgc 720

caaggccatc ctgtccgccc ggctgtcgaa gtcgcggcgc ctcgaaaacc tgatcgcaca 780

gctgccggga gagaaaaaga acggactttt cggcaacttg atcgctctct cactgggact 840

cactcccaat ttcaagtcca attttgacct ggccgaggac gcgaagctgc aactctcaaa 900

ggacacctac gacgacgact tggacaattt gctggcacaa attggcgatc agtacgcgga 960

tctgttcctt gccgctaaga acctttcgga cgcaatcttg ctgtccgata tcctgcgcgt 1020

gaacaccgaa ataaccaaag cgccgcttag cgcctcgatg attaagcggt acgacgagca 1080

tcaccaggat ctcacgctgc tcaaagcgct cgtgagacag caactgcctg aaaagtacaa 1140

ggagatcttc ttcgaccagt ccaagaatgg gtacgcaggg tacatcgatg gaggcgctag 1200

ccaggaagag ttctataagt tcatcaagcc aatcctggaa aagatggacg gaaccgaaga 1260

actgctggtc aagctgaaca gggaggatct gctccggaaa cagagaacct ttgacaacgg 1320

atccattccc caccagatcc atctgggtga gctgcacgcc atcttgcggc gccaggagga 1380

cttttaccca ttcctcaagg acaaccggga aaagatcgag aaaattctga cgttccgcat 1440

cccgtattac gtgggcccac tggcgcgcgg caattcgcgc ttcgcgtgga tgactagaaa 1500

atcagaggaa accatcactc cttggaattt cgaggaagtt gtggataagg gagcttcggc 1560

acaaagcttc atcgaacgaa tgaccaactt cgacaagaat ctcccaaacg agaaggtgct 1620

tcctaagcac agcctccttt acgaatactt cactgtctac aacgaactga ctaaagtgaa 1680

atacgttact gaaggaatga ggaagccggc ctttctgtcc ggagaacaga agaaagcaat 1740

tgtcgatctg ctgttcaaga ccaaccgcaa ggtgaccgtc aagcagctta aagaggacta 1800

cttcaagaag atcgagtgtt tcgactcagt ggaaatcagc ggggtggagg acagattcaa 1860

cgcttcgctg ggaacctatc atgatctcct gaagatcatc aaggacaagg acttccttga 1920

caacgaggag aacgaggaca tcctggaaga tatcgtcctg accttgaccc ttttcgagga 1980

tcgcgagatg atcgaggaga ggcttaagac ctacgctcat ctcttcgacg ataaggtcat 2040

gaaacaactc aagcgccgcc ggtacactgg ttggggccgc ctctcccgca agctgatcaa 2100

cggtattcgc gataaacaga gcggtaaaac tatcctggat ttcctcaaat cggatggctt 2160

cgctaatcgt aacttcatgc aattgatcca cgacgacagc ctgaccttta aggaggacat 2220

ccaaaaagca caagtgtccg gacagggaga ctcactccat gaacacatcg cgaatctggc 2280

cggttcgccg gcgattaaga agggaattct gcaaactgtg aaggtggtcg acgagctggt 2340

gaaggtcatg ggacggcaca aaccggagaa tatcgtgatt gaaatggccc gagaaaacca 2400

gactacccag aagggccaga aaaactcccg cgaaaggatg aagcggatcg aagaaggaat 2460

caaggagctg ggcagccaga tcctgaaaga gcacccggtg gaaaacacgc agctgcagaa 2520

cgagaagctc tacctgtact atttgcaaaa tggacgggac atgtacgtgg accaagagct 2580

ggacatcaat cggttgtctg attacgacgt ggaccacatc gttccacagt cctttctgaa 2640

ggatgactcg atcgataaca aggtgttgac tcgcagcgac aagaacagag ggaagtcaga 2700

taatgtgcca tcggaggagg tcgtgaagaa gatgaagaat tactggcggc agctcctgaa 2760

tgcgaagctg attacccaga gaaagtttga caatctcact aaagccgagc gcggcggact 2820

ctcagagctg gataaggctg gattcatcaa acggcagctg gtcgagactc ggcagattac 2880

caagcacgtg gcgcagatct tggactcccg catgaacact aaatacgacg agaacgataa 2940

gctcatccgg gaagtgaagg tgattaccct gaaaagcaaa cttgtgtcgg actttcggaa 3000

ggactttcag ttttacaaag tgagagaaat caacaactac catcacgcgc atgacgcata 3060

cctcaacgct gtggtcggta ccgccctgat caaaaagtac cctaaacttg aatcggagtt 3120

tgtgtacgga gactacaagg tctacgacgt gaggaagatg atagccaagt ccgaacagga 3180

aatcgggaaa gcaactgcga aatacttctt ttactcaaac atcatgaact ttttcaagac 3240

tgaaattacg ctggccaatg gagaaatcag gaagaggcca ctgatcgaaa ctaacggaga 3300

aacgggcgaa atcgtgtggg acaagggcag ggacttcgca actgttcgca aagtgctctc 3360

tatgccgcaa gtcaatattg tgaagaaaac cgaagtgcaa accggcggat tttcaaagga 3420

atcgatcctc ccaaagagaa atagcgacaa gctcattgca cgcaagaaag actgggaccc 3480

gaagaagtac ggaggattcg attcgccgac tgtcgcatac tccgtcctcg tggtggccaa 3540

ggtggagaag ggaaagagca aaaagctcaa atccgtcaaa gagctgctgg ggattaccat 3600

catggaacga tcctcgttcg agaagaaccc gattgatttc ctcgaggcga agggttacaa 3660

ggaggtgaag aaggatctga tcatcaaact ccccaagtac tcactgttcg aactggaaaa 3720

tggtcggaag cgcatgctgg cttcggccgg agaactccaa aaaggaaatg agctggcctt 3780

gcctagcaag tacgtcaact tcctctatct tgcttcgcac tacgaaaaac tcaaagggtc 3840

accggaagat aacgaacaga agcagctttt cgtggagcag cacaagcatt atctggatga 3900

aatcatcgaa caaatctccg agttttcaaa gcgcgtgatc ctcgccgacg ccaacctcga 3960

caaagtcctg tcggcctaca ataagcatag agataagccg atcagagaac aggccgagaa 4020

cattatccac ttgttcaccc tgactaacct gggagcccca gccgccttca agtacttcga 4080

tactactatc gatcgcaaaa gatacacgtc caccaaggaa gttctggacg cgaccctgat 4140

ccaccaaagc atcactggac tctacgaaac taggatcgat ctgtcgcagc tgggtggcga 4200

ttgatagtct agccatcaca tttaaaagca tctcagccta ccatgagaat aagagaaaga 4260

aaatgaagat caatagctta ttcatctctt tttctttttc gttggtgtaa agccaacacc 4320

ctgtctaaaa aacataaatt tctttaatca ttttgcctct tttctctgtg cttcaattaa 4380

taaaaaatgg aaagaacctc gag 4403

<210> 3
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(20)
<223> n es a, c, g, o u

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<400> 3
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 4
<211> 105
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético: secuencia poli-A 30/30/39

<400> 4
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gcgaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaccgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 105

<210> 5
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003335 dirigido a TTR humana (Exón 1)

<400> 5
cugcuccucc ucugccuugc 20

<210> 6
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003336 dirigido a TTR humana (Exón 1)

<400> 6
ccuccucugc cuugcuggac 20

<210> 7
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003337 dirigido a TTR humana (Exón 1)

<400> 7
ccaguccagc aaggcagagg 20

<210> 8
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003338 dirigido a TTR humana (Exón 1)

<400> 8
auaccagucc agcaaggcag 20

<210> 9
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003339 dirigido a TTR humana (Exón 1)

<400> 9
acacaaauac caguccagca 20

<210> 10
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003340 dirigido a TTR humana (Exón 1)

<400> 10
uggacuggua uuugugucug 20

<210> 11
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003341 dirigido a TTR humana (Exón 1)

<400> 11
cugguauuug ugucugaggc 20

<210> 12
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003342 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 12
cuucucuaca cccagggcac 20

<210> 13
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003343 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 13
cagaggacac uuggauucac 20

<210> 14
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003344 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 14
uuugaccauc agaggacacu 20

<210> 15
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003345 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 15
ucuagaacuu ugaccaucag 20

<210> 16
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003346 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 16
aaaguucuag augcuguccg 20

<210> 17
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003347 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 17
cauugauggc aggacugccu 20

<210> 18
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003348 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 18
aggcaguccu gccaucaaug 20

<210> 19
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003349 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 19
ugcacggcca cauugauggc 20

<210> 20
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003350 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 20
cacaugcacg gccacauuga 20

<210> 21
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003351 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 21
agccuuucug aacacaugca 20

<210> 22
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003352 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 22
gaaaggcugc ugaugacacc 20

<210> 23
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003353 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 23
aaaggcugcu gaugacaccu 20

<210> 24
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003354 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 24
accugggagc cauuugccuc 20

<210> 25
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003355 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 25
cccagaggca aauggcuccc 20

<210> 26
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003356 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 26
gcaacuuacc cagaggcaaa 20

<210> 27
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003357 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 27
uucuuuggca acuuacccag 20

<210> 28
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003358 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 28
augcagcucu ccagacucac 20

<210> 29
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003359 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 29
agugagucug gagagcugca 20

<210> 30
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003360 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 30
gugagucugg agagcugcau 20

<210> 31
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003361 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 31
gcugcauggg cucacaacug 20

<210> 32
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003362 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 32
gcaugggcuc acaacugagg 20

<210> 33
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003363 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 33
acugaggagg aauuuguaga 20

<210> 34
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003364 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 34
cugaggagga auuuguagaa 20

<210> 35
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003365 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 35
uguagaaggg auauacaaag 20

<210> 36
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003366 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 36
aaauagacac caaaucuuac 20

<210> 37
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003367 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 37
agacaccaaa ucuuacugga 20

<210> 38
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003368 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 38
aagugccuuc caguaagauu 20

<210> 39
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003369 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 39
cucugcaugc ucauggaaug 20

<210> 40
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003370 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 40
ccucugcaug cucauggaau 20

<210> 41
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003371 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 41
accucugcau gcucauggaa 20

<210> 42
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003372 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 42
uacucaccuc ugcaugcuca 20

<210> 43
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003373 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 43
guauucacag ccaacgacuc 20

<210> 44
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003374 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 44
gcggcggggg ccggagucgu 20

<210> 45
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003375 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 45
aaugguguag cggcgggggc 20

<210> 46
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003376 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 46
cggcaauggu guagcggcgg 20

<210> 47
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003377 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 47
gcggcaaugg uguagcggcg 20

<210> 48
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003378 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 48
ggcggcaaug guguagcggc 20

<210> 49
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003379 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 49
gggcggcaau gguguagcgg 20

<210> 50
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003380 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 50
gcagggcggc aaugguguag 20

<210> 51
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003381 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 51
ggggcucagc agggcggcaa 20

<210> 52
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003382 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 52
ggaguagggg cucagcaggg 20

<210> 53
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003383 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 53
auaggaguag gggcucagca 20

<210> 54
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003384 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 54
aauaggagua ggggcucagc 20

<210> 55
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003385 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 55
ccccuacucc uauuccacca 20

<210> 56
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003386 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 56
ccguggugga auaggaguag 20

<210> 57
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003387 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 57
gccguggugg aauaggagua 20

<210> 58
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003388 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 58
gacgacagcc gugguggaau 20

<210> 59
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003389 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 59
auuggugacg acagccgugg 20

<210> 60
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003390 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 60
gggauuggug acgacagccg 20

<210> 61
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003391 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 61
ggcugucguc accaauccca 20

<210> 62
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR003392 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 62
agucccucau uccuugggau 20

<210> 63
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005298 dirigido a TTR humana (Exón 1)

<400> 63
uccacucauu cuuggcagga 20

<210> 64
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005299 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 64
agccguggug gaauaggagu 20

<210> 65
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005300 dirigido a TTR humana (Exón 1)

<400> 65
ucacagaaac acucaccgua 20

<210> 66
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005301 dirigido a TTR humana (Exón 1)

<400> 66
gucacagaaa cacucaccgu 20

<210> 67
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005302 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 67
acgugucuuc ucuacaccca 20

<210> 68
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005303 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 68
ugaauccaag uguccucuga 20

<210> 69
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005304 dirigido a TTR humana (Exón 2)

<400> 69
ggccgugcau guguucagaa 20

<210> 70
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005305 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 70
uauaggaaaa ccagugaguc 20

<210> 71
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005306 dirigido a TTR humana (Exón 3)

<400> 71
aaaucuuacu ggaaggcacu 20

<210> 72
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005307 dirigido a TTR humana (Exón 4)

<400> 72
ugucugucuu cucucauagg 20

<210> 73
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR000689 dirigido a TTR de cyno

<400> 73
acacaaauac caguccagcg 20

<210> 74
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005364 dirigido a TTR de cyno

<400> 74
aaaggcugcu gaugagaccu 20

<210> 75
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005365 dirigido a TTR de cyno

<400> 75
cauugacagc aggacugccu 20

<210> 76
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005366 dirigido a TTR de cyno

<400> 76
auaccagucc agcgaggcag 20

<210> 77
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005367 dirigido a TTR de cyno

<400> 77
ccaguccagc gaggcagagg 20

<210> 78
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005368 dirigido a TTR de cyno

<400> 78
ccuccucugc cucgcuggac 20

<210> 79
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005369 dirigido a TTR de cyno

<400> 79
aaaguucuag augccguccg 20

<210> 80
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005370 dirigido a TTR de cyno

<400> 80
acuugucuuc ucuauaccca 20

<210> 81
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005371 dirigido a TTR de cyno

<400> 81
aagugacuuc caguaagauu 20

<210> 82
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNg CR005372 dirigido a TTR de cyno

<400> 82
aaaaggcugc ugaugagacc 20

<210> 83

<400> 83
000

<210> 84

<400> 84
000

<210> 85

<400> 85
000

<210> 86

<400> 86
000

<210> 87
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000480 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 87
aaaggcugcu gaugacaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 88
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000481 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 88
ucuagaacuu ugaccaucag guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 89
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000482 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)

<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 89
uguagaaggg auauacaaag guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 90
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000483 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 90
uccacucauu cuuggcagga guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 91
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000484 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<400> 91
agacaccaaa ucuuacugga guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 92
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000485 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 92
ccuccucugc cuugcuggac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 93
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000486 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada

<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 93
acacaaauac caguccagca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 94
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000487 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 94
uucuuuggca acuuacccag guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 95
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000488 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 95
aaaguucuag augcuguccg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 96
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000489 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)

<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 96
uuugaccauc agaggacacu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 97
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000490 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 97

aaauagacac caaaucuuac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 98
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000491 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<400> 98
auaccagucc agcaaggcag guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 99
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000492 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 99
cuucucuaca cccagggcac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 100
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000493 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada

<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 100
aagugccuuc caguaagauu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 101
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000494 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 101
gugagucugg agagcugcau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 102
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000495 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<400> 102
cagaggacac uuggauucac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 103
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000496 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)

<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 103
ggccgugcau guguucagaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 104
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000497 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>

<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 104
cugcuccucc ucugccuugc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 105
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000498 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 105
agugagucug gagagcugca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 106
<211> 100
<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000499 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<400> 106
ugaauccaag uguccucuga guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 107
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000500 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada

<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 107
ccaguccagc aaggcagagg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 108
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000501 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 108
ucacagaaac acucaccgua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 109
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000567 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<400> 109
gaaaggcugc ugaugacacc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 110
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000568 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 110
ggcugucguc accaauccca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 111
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000570 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>

<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 111
cauugauggc aggacugccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 112
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000571 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 112
gucacagaaa cacucaccgu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 113
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000572 dirigido a TTR humana

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<400> 113
ccccuacucc uauuccacca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 114
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000502 dirigido a TTR de cyno

<220>
<221> base_modificada

<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 114
acacaaauac caguccagcg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 115
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000503 dirigido a TTR de cyno

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 115
aaaaggcugc ugaugagacc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 116
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000504 dirigido a TTR de cyno

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 116
aaaggcugcu gaugagaccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 117
<211> 100

<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000505 dirigido a TTR de cyno

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<400> 117
cauugacagc aggacugccu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 118
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000506 dirigido a TTR de cyno

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>

<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 118
auaccagucc agcgaggcag guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 119
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000507 dirigido a TTR de cyno

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 119
ccaguccagc gaggcagagg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 120
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000508 dirigido a TTR de cyno

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 120
ccuccucugc cucgcuggac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 121
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000509 dirigido a TTR de cyno

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<400> 121
aaaguucuag augccguccg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 122
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000510 dirigido a TTR de cyno

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 122
acuugucuuc ucuauaccca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 123
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000511 dirigido a TTR de cyno

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 123
aagugacuuc caguaagauu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 124
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000282 dirigido a TTR de ratón

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<400> 124
uuacagccac gucuacagca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 125
<211> 80
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 125
guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 126
<211> 22
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 126
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 127

<400> 127
000

<210> 128

<400> 128
000

<210> 129

<400> 129
000

<210> 130

<400> 130
000

<210> 131

<400> 131
000

<210> 132

<400> 132
000

<210> 133

<400> 133

000

<210> 134

<400> 134
000

<210> 135

<400> 135
000

<210> 136

<400> 136
000

<210> 137

<400> 137
000

<210> 138

<400> 138
000

<210> 139

<400> 139
000

<210> 140

<400> 140
000

<210> 141

<400> 141
000

<210> 142

<400> 142
000

<210> 143

<400> 143
000

<210> 144

<400> 144
000

<210> 145

<400> 145
000

<210> 146

<400> 146
000

<210> 147

<400> 147
000

<210> 148

<400> 148
000

<210> 149

<400> 149
000

<210> 150

<400> 150
000

<210> 151

<400> 151
000

<210> 152

<400> 152
000

<210> 153

<400> 153
000

<210> 154

<400> 154
000

<210> 155

<400> 155
000

<210> 156

<400> 156
000

<210> 157

<400> 157
000

<210> 158

<400> 158
000

<210> 159

<400> 159
000

<210> 160

<400> 160
000

<210> 161

<400> 161
000

<210> 162

<400> 162
000

<210> 163

<400> 163
000

<210> 164

<400> 164
000

<210> 165

<400> 165
000

<210> 166

<400> 166
000

<210> 167

<400> 167
000

<210> 168

<400> 168
000

<210> 169

<400> 169
000

<210> 170

<400> 170
000

<210> 171

<400> 171
000

<210> 172

<400> 172
000

<210> 173

<400> 173
000

<210> 174

<400> 174
000

<210> 175

<400> 175
000

<210> 176

<400> 176
000

<210> 177

<400> 177
000

<210> 178

<400> 178
000

<210> 179

<400> 179
000

<210> 180

<400> 180
000

<210> 181

<400> 181

000

<210> 182

<400> 182
000

<210> 183

<400> 183
000

<210> 184

<400> 184
000

<210> 185

<400> 185
000

<210> 186

<400> 186
000

<210> 187

<400> 187
000

<210> 188

<400> 188
000

<210> 189

<400> 189
000

<210> 190

<400> 190
000

<210> 191

<400> 191
000

<210> 192

<400> 192
000

<210> 193

<400> 193
000

<210> 194

<400> 194
000

<210> 195

<400> 195
000

<210> 196

<400> 196
000

<210> 197

<400> 197
000

<210> 198

<400> 198
000

<210> 199

<400> 199
000

<210> 200

<400> 200
000

<210> 201
<211> 4140
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de codificación de ADN de Cas9 que usa análogo de timidina de los codones de mínima uridina enumerados en la Tabla 3, con codones de inicio y de parada

<400> 201
atggacaaga agtacagcat cggactggac atcggaacaa acagcgtcgg atgggcagtc 60

atcacagacg aatacaaggt cccgagcaag aagttcaagg tcctgggaaa cacagacaga 120

cacagcatca agaagaacct gatcggagca ctgctgttcg acagcggaga aacagcagaa 180

gcaacaagac tgaagagaac agcaagaaga agatacacaa gaagaaagaa cagaatctgc 240

tacctgcagg aaatcttcag caacgaaatg gcaaaggtcg acgacagctt cttccacaga 300

ctggaagaaa gcttcctggt cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gatcttcgga 360

aacatcgtcg acgaagtcgc ataccacgaa aagtacccga caatctacca cctgagaaag 420

aagctggtcg acagcacaga caaggcagac ctgagactga tctacctggc actggcacac 480

atgatcaagt tcagaggaca cttcctgatc gaaggagacc tgaacccgga caacagcgac 540

gtcgacaagc tgttcatcca gctggtccag acatacaacc agctgttcga agaaaacccg 600

atcaacgcaa gcggagtcga cgcaaaggca atcctgagcg caagactgag caagagcaga 660

agactggaaa acctgatcgc acagctgccg ggagaaaaga agaacggact gttcggaaac 720

ctgatcgcac tgagcctggg actgacaccg aacttcaaga gcaacttcga cctggcagaa 780

gacgcaaagc tgcagctgag caaggacaca tacgacgacg acctggacaa cctgctggca 840

cagatcggag accagtacgc agacctgttc ctggcagcaa agaacctgag cgacgcaatc 900

ctgctgagcg acatcctgag agtcaacaca gaaatcacaa aggcaccgct gagcgcaagc 960

atgatcaaga gatacgacga acaccaccag gacctgacac tgctgaaggc actggtcaga 1020

cagcagctgc cggaaaagta caaggaaatc ttcttcgacc agagcaagaa cggatacgca 1080

ggatacatcg acggaggagc aagccaggaa gaattctaca agttcatcaa gccgatcctg 1140

gaaaagatgg acggaacaga agaactgctg gtcaagctga acagagaaga cctgctgaga 1200

aagcagagaa cattcgacaa cggaagcatc ccgcaccaga tccacctggg agaactgcac 1260

gcaatcctga gaagacagga agacttctac ccgttcctga aggacaacag agaaaagatc 1320

gaaaagatcc tgacattcag aatcccgtac tacgtcggac cgctggcaag aggaaacagc 1380

agattcgcat ggatgacaag aaagagcgaa gaaacaatca caccgtggaa cttcgaagaa 1440

gtcgtcgaca agggagcaag cgcacagagc ttcatcgaaa gaatgacaaa cttcgacaag 1500

aacctgccga acgaaaaggt cctgccgaag cacagcctgc tgtacgaata cttcacagtc 1560

tacaacgaac tgacaaaggt caagtacgtc acagaaggaa tgagaaagcc ggcattcctg 1620

agcggagaac agaagaaggc aatcgtcgac ctgctgttca agacaaacag aaaggtcaca 1680

gtcaagcagc tgaaggaaga ctacttcaag aagatcgaat gcttcgacag cgtcgaaatc 1740

agcggagtcg aagacagatt caacgcaagc ctgggaacat accacgacct gctgaagatc 1800

atcaaggaca aggacttcct ggacaacgaa gaaaacgaag acatcctgga agacatcgtc 1860

ctgacactga cactgttcga agacagagaa atgatcgaag aaagactgaa gacatacgca 1920

cacctgttcg acgacaaggt catgaagcag ctgaagagaa gaagatacac aggatgggga 1980

agactgagca gaaagctgat caacggaatc agagacaagc agagcggaaa gacaatcctg 2040

gacttcctga agagcgacgg attcgcaaac agaaacttca tgcagctgat ccacgacgac 2100

agcctgacat tcaaggaaga catccagaag gcacaggtca gcggacaggg agacagcctg 2160

cacgaacaca tcgcaaacct ggcaggaagc ccggcaatca agaagggaat cctgcagaca 2220

gtcaaggtcg tcgacgaact ggtcaaggtc atgggaagac acaagccgga aaacatcgtc 2280

atcgaaatgg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga 2340

atgaagagaa tcgaagaagg aatcaaggaa ctgggaagcc agatcctgaa ggaacacccg 2400

gtcgaaaaca cacagctgca gaacgaaaag ctgtacctgt actacctgca gaacggaaga 2460

gacatgtacg tcgaccagga actggacatc aacagactga gcgactacga cgtcgaccac 2520

atcgtcccgc agagcttcct gaaggacgac agcatcgaca acaaggtcct gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaaagag cgacaacgtc ccgagcgaag aagtcgtcaa gaagatgaag 2640

aactactgga gacagctgct gaacgcaaag ctgatcacac agagaaagtt cgacaacctg 2700

acaaaggcag agagaggagg actgagcgaa ctggacaagg caggattcat caagagacag 2760

ctggtcgaaa caagacagat cacaaagcac gtcgcacaga tcctggacag cagaatgaac 2820

acaaagtacg acgaaaacga caagctgatc agagaagtca aggtcatcac actgaagagc 2880

aagctggtca gcgacttcag aaaggacttc cagttctaca aggtcagaga aatcaacaac 2940

taccaccacg cacacgacgc atacctgaac gcagtcgtcg gaacagcact gatcaagaag 3000

tacccgaagc tggaaagcga attcgtctac ggagactaca aggtctacga cgtcagaaag 3060

atgatcgcaa agagcgaaca ggaaatcgga aaggcaacag caaagtactt cttctacagc 3120

aacatcatga acttcttcaa gacagaaatc acactggcaa acggagaaat cagaaagaga 3180

ccgctgatcg aaacaaacgg agaaacagga gaaatcgtct gggacaaggg aagagacttc 3240

gcaacagtca gaaaggtcct gagcatgccg caggtcaaca tcgtcaagaa gacagaagtc 3300

cagacaggag gattcagcaa ggaaagcatc ctgccgaaga gaaacagcga caagctgatc 3360

gcaagaaaga aggactggga cccgaagaag tacggaggat tcgacagccc gacagtcgca 3420

tacagcgtcc tggtcgtcgc aaaggtcgaa aagggaaaga gcaagaagct gaagagcgtc 3480

aaggaactgc tgggaatcac aatcatggaa agaagcagct tcgaaaagaa cccgatcgac 3540

ttcctggaag caaagggata caaggaagtc aagaaggacc tgatcatcaa gctgccgaag 3600

tacagcctgt tcgaactgga aaacggaaga aagagaatgc tggcaagcgc aggagaactg 3660

cagaagggaa acgaactggc actgccgagc aagtacgtca acttcctgta cctggcaagc 3720

cactacgaaa agctgaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagct gttcgtcgaa 3780

cagcacaagc actacctgga cgaaatcatc gaacagatca gcgaattcag caagagagtc 3840

atcctggcag acgcaaacct ggacaaggtc ctgagcgcat acaacaagca cagagacaag 3900

ccgatcagag aacaggcaga aaacatcatc cacctgttca cactgacaaa cctgggagca 3960

ccggcagcat tcaagtactt cgacacaaca atcgacagaa agagatacac aagcacaaag 4020

gaagtcctgg acgcaacact gatccaccag agcatcacag gactgtacga aacaagaatc 4080

gacctgagcc agctgggagg agacggagga ggaagcccga agaagaagag aaaggtctag 4140

<210> 202
<211> 4143
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de codificación de ADN de Cas9 que usa codones con expresión generalmente alta en humanos

<400> 202
atggataaga agtactcaat cgggctggat atcggaacta attccgtggg ttgggcagtg 60

atcacggatg aatacaaagt gccgtccaag aagttcaagg tcctggggaa caccgataga 120

cacagcatca agaaaaatct catcggagcc ctgctgtttg actccggcga aaccgcagaa 180

gcgacccggc tcaaacgtac cgcgaggcga cgctacaccc ggcggaagaa tcgcatctgc 240

tatctgcaag agatcttttc gaacgaaatg gcaaaggtcg acgacagctt cttccaccgc 300

ctggaagaat ctttcctggt ggaggaggac aagaagcatg aacggcatcc tatctttgga 360

aacatcgtcg acgaagtggc gtaccacgaa aagtacccga ccatctacca tctgcggaag 420

aagttggttg actcaactga caaggccgac ctcagattga tctacttggc cctcgcccat 480

atgatcaaat tccgcggaca cttcctgatc gaaggcgatc tgaaccctga taactccgac 540

gtggataagc ttttcattca actggtgcag acctacaacc aactgttcga agaaaaccca 600

atcaatgcta gcggcgtcga tgccaaggcc atcctgtccg cccggctgtc gaagtcgcgg 660

cgcctcgaaa acctgatcgc acagctgccg ggagagaaaa agaacggact tttcggcaac 720

ttgatcgctc tctcactggg actcactccc aatttcaagt ccaattttga cctggccgag 780

gacgcgaagc tgcaactctc aaaggacacc tacgacgacg acttggacaa tttgctggca 840

caaattggcg atcagtacgc ggatctgttc cttgccgcta agaacctttc ggacgcaatc 900

ttgctgtccg atatcctgcg cgtgaacacc gaaataacca aagcgccgct tagcgcctcg 960

atgattaagc ggtacgacga gcatcaccag gatctcacgc tgctcaaagc gctcgtgaga 1020

cagcaactgc ctgaaaagta caaggagatc ttcttcgacc agtccaagaa tgggtacgca 1080

gggtacatcg atggaggcgc tagccaggaa gagttctata agttcatcaa gccaatcctg 1140

gaaaagatgg acggaaccga agaactgctg gtcaagctga acagggagga tctgctccgg 1200

aaacagagaa cctttgacaa cggatccatt ccccaccaga tccatctggg tgagctgcac 1260

gccatcttgc ggcgccagga ggacttttac ccattcctca aggacaaccg ggaaaagatc 1320

gagaaaattc tgacgttccg catcccgtat tacgtgggcc cactggcgcg cggcaattcg 1380

cgcttcgcgt ggatgactag aaaatcagag gaaaccatca ctccttggaa tttcgaggaa 1440

gttgtggata agggagcttc ggcacaaagc ttcatcgaac gaatgaccaa cttcgacaag 1500

aatctcccaa acgagaaggt gcttcctaag cacagcctcc tttacgaata cttcactgtc 1560

tacaacgaac tgactaaagt gaaatacgtt actgaaggaa tgaggaagcc ggcctttctg 1620

tccggagaac agaagaaagc aattgtcgat ctgctgttca agaccaaccg caaggtgacc 1680

gtcaagcagc ttaaagagga ctacttcaag aagatcgagt gtttcgactc agtggaaatc 1740

agcggggtgg aggacagatt caacgcttcg ctgggaacct atcatgatct cctgaagatc 1800

atcaaggaca aggacttcct tgacaacgag gagaacgagg acatcctgga agatatcgtc 1860

ctgaccttga ccctttttcga ggatcgcgag atgatcgagg agaggcttaa gacctacgct 1920

catctcttcg acgataaggt catgaaacaa ctcaagcgcc gccggtacac tggttggggc 1980

cgcctctccc gcaagctgat caacggtatt cgcgataaac agagcggtaa aactatcctg 2040

gatttcctca aatcggatgg cttcgctaat cgtaacttca tgcaattgat ccacgacgac 2100

agcctgacct ttaaggagga catccaaaaa gcacaagtgt ccggacaggg agactcactc 2160

catgaacaca tcgcgaatct ggccggttcg ccggcgatta agaagggaat tctgcaaact 2220

gtgaaggtgg tcgacgagct ggtgaaggtc atgggacggc acaaaccgga gaatatcgtg 2280

attgaaatgg cccgagaaaa ccagactacc cagaagggcc agaaaaactc ccgcgaaagg 2340

atgaagcgga tcgaagaagg aatcaaggag ctgggcagcc agatcctgaa agagcacccg 2400

gtggaaaaca cgcagctgca gaacgagaag ctctacctgt actatttgca aaatggacgg 2460

gacatgtacg tggaccaaga gctggacatc aatcggttgt ctgattacga cgtggaccac 2520

atcgttccac agtcctttct gaaggatgac tcgatcgata acaaggtgtt gactcgcagc 2580

gacaagaaca gagggaagtc agataatgtg ccatcggagg aggtcgtgaa gaagatgaag 2640

aattactggc ggcagctcct gaatgcgaag ctgattaccc agagaaagtt tgacaatctc 2700

actaaagccg agcgcggcgg actctcagag ctggataagg ctggattcat caaacggcag 2760

ctggtcgaga ctcggcagat taccaagcac gtggcgcaga tcttggactc ccgcatgaac 2820

actaaatacg acgagaacga taagctcatc cgggaagtga aggtgattac cctgaaaagc 2880

aaacttgtgt cggactttcg gaaggacttt cagttttaca aagtgagaga aatcaacaac 2940

taccatcacg cgcatgacgc atacctcaac gctgtggtcg gtaccgccct gatcaaaaag 3000

taccctaaac ttgaatcgga gtttgtgtac ggagactaca aggtctacga cgtgaggaag 3060

atgatagcca agtccgaaca ggaaatcggg aaagcaactg cgaaatactt cttttactca 3120

aacatcatga acttttttcaa gactgaaatt acgctggcca atggagaaat caggaagagg 3180

ccactgatcg aaactaacgg agaaacgggc gaaatcgtgt gggacaaggg cagggacttc 3240

gcaactgttc gcaaagtgct ctctatgccg caagtcaata ttgtgaagaa aaccgaagtg 3300

caaaccggcg gattttcaaa ggaatcgatc ctcccaaaga gaaatagcga caagctcatt 3360

gcacgcaaga aagactggga cccgaagaag tacggaggat tcgattcgcc gactgtcgca 3420

tactccgtcc tcgtggtggc caaggtggag aagggaaaga gcaaaaagct caaatccgtc 3480

aaagagctgc tggggattac catcatggaa cgatcctcgt tcgagaagaa cccgattgat 3540

ttcctcgagg cgaagggtta caaggaggtg aagaaggatc tgatcatcaa actccccaag 3600

tactcactgt tcgaactgga aaatggtcgg aagcgcatgc tggcttcggc cggagaactc 3660

caaaaaggaa atgagctggc cttgcctagc aagtacgtca acttcctcta tcttgcttcg 3720

cactacgaaa aactcaaagg gtcaccggaa gataacgaac agaagcagct tttcgtggag 3780

cagcacaagc attatctgga tgaaatcatc gaacaaatct ccgagttttc aaagcgcgtg 3840

atcctcgccg acgccaacct cgacaaagtc ctgtcggcct acaataagca tagagataag 3900

ccgatcagag aacaggccga gaacattatc cacttgttca ccctgactaa cctgggagcc 3960

ccagccgcct tcaagtactt cgatactact atcgatcgca aaagatacac gtccaccaag 4020

gaagttctgg acgcgaccct gatccaccaa agcatcactg gactctacga aactaggatc 4080

gatctgtcgc agctgggtgg cgatggcggt ggatctccga aaaagaagag aaaggtgtaa 4140

tga 4143

<210> 203
<211> 1379
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de aminoácidos de Cas9 con una señal de localización nuclear (1xNLS) como los 7 aminoácidos C-terminales

<400> 203

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val
1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
210 215 220

Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
225 230 235 240

Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
245 250 255

Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
260 265 270

Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
275 280 285

Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
325 330 335

Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
340 345 350

Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
355 360 365

Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
370 375 380

Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
405 410 415

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
675 680 685

Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
690 695 700

Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
705 710 715 720

His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
1160 1165 1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
1175 1180 1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly
1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val
1220 1225 1230

Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys
1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys
1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala
1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn
1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala
1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser
1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr
1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
1355 1360 1365

Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1370 1375

<210> 204
<211> 4140
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF del ARNm de Cas9 que usa codones de mínima uridina, con codones

de inicio y parada

<400> 204

auggacaaga aguacagcau cggacuggac aucggaacaa acagcgucgg augggcaguc 60

aucacagacg aauacaaggu cccgagcaag aaguucaagg uccugggaaa cacagacaga 120

cacagcauca agaagaaccu gaucggagca cugcuguucg acagcggaga aacagcagaa 180

gcaacaagac ugaagagaac agcaagaaga agauacacaa gaagaaagaa cagaaucugc 240

uaccugcagg aaaucuucag caacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccacaga 300

cuggaagaaa gcuuccuggu cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gaucuucgga 360

aacaucgucg acgaagucgc auaccacgaa aaguacccga caaucuacca ccugagaaag 420

aagcuggucg acagcacaga caaggcagac cugagacuga ucuaccuggc acuggcacac 480

augaucaagu ucagaggaca cuuccugauc gaaggagacc ugaacccgga caacagcgac 540

gucgacaagc uguucaucca gcugguccag acauacaacc agcuguucga agaaaacccg 600

aucaacgcaa gcggagucga cgcaaaggca auccugagcg caagacugag caagagcaga 660

agacuggaaa accugaucgc acagcugccg ggagaaaaga agaacggacu guucggaaac 720

cugaucgcac ugagccuggg acugacaccg aacuucaaga gcaacuucga ccuggcagaa 780

gacgcaaagc ugcagcugag caaggacaca uacgacgacg accuggacaa ccugcuggca 840

cagaucggag accaguacgc agaccuguuc cuggcagcaa agaaccugag cgacgcaauc 900

cugcugagcg acauccugag agucaacaca gaaaucacaa aggcaccgcu gagcgcaagc 960

augaucaaga gauacgacga acaccaccag gaccugacac ugcugaaggc acuggucaga 1020

cagcagcugc cggaaaagua caaggaaauc uucuucgacc agagcaagaa cggauacgca 1080

ggauacaucg acggaggagc aagccaggaa gaauucuaca aguucaucaa gccgauccug 1140

gaaaagaugg acggaacaga agaacugcug gucaagcuga acagagaaga ccugcugaga 1200

aagcagagaa cauucgacaa cggaagcauc ccgcaccaga uccaccuggg agaacugcac 1260

gcaauccuga gaagacagga agacuucuac ccguuccuga aggacaacag agaaaagauc 1320

gaaaagaucc ugacauucag aaucccguac uacgucggac cgcuggcaag aggaaacagc 1380

agauucgcau ggaugacaag aaagagcgaa gaaacaauca caccguggaa cuucgaagaa 1440

gucgucgaca agggagcaag cgcacagagc uucaucgaaa gaaugacaaa cuucgacaag 1500

aaccugccga acgaaaaggu ccugccgaag cacagccugc uguacgaaua cuucacaguc 1560

uacaacgaac ugacaaaggu caaguacguc acagaaggaa ugagaaagcc ggcauuccug 1620

agcggagaac agaagaaggc aaucgucgac cugcuguuca agacaaacag aaaggucaca 1680

gucaagcagc ugaaggaaga cuacuucaag aagaucgaau gcuucgacag cgucgaaauc 1740

agcggagucg aagacagauu caacgcaagc cugggaacau accacgaccu gcugaagauc 1800

aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgaa gaaaacgaag acauccugga agacaucguc 1860

cugacacuga cacuguucga agacagagaa augaucgaag aaagacugaa gacauacgca 1920

caccuguucg acgacaaggu caugaagcag cugaagagaa gaagauacac aggaugggga 1980

agacugagca gaaagcugau caacggaauc agagacaagc agagcggaaa gacaauccug 2040

gacuuccuga agagcgacgg auucgcaaac agaaacuuca ugcagcugau ccacgacgac 2100

agccugacau ucaaggaaga cauccagaag gcacagguca gcggacaggg agacagccug 2160

cacgaacaca ucgcaaaccu ggcaggaagc ccggcaauca agaagggaau ccugcagaca 2220

gucaaggucg ucgacgaacu ggucaagguc augggaagac acaagccgga aaacaucguc 2280

aucgaaaugg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga 2340

augaagagaa ucgaagaagg aaucaaggaa cugggaagcc agauccugaa ggaacacccg 2400

gucgaaaaca cacagcugca gaacgaaaag cuguaccugu acuaccugca gaacggaaga 2460

gacauguacg ucgaccagga acuggacauc aacagacuga gcgacuacga cgucgaccac 2520

aucgucccgc agagcuuccu gaaggacgac agcaucgaca acaagguccu gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaaagag cgacaacguc ccgagcgaag aagucgucaa gaagaugaag 2640

aacuacugga gacagcugcu gaacgcaaag cugaucacac agagaaaguu cgacaaccug 2700

acaaaggcag agagaggagg acugagcgaa cuggacaagg caggauucau caagagacag 2760

cuggucgaaa caagacagau cacaaagcac gucgcacaga uccuggacag cagaaugaac 2820

acaaaguacg acgaaaacga caagcugauc agagaaguca aggucaucac acugaagagc 2880

aagcugguca gcgacuucag aaaggacuuc caguucuaca aggucagaga aaucaacaac 2940

uaccaccacg cacacgacgc auaccugaac gcagucgucg gaacagcacu gaucaagaag 3000

uacccgaagc uggaaagcga auucgucuac ggagacuaca aggucuacga cgucagaaag 3060

augaucgcaa agagcgaaca ggaaaucgga aaggcaacag caaaguacuu cuucuacagc 3120

aacaucauga acuucuucaa gacagaaauc acacuggcaa acggagaaau cagaaagaga 3180

ccgcugaucg aaacaaacgg agaaacagga gaaaucgucu gggacaaggg aagagacuuc 3240

gcaacaguca gaaagguccu gagcaugccg caggucaaca ucgucaagaa gacagaaguc 3300

cagacaggag gauucagcaa ggaaagcauc cugccgaaga gaaacagcga caagcugauc 3360

gcaagaaaga aggacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgacagccc gacagucgca 3420

uacagcgucc uggucgucgc aaaggucgaa aagggaaaga gcaagaagcu gaagagcguc 3480

aaggaacugc ugggaaucac aaucauggaa agaagcagcu ucgaaaagaa cccgaucgac 3540

uuccuggaag caaagggaua caaggaaguc aagaaggacc ugaucaucaa gcugccgaag 3600

uacagccugu ucgaacugga aaacggaaga aagagaaugc uggcaagcgc aggagaacug 3660

cagaagggaa acgaacuggc acugccgagc aaguacguca acuuccugua ccuggcaagc 3720

cacuacgaaa agcugaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagcu guucgucgaa 3780

cagcacaagc acuaccugga cgaaaucauc gaacagauca gcgaauucag caagagaguc 3840

auccuggcag acgcaaaccu ggacaagguc cugagcgcau acaacaagca cagagacaag 3900

ccgaucagag aacaggcaga aaacaucauc caccuguuca cacugacaaa ccugggagca 3960

ccggcagcau ucaaguacuu cgacacaaca aucgacagaa agagauacac aagcacaaag 4020

gaaguccugg acgcaacacu gauccaccag agcaucacag gacuguacga aacaagaauc 4080

gaccugagcc agcugggagg agacggagga ggaagcccga agaagaagag aaaggucuag 4140

<210> 205
<211> 4143

<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF del ARNm de Cas9 que usa codones con expresión generalmente alta en humanos, con codones de inicio y parada

<400> 205
auggauaaga aguacucaau cgggcuggau aucggaacua auuccguggg uugggcagug 60

aucacggaug aauacaaagu gccguccaag aaguucaagg uccuggggaa caccgauaga 120

cacagcauca agaaaaaucu caucggagcc cugcuguuug acuccggcga aaccgcagaa 180

gcgacccggc ucaaacguac cgcgaggcga cgcuacaccc ggcggaagaa ucgcaucugc 240

uaucugcaag agaucuuuuc gaacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccaccgc 300

cuggaagaau cuuuccuggu ggaggaggac aagaagcaug aacggcaucc uaucuuugga 360

aacaucgucg acgaaguggc guaccacgaa aaguacccga ccaucuacca ucugcggaag 420

aaguugguug acucaacuga caaggccgac cucagauuga ucuacuuggc ccucgcccau 480

augaucaaau uccgcggaca cuuccugauc gaaggcgauc ugaacccuga uaacuccgac 540

guggauaagc uuuucauuca acuggugcag accuacaacc aacuguucga agaaaaccca 600

aucaaugcua gcggcgucga ugccaaggcc auccuguccg cccggcuguc gaagucgcgg 660

cgccucgaaa accugaucgc acagcugccg ggagagaaaa agaacggacu uuucggcaac 720

uugaucgcuc ucucacuggg acucacuccc aauuucaagu ccaauuuuga ccuggccgag 780

gacgcgaagc ugcaacucuc aaaggacacc uacgacgacg acuuggacaa uuugcuggca 840

caaauuggcg aucaguacgc ggaucuguuc cuugccgcua agaaccuuuc ggacgcaauc 900

uugcuguccg auauccugcg cgugaacacc gaaauaacca aagcgccgcu uagcgccucg 960

augauuaagc gguacgacga gcaucaccag gaucucacgc ugcucaaagc gcucgugaga 1020

cagcaacugc cugaaaagua caaggagauc uucuucgacc aguccaagaa uggguacgca 1080

ggguacaucg auggaggcgc uagccaggaa gaguucuaua aguucaucaa gccaauccug 1140

gaaaagaugg acggaaccga agaacugcug gucaagcuga acagggagga ucugcuccgg 1200

aaacagagaa ccuuugacaa cggauccauu ccccaccaga uccaucuggg ugagcugcac 1260

gccaucuugc ggcgccagga ggacuuuuac ccauuccuca aggacaaccg ggaaaagauc 1320

gagaaaauuc ugacguuccg caucccguau uacgugggcc cacuggcgcg cggcaauucg 1380

cgcuucgcgu ggaugacuag aaaaucagag gaaaccauca cuccuuggaa uuucgaggaa 1440

guuguggaua agggagcuuc ggcacaaagc uucaucgaac gaaugaccaa cuucgacaag 1500

aaucucccaa acgagaaggu gcuuccuaag cacagccucc uuuacgaaua cuucacuguc 1560

uacaacgaac ugacuaaagu gaaauacguu acugaaggaa ugaggaagcc ggccuuucug 1620

uccggagaac agaagaaagc aauugucgau cugcuguuca agaccaaccg caaggugacc 1680

gucaagcagc uuaaagagga cuacuucaag aagaucgagu guuucgacuc aguggaaauc 1740

agcggggugg aggacagauu caacgcuucg cugggaaccu aucaugaucu ccugaagauc 1800

aucaaggaca aggacuuccu ugacaacgag gagaacgagg acauccugga agauaucguc 1860

cugaccuuga cccuuuucga ggaucgcgag augaucgagg agaggcuuaa gaccuacgcu 1920

caucucuucg acgauaaggu caugaaacaa cucaagcgcc gccgguacac ugguuggggc 1980

cgccucuccc gcaagcugau caacgguauu cgcgauaaac agagcgguaa aacuauccug 2040

gauuuccuca aaucggaugg cuucgcuaau cguaacuuca ugcaauugau ccacgacgac 2100

agccugaccu uuaaggagga cauccaaaaa gcacaagugu ccggacaggg agacucacuc 2160

caugaacaca ucgcgaaucu ggccgguucg ccggcgauua agaagggaau ucugcaaacu 2220

gugaaggugg ucgacgagcu ggugaagguc augggacggc acaaaccgga gaauaucgug 2280

auugaaaugg cccgagaaaa ccagacuacc cagaagggcc agaaaaacuc ccgcgaaagg 2340

augaagcgga ucgaagaagg aaucaaggag cugggcagcc agauccugaa agagcacccg 2400

guggaaaaca cgcagcugca gaacgagaag cucuaccugu acuauuugca aaauggacgg 2460

gacauguacg uggaccaaga gcuggacauc aaucgguugu cugauuacga cguggaccac 2520

aucguuccac aguccuuucu gaaggaugac ucgaucgaua acaagguguu gacucgcagc 2580

gacaagaaca gagggaaguc agauaaugug ccaucggagg aggucgugaa gaagaugaag 2640

aauuacuggc ggcagcuccu gaaugcgaag cugauuaccc agagaaaguu ugacaaucuc 2700

acuaaagccg agcgcggcgg acucucagag cuggauaagg cuggauucau caaacggcag 2760

cuggucgaga cucggcagau uaccaagcac guggcgcaga ucuuggacuc ccgcaugaac 2820

acuaaauacg acgagaacga uaagcucauc cgggaaguga aggugauuac ccugaaaagc 2880

aaacuugugu cggacuuucg gaaggacuuu caguuuuaca aagugagaga aaucaacaac 2940

uaccaucacg cgcaugacgc auaccucaac gcuguggucg guaccgcccu gaucaaaaag 3000

uacccuaaac uugaaucgga guuuguguac ggagacuaca aggucuacga cgugaggaag 3060

augauagcca aguccgaaca ggaaaucggg aaagcaacug cgaaauacuu cuuuuacuca 3120

aacaucauga acuuuuucaa gacugaaauu acgcuggcca auggagaaau caggaagagg 3180

ccacugaucg aaacuaacgg agaaacgggc gaaaucgugu gggacaaggg cagggacuuc 3240

gcaacuguuc gcaaagugcu cucuaugccg caagucaaua uugugaagaa aaccgaagug 3300

caaaccggcg gauuuucaaa ggaaucgauc cucccaaaga gaaauagcga caagcucauu 3360

gcacgcaaga aagacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgauucgcc gacugucgca 3420

uacuccgucc ucgugguggc caagguggag aagggaaaga gcaaaaagcu caaauccguc 3480

aaagagcugc uggggauuac caucauggaa cgauccucgu ucgagaagaa cccgauugau 3540

uuccucgagg cgaaggguua caaggaggug aagaaggauc ugaucaucaa acucccccaag 3600

uacucacugu ucgaacugga aaauggucgg aagcgcaugc uggcuucggc cggagaacuc 3660

caaaaaggaa augagcuggc cuugccuagc aaguacguca acuuccucua ucuugcuucg 3720

cacuacgaaa aacucaaagg gucaccggaa gauaacgaac agaagcagcu uuucguggag 3780

cagcacaagc auuaucugga ugaaaucauc gaacaaaucu ccgaguuuuc aaagcgcgug 3840

auccucgccg acgccaaccu cgacaaaguc cugucggccu acaauaagca uagagauaag 3900

ccgaucagag aacaggccga gaacauuauc cacuuguuca cccugacuaa ccugggagcc 3960

ccagccgccu ucaaguacuu cgauacuacu aucgaucgca aaagauacac guccaccaag 4020

gaaguucugg acgcgacccu gauccaccaa agcaucacug gacucuacga aacuaggauc 4080

gaucugucgc agcugggugg cgauggcggu ggaucuccga aaaagaagag aaagguguaa 4140

uga 4143

<210> 206
<211> 1379
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de aminoácidos de la nickasa Cas9 (D10A)

<400> 206

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Ala Ile Gly Thr Asn Ser Val
1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp

130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
210 215 220

Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
225 230 235 240

Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
245 250 255

Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
260 265 270

Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
275 280 285

Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys

325 330 335

Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
340 345 350

Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
355 360 365

Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
370 375 380

Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
405 410 415

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys

515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
675 680 685

Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
690 695 700

Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu

705 710 715 720

His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp

900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr

1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
1160 1165 1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
1175 1180 1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly
1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val
1220 1225 1230

Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys
1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys

1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala
1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn
1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala
1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser
1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr
1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
1355 1360 1365

Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1370 1375

<210> 207
<211> 4140
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF del ARNm de la nickasa Cas9 (D10A)

<400> 207
auggacaaga aguacagcau cggacuggca aucggaacaa acagcgucgg augggcaguc 60

aucacagacg aauacaaggu cccgagcaag aaguucaagg uccugggaaa cacagacaga 120

cacagcauca agaagaaccu gaucggagca cugcuguucg acagcggaga aacagcagaa 180

gcaacaagac ugaagagaac agcaagaaga agauacacaa gaagaaagaa cagaaucugc 240

uaccugcagg aaaucuucag caacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccacaga 300

cuggaagaaa gcuuccuggu cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gaucuucgga 360

aacaucgucg acgaagucgc auaccacgaa aaguacccga caaucuacca ccugagaaag 420

aagcuggucg acagcacaga caaggcagac cugagacuga ucuaccuggc acuggcacac 480

augaucaagu ucagaggaca cuuccugauc gaaggagacc ugaacccgga caacagcgac 540

gucgacaagc uguucaucca gcugguccag acauacaacc agcuguucga agaaaacccg 600

aucaacgcaa gcggagucga cgcaaaggca auccugagcg caagacugag caagagcaga 660

agacuggaaa accugaucgc acagcugccg ggagaaaaga agaacggacu guucggaaac 720

cugaucgcac ugagccuggg acugacaccg aacuucaaga gcaacuucga ccuggcagaa 780

gacgcaaagc ugcagcugag caaggacaca uacgacgacg accuggacaa ccugcuggca 840

cagaucggag accaguacgc agaccuguuc cuggcagcaa agaaccugag cgacgcaauc 900

cugcugagcg acauccugag agucaacaca gaaaucacaa aggcaccgcu gagcgcaagc 960

augaucaaga gauacgacga acaccaccag gaccugacac ugcugaaggc acuggucaga 1020

cagcagcugc cggaaaagua caaggaaauc uucuucgacc agagcaagaa cggauacgca 1080

ggauacaucg acggaggagc aagccaggaa gaauucuaca aguucaucaa gccgauccug 1140

gaaaagaugg acggaacaga agaacugcug gucaagcuga acagagaaga ccugcugaga 1200

aagcagagaa cauucgacaa cggaagcauc ccgcaccaga uccaccuggg agaacugcac 1260

gcaauccuga gaagacagga agacuucuac ccguuccuga aggacaacag agaaaagauc 1320

gaaaagaucc ugacauucag aaucccguac uacgucggac cgcuggcaag aggaaacagc 1380

agauucgcau ggaugacaag aaagagcgaa gaaacaauca caccguggaa cuucgaagaa 1440

gucgucgaca agggagcaag cgcacagagc uucaucgaaa gaaugacaaa cuucgacaag 1500

aaccugccga acgaaaaggu ccugccgaag cacagccugc uguacgaaua cuucacaguc 1560

uacaacgaac ugacaaaggu caaguacguc acagaaggaa ugagaaagcc ggcauuccug 1620

agcggagaac agaagaaggc aaucgucgac cugcuguuca agacaaacag aaaggucaca 1680

gucaagcagc ugaaggaaga cuacuucaag aagaucgaau gcuucgacag cgucgaaauc 1740

agcggagucg aagacagauu caacgcaagc cugggaacau accacgaccu gcugaagauc 1800

aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgaa gaaaacgaag acauccugga agacaucguc 1860

cugacacuga cacuguucga agacagagaa augaucgaag aaagacugaa gacauacgca 1920

caccuguucg acgacaaggu caugaagcag cugaagagaa gaagauacac aggaugggga 1980

agacugagca gaaagcugau caacggaauc agagacaagc agagcggaaa gacaauccug 2040

gacuuccuga agagcgacgg auucgcaaac agaaacuuca ugcagcugau ccacgacgac 2100

agccugacau ucaaggaaga cauccagaag gcacagguca gcggacaggg agacagccug 2160

cacgaacaca ucgcaaaccu ggcaggaagc ccggcaauca agaagggaau ccugcagaca 2220

gucaaggucg ucgacgaacu ggucaagguc augggaagac acaagccgga aaacaucguc 2280

aucgaaaugg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga 2340

augaagagaa ucgaagaagg aaucaaggaa cugggaagcc agauccugaa ggaacacccg 2400

gucgaaaaca cacagcugca gaacgaaaag cuguaccugu acuaccugca gaacggaaga 2460

gacauguacg ucgaccagga acuggacauc aacagacuga gcgacuacga cgucgaccac 2520

aucgucccgc agagcuuccu gaaggacgac agcaucgaca acaagguccu gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaaagag cgacaacguc ccgagcgaag aagucgucaa gaagaugaag 2640

aacuacugga gacagcugcu gaacgcaaag cugaucacac agagaaaguu cgacaaccug 2700

acaaaggcag agagaggagg acugagcgaa cuggacaagg caggauucau caagagacag 2760

cuggucgaaa caagacagau cacaaagcac gucgcacaga uccuggacag cagaaugaac 2820

acaaaguacg acgaaaacga caagcugauc agagaaguca aggucaucac acugaagagc 2880

aagcugguca gcgacuucag aaaggacuuc caguucuaca aggucagaga aaucaacaac 2940

uaccaccacg cacacgacgc auaccugaac gcagucgucg gaacagcacu gaucaagaag 3000

uacccgaagc uggaaagcga auucgucuac ggagacuaca aggucuacga cgucagaaag 3060

augaucgcaa agagcgaaca ggaaaucgga aaggcaacag caaaguacuu cuucuacagc 3120

aacaucauga acuucuucaa gacagaaauc acacuggcaa acggagaaau cagaaagaga 3180

ccgcugaucg aaacaaacgg agaaacagga gaaaucgucu gggacaaggg aagagacuuc 3240

gcaacaguca gaaagguccu gagcaugccg caggucaaca ucgucaagaa gacagaaguc 3300

cagacaggag gauucagcaa ggaaagcauc cugccgaaga gaaacagcga caagcugauc 3360

gcaagaaaga aggacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgacagccc gacagucgca 3420

uacagcgucc uggucgucgc aaaggucgaa aagggaaaga gcaagaagcu gaagagcguc 3480

aaggaacugc ugggaaucac aaucauggaa agaagcagcu ucgaaaagaa cccgaucgac 3540

uuccuggaag caaagggaua caaggaaguc aagaaggacc ugaucaucaa gcugccgaag 3600

uacagccugu ucgaacugga aaacggaaga aagagaaugc uggcaagcgc aggagaacug 3660

cagaagggaa acgaacuggc acugccgagc aaguacguca acuuccugua ccuggcaagc 3720

cacuacgaaa agcugaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagcu guucgucgaa 3780

cagcacaagc acuaccugga cgaaaucauc gaacagauca gcgaauucag caagagaguc 3840

auccuggcag acgcaaaccu ggacaaggUc cugagcgcau acaacaagca cagagacaag 3900

ccgaucagag aacaggcaga aaacaucauc caccuguuca cacugacaaa ccugggagca 3960

ccggcagcau ucaaguacuu cgacacaaca aucgacagaa agagauacac aagcacaaag 4020

gaaguccugg acgcaacacu gauccaccag agcaucacag gacuguacga aacaagaauc 4080

gaccugagcc agcugggagg agacggagga ggaagcccga agaagaagag aaaggucuag 4140

<210> 208
<211> 1379
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de aminoácidos de dCas9 (D10A H840A)

<400> 208

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Ala Ile Gly Thr Asn Ser Val
1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
210 215 220

Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
225 230 235 240

Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
245 250 255

Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
260 265 270

Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
275 280 285

Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
325 330 335

Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
340 345 350

Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
355 360 365

Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
370 375 380

Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
405 410 415

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
675 680 685

Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
690 695 700

Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
705 710 715 720

His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp Ala Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
1160 1165 1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
1175 1180 1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly
1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val
1220 1225 1230

Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys
1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys
1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala
1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn
1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala
1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser
1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr
1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
1355 1360 1365

Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1370 1375

<210> 209
<211> 4140
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF del ARNm de dCas9 (D10A H840A)

<400> 209
auggacaaga aguacagcau cggacuggca aucggaacaa acagcgucgg augggcaguc 60

aucacagacg aauacaaggu cccgagcaag aaguucaagg uccugggaaa cacagacaga 120

cacagcauca agaagaaccu gaucggagca cugcuguucg acagcggaga aacagcagaa 180

gcaacaagac ugaagagaac agcaagaaga agauacacaa gaagaaagaa cagaaucugc 240

uaccugcagg aaaucuucag caacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccacaga 300

cuggaagaaa gcuuccuggu cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gaucuucgga 360

aacaucgucg acgaagucgc auaccacgaa aaguacccga caaucuacca ccugagaaag 420

aagcuggucg acagcacaga caaggcagac cugagacuga ucuaccuggc acuggcacac 480

augaucaagu ucagaggaca cuuccugauc gaaggagacc ugaacccgga caacagcgac 540

gucgacaagc uguucaucca gcugguccag acauacaacc agcuguucga agaaaacccg 600

aucaacgcaa gcggagucga cgcaaaggca auccugagcg caagacugag caagagcaga 660

agacuggaaa accugaucgc acagcugccg ggagaaaaga agaacggacu guucggaaac 720

cugaucgcac ugagccuggg acugacaccg aacuucaaga gcaacuucga ccuggcagaa 780

gacgcaaagc ugcagcugag caaggacaca uacgacgacg accuggacaa ccugcuggca 840

cagaucggag accaguacgc agaccuguuc cuggcagcaa agaaccugag cgacgcaauc 900

cugcugagcg acauccugag agucaacaca gaaaucacaa aggcaccgcu gagcgcaagc 960

augaucaaga gauacgacga acaccaccag gaccugacac ugcugaaggc acuggucaga 1020

cagcagcugc cggaaaagua caaggaaauc uucuucgacc agagcaagaa cggauacgca 1080

ggauacaucg acggaggagc aagccaggaa gaauucuaca aguucaucaa gccgauccug 1140

gaaaagaugg acggaacaga agaacugcug gucaagcuga acagagaaga ccugcugaga 1200

aagcagagaa cauucgacaa cggaagcauc ccgcaccaga uccaccuggg agaacugcac 1260

gcaauccuga gaagacagga agacuucuac ccguuccuga aggacaacag agaaaagauc 1320

gaaaagaucc ugacauucag aaucccguac uacgucggac cgcuggcaag aggaaacagc 1380

agauucgcau ggaugacaag aaagagcgaa gaaacaauca caccguggaa cuucgaagaa 1440

gucgucgaca agggagcaag cgcacagagc uucaucgaaa gaaugacaaa cuucgacaag 1500

aaccugccga acgaaaaggu ccugccgaag cacagccugc uguacgaaua cuucacaguc 1560

uacaacgaac ugacaaaggu caaguacguc acagaaggaa ugagaaagcc ggcauuccug 1620

agcggagaac agaagaaggc aaucgucgac cugcuguuca agacaaacag aaaggucaca 1680

gucaagcagc ugaaggaaga cuacuucaag aagaucgaau gcuucgacag cgucgaaauc 1740

agcggagucg aagacagauu caacgcaagc cugggaacau accacgaccu gcugaagauc 1800

aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgaa gaaaacgaag acauccugga agacaucguc 1860

cugacacuga cacuguucga agacagagaa augaucgaag aaagacugaa gacauacgca 1920

caccuguucg acgacaaggu caugaagcag cugaagagaa gaagauacac aggaugggga 1980

agacugagca gaaagcugau caacggaauc agagacaagc agagcggaaa gacaauccug 2040

gacuuccuga agagcgacgg auucgcaaac agaaacuuca ugcagcugau ccacgacgac 2100

agccugacau ucaaggaaga cauccagaag gcacagguca gcggacaggg agacagccug 2160

cacgaacaca ucgcaaaccu ggcaggaagc ccggcaauca agaagggaau ccugcagaca 2220

gucaaggucg ucgacgaacu ggucaagguc augggaagac acaagccgga aaacaucguc 2280

aucgaaaugg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga 2340

augaagagaa ucgaagaagg aaucaaggaa cugggaagcc agauccugaa ggaacacccg 2400

gucgaaaaca cacagcugca gaacgaaaag cuguaccugu acuaccugca gaacggaaga 2460

gacauguacg ucgaccagga acuggacauc aacagacuga gcgacuacga cgucgacgca 2520

aucgucccgc agagcuuccu gaaggacgac agcaucgaca acaagguccu gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaaagag cgacaacguc ccgagcgaag aagucgucaa gaagaugaag 2640

aacuacugga gacagcugcu gaacgcaaag cugaucacac agagaaaguu cgacaaccug 2700

acaaaggcag agagaggagg acugagcgaa cuggacaagg caggauucau caagagacag 2760

cuggucgaaa caagacagau cacaaagcac gucgcacaga uccuggacag cagaaugaac 2820

acaaaguacg acgaaaacga caagcugauc agagaaguca aggucaucac acugaagagc 2880

aagcugguca gcgacuucag aaaggacuuc caguucuaca aggucagaga aaucaacaac 2940

uaccaccacg cacacgacgc auaccugaac gcagucgucg gaacagcacu gaucaagaag 3000

uacccgaagc uggaaagcga auucgucuac ggagacuaca aggucuacga cgucagaaag 3060

augaucgcaa agagcgaaca ggaaaucgga aaggcaacag caaaguacuu cuucuacagc 3120

aacaucauga acuucuucaa gacagaaauc acacuggcaa acggagaaau cagaaagaga 3180

ccgcugaucg aaacaaacgg agaaacagga gaaaucgucu gggacaaggg aagagacuuc 3240

gcaacaguca gaaagguccu gagcaugccg caggucaaca ucgucaagaa gacagaaguc 3300

cagacaggag gauucagcaa ggaaagcauc cugccgaaga gaaacagcga caagcugauc 3360

gcaagaaaga aggacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgacagccc gacagucgca 3420

uacagcgucc uggucgucgc aaaggucgaa aagggaaaga gcaagaagcu gaagagcguc 3480

aaggaacugc ugggaaucac aaucauggaa agaagcagcu ucgaaaagaa cccgaucgac 3540

uuccuggaag caaagggaua caaggaaguc aagaaggacc ugaucaucaa gcugccgaag 3600

uacagccugu ucgaacugga aaacggaaga aagagaaugc uggcaagcgc aggagaacug 3660

cagaagggaa acgaacuggc acugccgagc aaguacguca acuuccugua ccuggcaagc 3720

cacuacgaaa agcugaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagcu guucgucgaa 3780

cagcacaagc acuaccugga cgaaaucauc gaacagauca gcgaauucag caagagaguc 3840

auccuggcag acgcaaaccu ggacaagguc cugagcgcau acaacaagca cagagacaag 3900

ccgaucagag aacaggcaga aaacaucauc caccuguuca cacugacaaa ccugggagca 3960

ccggcagcau ucaaguacuu cgacacaaca aucgacagaa agagauacac aagcacaaag 4020

gaaguccugg acgcaacacu gauccaccag agcaucacag gacuguacga aacaagaauc 4080

gaccugagcc agcugggagg agacggagga ggaagcccga agaagaagag aaaggucuag 4140

<210> 210
<211> 4134
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de codificación de ARNm de Cas9 que usa codones de mínina uridina (sin codones de inicio y parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)

<400> 210
gacaagaagu acagcaucgg acuggacauc ggaacaaaca gcgucggaug ggcagucauc 60

acagacgaau acaaggcccc gagcaagaag uucaaggucc ugggaaacac agacagacac 120

agcaucaaga agaaccugau cggagcacug cuguucgaca gcggagaaac agcagaagca 180

acaagacuga agagaacagc aagaagaaga uacacaagaa gaaagaacag aaucugcuac 240

cugcaggaaa ucuucagcaa cgaaauggca aaggucgacg acagcuucuu ccacagacug 300

gaagaaagcu uccuggucga agaagacaag aagcacgaaa gacacccgau cuucggaaac 360

aucgucgacg aagucgcaua ccacgaaaag uacccgacaa ucuaccaccu gagaaagaag 420

cuggucgaca gcacagacaa ggcagaccug agacugaucu accuggcacu ggcacacaug 480

aucaaguuca gaggacacuu ccugaucgaa ggagaccuga acccggacaa cagcgacguc 540

gacaagcugu ucauccagcu gguccagaca uacaaccagc uguucgaaga aaacccgauc 600

aacgcaagcg gagucgacgc aaaggcaauc cugagcgcaa gacugagcaa gagcagaaga 660

cuggaaaacc ugaucgcaca gcugccggga gaaaagaaga acggacuguu cggaaaccug 720

aucgcacuga gccugggacu gacaccgaac uucaagagca acuucgaccu ggcagaagac 780

gcaaagcugc agcugagcaa ggacacauac gacgacgacc uggacaaccu gcuggcacag 840

aucggagacc aguacgcaga ccuguuccug gcagcaaaga accugagcga cgcaauccug 900

cugagcgaca uccugagagu caacacagaa aucacaaagg caccgcugag cgcaagcaug 960

aucaagagau acgacgaaca ccaccaggac cugacacugc ugaaggcacu ggucagacag 1020

cagcugccgg aaaaguacaa ggaaaucuuc uucgaccaga gcaagaacgg auacgcagga 1080

uacaucgacg gaggagcaag ccaggaagaa uucuacaagu ucaucaagcc gauccuggaa 1140

aagauggacg gaacagaaga acugcugguc aagcugaaca gagaagaccu gcugagaaag 1200

cagagaacau ucgacaacgg aagcaucccg caccagaucc accugggaga acugcacgca 1260

auccugagaa gacaggaaga cuucuacccg uuccugaagg acaacagaga aaagaucgaa 1320

aagauccuga cauucagaau cccguacuac gucggaccgc uggcaagagg aaacagcaga 1380

uucgcaugga ugacaagaaa gagcgaagaa acaaucacac cguggaacuu cgaagaaguc 1440

gucgacaagg gagcaagcgc acagagcuuc aucgaaagaa ugacaaacuu cgacaagaac 1500

cugccgaacg aaaagguccu gccgaagcac agccugcugu acgaauacuu cacagucuac 1560

aacgaacuga caaaggucaa guacgucaca gaaggaauga gaaagccggc auuccugagc 1620

ggagaacaga agaaggcaau cgucgaccug cuguucaaga caaacagaaa ggucacaguc 1680

aagcagcuga aggaagacua cuucaagaag aucgaaugcu ucgacagcgu cgaaaucagc 1740

ggagucgaag acagauucaa cgcaagccug ggaacauacc acgaccugcu gaagaucauc 1800

aaggacaagg acuuccugga caacgaagaa aacgaagaca uccuggaaga caucguccug 1860

acacugacac uguucgaaga cagagaaaug aucgaagaaa gacugaagac auacgcacac 1920

cuguucgacg acaaggucau gaagcagcug aagagaagaa gauacacagg auggggaaga 1980

cugagcagaa agcugaucaa cggaaucaga gacaagcaga gcggaaagac aauccuggac 2040

uuccugaaga gcgacggauu cgcaaacaga aacuucaugc agcugaucca cgacgacagc 2100

cugacauuca aggaagacau ccagaaggca caggucagcg gacagggaga cagccugcac 2160

gaacacaucg caaaccuggc aggaagcccg gcaaucaaga agggaauccu gcagacaguc 2220

aaggucgucg acgaacuggu caaggucaug ggaagacaca agccggaaaa caucgucauc 2280

gaaauggcaa gagaaaacca gacaacacag aagggacaga agaacagcag agaaagaaug 2340

aagagaaucg aagaaggaau caaggaacug ggaagccaga uccugaagga acacccgguc 2400

gaaaacacac agcugcagaa cgaaaagcug uaccuguacu accugcagaa cggaagagac 2460

auguacgucg accaggaacu ggacaucaac agacugagcg acuacgacgu cgaccacauc 2520

gucccgcaga gcuuccugaa ggacgacagc aucgacaaca agguccugac aagaagcgac 2580

aagaacagag gaaagagcga caacgucccg agcgaagaag ucgucaagaa gaugaagaac 2640

uacuggagac agcugcugaa cgcaaagcug aucacacaga gaaaguucga caaccugaca 2700

aaggcagaga gaggaggacu gagcgaacug gacaaggcag gauucaucaa gagacagcug 2760

gucgaaacaa gacagaucac aaagcacguc gcacagaucc uggacagcag aaugaacaca 2820

aaguacgacg aaaacgacaa gcugaucaga gaagucaagg ucaucacacu gaagagcaag 2880

cuggucagcg acuucagaaa ggacuuccag uucuacaagg ucagagaaau caacaacuac 2940

caccacgcac acgacgcaua ccugaacgca gucgucggaa cagcacugau caagaaguac 3000

ccgaagcugg aaagcgaauu cgucuacgga gacuacaagg ucuacgacgu cagaaagaug 3060

aucgcaaaga gcgaacagga aaucggaaag gcaacagcaa aguacuucuu cuacagcaac 3120

aucaugaacu ucuucaagac agaaaucaca cuggcaaacg gagaaaucag aaagagaccg 3180

cugaucgaaa caaacggaga aacaggagaa aucgucuggg acaagggaag agacuucgca 3240

acagucagaa agguccugag caugccgcag gucaacaucg ucaagaagac agaaguccag 3300

acaggaggau ucagcaagga aagcauccug ccgaagagaa acagcgacaa gcugaucgca 3360

agaaagaagg acugggaccc gaagaaguac ggaggauucg acagcccgac agucgcauac 3420

agcguccugg ucgucgcaaa ggucgaaaag ggaaagagca agaagcugaa gagcgucaag 3480

gaacugcugg gaaucacaau cauggaaaga agcagcuucg aaaagaaccc gaucgacuuc 3540

cuggaagcaa agggauacaa ggaagucaag aaggaccuga ucaucaagcu gccgaaguac 3600

agccuguucg aacuggaaaa cggaagaaag agaaugcugg caagcgcagg agaacugcag 3660

aagggaaacg aacuggcacu gccgagcaag uacgucaacu uccuguaccu ggcaagccac 3720

uacgaaaagc ugaagggaag cccggaagac aacgaacaga agcagcuguu cgucgaacag 3780

cacaagcacu accuggacga aaucaucgaa cagaucagcg aauucagcaa gagagucauc 3840

cuggcagacg caaaccugga caagguccug agcgcauaca acaagcacag agacaagccg 3900

aucagagaac aggcagaaaa caucauccac cuguucacac ugacaaaccu gggagcaccg 3960

gcagcauuca aguacuucga cacaacaauc gacagaaaga gauacacaag cacaaaggaa 4020

guccuggacg caacacugau ccaccagagc aucacaggac uguacgaaac aagaaucgac 4080

cugagccagc ugggaggaga cggaggagga agcccgaaga agaagagaaa gguc 4134

<210> 211
<211> 4134
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de codificación desnuda de la nickasa Cas9

<400> 211
gacaagaagu acagcaucgg acuggcaauc ggaacaaaca gcgucggaug ggcagucauc 60

acagacgaau acaaggcccc gagcaagaag uucaaggucc ugggaaacac agacagacac 120

agcaucaaga agaaccugau cggagcacug cuguucgaca gcggagaaac agcagaagca 180

acaagacuga agagaacagc aagaagaaga uacacaagaa gaaagaacag aaucugcuac 240

cugcaggaaa ucuucagcaa cgaaauggca aaggucgacg acagcuucuu ccacagacug 300

gaagaaagcu uccuggucga agaagacaag aagcacgaaa gacacccgau cuucggaaac 360

aucgucgacg aagucgcaua ccacgaaaag uacccgacaa ucuaccaccu gagaaagaag 420

cuggucgaca gcacagacaa ggcagaccug agacugaucu accuggcacu ggcacacaug 480

aucaaguuca gaggacacuu ccugaucgaa ggagaccuga acccggacaa cagcgacguc 540

gacaagcugu ucauccagcu gguccagaca uacaaccagc uguucgaaga aaacccgauc 600

aacgcaagcg gagucgacgc aaaggcaauc cugagcgcaa gacugagcaa gagcagaaga 660

cuggaaaacc ugaucgcaca gcugccggga gaaaagaaga acggacuguu cggaaaccug 720

aucgcacuga gccugggacu gacaccgaac uucaagagca acuucgaccu ggcagaagac 780

gcaaagcugc agcugagcaa ggacacauac gacgacgacc uggacaaccu gcuggcacag 840

aucggagacc aguacgcaga ccuguuccug gcagcaaaga accugagcga cgcaauccug 900

cugagcgaca uccugagagu caacacagaa aucacaaagg caccgcugag cgcaagcaug 960

aucaagagau acgacgaaca ccaccaggac cugacacugc ugaaggcacu ggucagacag 1020

cagcugccgg aaaaguacaa ggaaaucuuc uucgaccaga gcaagaacgg auacgcagga 1080

uacaucgacg gaggagcaag ccaggaagaa uucuacaagu ucaucaagcc gauccuggaa 1140

aagauggacg gaacagaaga acugcugguc aagcugaaca gagaagaccu gcugagaaag 1200

cagagaacau ucgacaacgg aagcaucccg caccagaucc accugggaga acugcacgca 1260

auccugagaa gacaggaaga cuucuacccg uuccugaagg acaacagaga aaagaucgaa 1320

aagauccuga cauucagaau cccguacuac gucggaccgc uggcaagagg aaacagcaga 1380

uucgcaugga ugacaagaaa gagcgaagaa acaaucacac cguggaacuu cgaagaaguc 1440

gucgacaagg gagcaagcgc acagagcuuc aucgaaagaa ugacaaacuu cgacaagaac 1500

cugccgaacg aaaagguccu gccgaagcac agccugcugu acgaauacuu cacagucuac 1560

aacgaacuga caaaggucaa guacgucaca gaaggaauga gaaagccggc auuccugagc 1620

ggagaacaga agaaggcaau cgucgaccug cuguucaaga caaacagaaa ggucacaguc 1680

aagcagcuga aggaagacua cuucaagaag aucgaaugcu ucgacagcgu cgaaaucagc 1740

ggagucgaag acagauucaa cgcaagccug ggaacauacc acgaccugcu gaagaucauc 1800

aaggacaagg acuuccugga caacgaagaa aacgaagaca uccuggaaga caucguccug 1860

acacugacac uguucgaaga cagagaaaug aucgaagaaa gacugaagac auacgcacac 1920

cuguucgacg acaaggucau gaagcagcug aagagaagaa gauacacagg auggggaaga 1980

cugagcagaa agcugaucaa cggaaucaga gacaagcaga gcggaaagac aauccuggac 2040

uuccugaaga gcgacggauu cgcaaacaga aacuucaugc agcugaucca cgacgacagc 2100

cugacauuca aggaagacau ccagaaggca caggucagcg gacagggaga cagccugcac 2160

gaacacaucg caaaccuggc aggaagcccg gcaaucaaga agggaauccu gcagacaguc 2220

aaggucgucg acgaacuggu caaggucaug ggaagacaca agccggaaaa caucgucauc 2280

gaaauggcaa gagaaaacca gacaacacag aagggacaga agaacagcag agaaagaaug 2340

aagagaaucg aagaaggaau caaggaacug ggaagccaga uccugaagga acacccgguc 2400

gaaaacacac agcugcagaa cgaaaagcug uaccuguacu accugcagaa cggaagagac 2460

auguacgucg accaggaacu ggacaucaac agacugagcg acuacgacgu cgaccacauc 2520

gucccgcaga gcuuccugaa ggacgacagc aucgacaaca agguccugac aagaagcgac 2580

aagaacagag gaaagagcga caacgucccg agcgaagaag ucgucaagaa gaugaagaac 2640

uacuggagac agcugcugaa cgcaaagcug aucacacaga gaaaguucga caaccugaca 2700

aaggcagaga gaggaggacu gagcgaacug gacaaggcag gauucaucaa gagacagcug 2760

gucgaaacaa gacagaucac aaagcacguc gcacagaucc uggacagcag aaugaacaca 2820

aaguacgacg aaaacgacaa gcugaucaga gaagucaagg ucaucacacu gaagagcaag 2880

cuggucagcg acuucagaaa ggacuuccag uucuacaagg ucagagaaau caacaacuac 2940

caccacgcac acgacgcaua ccugaacgca gucgucggaa cagcacugau caagaaguac 3000

ccgaagcugg aaagcgaauu cgucuacgga gacuacaagg ucuacgacgu cagaaagaug 3060

aucgcaaaga gcgaacagga aaucggaaag gcaacagcaa aguacuucuu cuacagcaac 3120

aucaugaacu ucuucaagac agaaaucaca cuggcaaacg gagaaaucag aaagagaccg 3180

cugaucgaaa caaacggaga aacaggagaa aucgucuggg acaagggaag agacuucgca 3240

acagucagaa agguccugag caugccgcag gucaacaucg ucaagaagac agaaguccag 3300

acaggaggau ucagcaagga aagcauccug ccgaagagaa acagcgacaa gcugaucgca 3360

agaaagaagg acugggaccc gaagaaguac ggaggauucg acagcccgac agucgcauac 3420

agcguccugg ucgucgcaaa ggucgaaaag ggaaagagca agaagcugaa gagcgucaag 3480

gaacugcugg gaaucacaau cauggaaaga agcagcuucg aaaagaaccc gaucgacuuc 3540

cuggaagcaa agggauacaa ggaagucaag aaggaccuga ucaucaagcu gccgaaguac 3600

agccuguucg aacuggaaaa cggaagaaag agaaugcugg caagcgcagg agaacugcag 3660

aagggaaacg aacuggcacu gccgagcaag uacgucaacu uccuguaccu ggcaagccac 3720

uacgaaaagc ugaagggaag cccggaagac aacgaacaga agcagcuguu cgucgaacag 3780

cacaagcacu accuggacga aaucaucgaa cagaucagcg aauucagcaa gagagucauc 3840

cuggcagacg caaaccugga caagguccug agcgcauaca acaagcacag agacaagccg 3900

aucagagaac aggcagaaaa caucauccac cuguucacac ugacaaaccu gggagcaccg 3960

gcagcauuca aguacuucga cacaacaauc gacagaaaga gauacacaag cacaaaggaa 4020

guccuggacg caacacugau ccaccagagc aucacaggac uguacgaaac aagaaucgac 4080

cugagccagc ugggaggaga cggaggagga agcccgaaga agaagagaaa gguc 4134

<210> 212
<211> 4134
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de codificación desnuda de dCas9

<400> 212
gacaagaagu acagcaucgg acuggcaauc ggaacaaaca gcgucggaug ggcagucauc 60

acagacgaau acaaggcccc gagcaagaag uucaaggucc ugggaaacac agacagacac 120

agcaucaaga agaaccugau cggagcacug cuguucgaca gcggagaaac agcagaagca 180

acaagacuga agagaacagc aagaagaaga uacacaagaa gaaagaacag aaucugcuac 240

cugcaggaaa ucuucagcaa cgaaauggca aaggucgacg acagcuucuu ccacagacug 300

gaagaaagcu uccuggucga agaagacaag aagcacgaaa gacacccgau cuucggaaac 360

aucgucgacg aagucgcaua ccacgaaaag uacccgacaa ucuaccaccu gagaaagaag 420

cuggucgaca gcacagacaa ggcagaccug agacugaucu accuggcacu ggcacacaug 480

aucaaguuca gaggacacuu ccugaucgaa ggagaccuga acccggacaa cagcgacguc 540

gacaagcugu ucauccagcu gguccagaca uacaaccagc uguucgaaga aaacccgauc 600

aacgcaagcg gagucgacgc aaaggcaauc cugagcgcaa gacugagcaa gagcagaaga 660

cuggaaaacc ugaucgcaca gcugccggga gaaaagaaga acggacuguu cggaaaccug 720

aucgcacuga gccuggggacu gacaccgaac uucaagagca acuucgaccu ggcagaagac 780

gcaaagcugc agcugagcaa ggacacauac gacgacgacc uggacaaccu gcuggcacag 840

aucggagacc aguacgcaga ccuguuccug gcagcaaaga accugagcga cgcaauccug 900

cugagcgaca uccugagagu caacacagaa aucacaaagg caccgcugag cgcaagcaug 960

aucaagagau acgacgaaca ccaccaggac cugacacugc ugaaggcacu ggucagacag 1020

cagcugccgg aaaaguacaa ggaaaucuuc uucgaccaga gcaagaacgg auacgcagga 1080

uacaucgacg gaggagcaag ccaggaagaa uucuacaagu ucaucaagcc gauccuggaa 1140

aagauggacg gaacagaaga acugcugguc aagcugaaca gagaagaccu gcugagaaag 1200

cagagaacau ucgacaacgg aagcaucccg caccagaucc accugggaga acugcacgca 1260

auccugagaa gacaggaaga cuucuacccg uuccugaagg acaacagaga aaagaucgaa 1320

aagauccuga cauucagaau cccguacuac gucggaccgc uggcaagagg aaacagcaga 1380

uucgcaugga ugacaagaaa gagcgaagaa acaaucacac cguggaacuu cgaagaaguc 1440

gucgacaagg gagcaagcgc acagagcuuc aucgaaagaa ugacaaacuu cgacaagaac 1500

cugccgaacg aaaagguccu gccgaagcac agccugcugu acgaauacuu cacagucuac 1560

aacgaacuga caaaggucaa guacgucaca gaaggaauga gaaagccggc auuccugagc 1620

ggagaacaga agaaggcaau cgucgaccug cuguucaaga caaacagaaa ggucacaguc 1680

aagcagcuga aggaagacua cuucaagaag aucgaaugcu ucgacagcgu cgaaaucagc 1740

ggagucgaag acagauucaa cgcaagccug ggaacauacc acgaccugcu gaagaucauc 1800

aaggacaagg acuuccugga caacgaagaa aacgaagaca uccuggaaga caucguccug 1860

acacugacac uguucgaaga cagagaaaug aucgaagaaa gacugaagac auacgcacac 1920

cuguucgacg acaaggucau gaagcagcug aagagaagaa gauacacagg auggggaaga 1980

cugagcagaa agcugaucaa cggaaucaga gacaagcaga gcggaaagac aauccuggac 2040

uuccugaaga gcgacggauu cgcaaacaga aacuucaugc agcugaucca cgacgacagc 2100

cugacauuca aggaagacau ccagaaggca caggucagcg gacagggaga cagccugcac 2160

gaacacaucg caaaccuggc aggaagcccg gcaaucaaga agggaauccu gcagacaguc 2220

aaggucgucg acgaacuggu caaggucaug ggaagacaca agccggaaaa caucgucauc 2280

gaaauggcaa gagaaaacca gacaacacag aagggacaga agaacagcag agaaagaaug 2340

aagagaaucg aagaaggaau caaggaacug ggaagccaga uccugaagga acacccgguc 2400

gaaaacacac agcugcagaa cgaaaagcug uaccuguacu accugcagaa cggaagagac 2460

auguacgucg accaggaacu ggacaucaac agacugagcg acuacgacgu cgacgcaauc 2520

gucccgcaga gcuuccugaa ggacgacagc aucgacaaca agguccugac aagaagcgac 2580

aagaacagag gaaagagcga caacgucccg agcgaagaag ucgucaagaa gaugaagaac 2640

uacuggagac agcugcugaa cgcaaagcug aucacacaga gaaaguucga caaccugaca 2700

aaggcagaga gaggaggacu gagcgaacug gacaaggcag gauucaucaa gagacagcug 2760

gucgaaacaa gacagaucac aaagcacguc gcacagaucc uggacagcag aaugaacaca 2820

aaguacgacg aaaacgacaa gcugaucaga gaagucaagg ucaucacacu gaagagcaag 2880

cuggucagcg acuucagaaa ggacuuccag uucuacaagg ucagagaaau caacaacuac 2940

caccacgcac acgacgcaua ccugaacgca gucgucggaa cagcacugau caagaaguac 3000

ccgaagcugg aaagcgaauu cgucuacgga gacuacaagg ucuacgacgu cagaaagaug 3060

aucgcaaaga gcgaacagga aaucggaaag gcaacagcaa aguacuucuu cuacagcaac 3120

aucaugaacu ucuucaagac agaaaucaca cuggcaaacg gagaaaucag aaagagaccg 3180

cugaucgaaa caaacggaga aacaggagaa aucgucuggg acaagggaag agacuucgca 3240

acagucagaa agguccugag caugccgcag gucaacaucg ucaagaagac agaaguccag 3300

acaggaggau ucagcaagga aagcauccug ccgaagagaa acagcgacaa gcugaucgca 3360

agaaagaagg acugggaccc gaagaaguac ggaggauucg acagcccgac agucgcauac 3420

agcguccugg ucgucgcaaa ggucgaaaag ggaaagagca agaagcugaa gagcgucaag 3480

gaacugcugg gaaucacaau cauggaaaga agcagcuucg aaaagaaccc gaucgacuuc 3540

cuggaagcaa agggauacaa ggaagucaag aaggaccuga ucaucaagcu gccgaaguac 3600

agccuguucg aacuggaaaa cggaagaaag agaaugcugg caagcgcagg agaacugcag 3660

aagggaaacg aacuggcacu gccgagcaag uacgucaacu uccuguaccu ggcaagccac 3720

uacgaaaagc ugaagggaag cccggaagac aacgaacaga agcagcuguu cgucgaacag 3780

cacaagcacu accuggacga aaucaucgaa cagaucagcg aauucagcaa gagagucauc 3840

cuggcagacg caaaccugga caagguccug agcgcauaca acaagcacag agacaagccg 3900

aucagagaac aggcagaaaa caucauccac cuguucacac ugacaaaccu gggagcaccg 3960

gcagcauuca aguacuucga cacaacaauc gacagaaaga gauacacaag cacaaaggaa 4020

guccuggacg caacacugau ccaccagagc aucacaggac uguacgaaac aagaaucgac 4080

cugagccagc ugggaggaga cggaggagga agcccgaaga agaagagaaa gguc 4134

<210> 213
<211> 1368
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: Secuencia de aminoácidos de Cas9 (sin NLS)

<400> 213

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val
1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
210 215 220

Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
225 230 235 240

Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
245 250 255

Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
260 265 270

Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
275 280 285

Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
325 330 335

Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
340 345 350

Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
355 360 365

Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
370 375 380

Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
405 410 415

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
675 680 685

Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
690 695 700

Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
705 710 715 720

His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
1160 1165 1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
1175 1180 1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly
1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val
1220 1225 1230

Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys
1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys
1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala
1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn
1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala
1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser
1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr
1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
1355 1360 1365

<210> 214
<211> 4107
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF del ARNm de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 213 que usa codones de mínima uridina, con codones de inicio y parada

<400> 214
auggacaaga aguacagcau cggacuggac aucggaacaa acagcgucgg augggcaguc 60

aucacagacg aauacaaggu cccgagcaag aaguucaagg uccugggaaa cacagacaga 120

cacagcauca agaagaaccu gaucggagca cugcuguucg acagcggaga aacagcagaa 180

gcaacaagac ugaagagaac agcaagaaga agauacacaa gaagaaagaa cagaaucugc 240

uaccugcagg aaaucuucag caacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccacaga 300

cuggaagaaa gcuuccuggu cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gaucuucgga 360

aacaucgucg acgaagucgc auaccacgaa aaguacccga caaucuacca ccugagaaag 420

aagcuggucg acagcacaga caaggcagac cugagacuga ucuaccuggc acuggcacac 480

augaucaagu ucagaggaca cuuccugauc gaaggagacc ugaacccgga caacagcgac 540

gucgacaagc uguucaucca gcugguccag acauacaacc agcuguucga agaaaacccg 600

aucaacgcaa gcggagucga cgcaaaggca auccugagcg caagacugag caagagcaga 660

agacuggaaa accugaucgc acagcugccg ggagaaaaga agaacggacu guucggaaac 720

cugaucgcac ugagccuggg acugacaccg aacuucaaga gcaacuucga ccuggcagaa 780

gacgcaaagc ugcagcugag caaggacaca uacgacgacg accuggacaa ccugcuggca 840

cagaucggag accaguacgc agaccuguuc cuggcagcaa agaaccugag cgacgcaauc 900

cugcugagcg acauccugag agucaacaca gaaaucacaa aggcaccgcu gagcgcaagc 960

augaucaaga gauacgacga acaccaccag gaccugacac ugcugaaggc acuggucaga 1020

cagcagcugc cggaaaagua caaggaaauc uucuucgacc agagcaagaa cggauacgca 1080

ggauacaucg acggaggagc aagccaggaa gaauucuaca aguucaucaa gccgauccug 1140

gaaaagaugg acggaacaga agaacugcug gucaagcuga acagagaaga ccugcugaga 1200

aagcagagaa cauucgacaa cggaagcauc ccgcaccaga uccaccuggg agaacugcac 1260

gcaauccuga gaagacagga agacuucuac ccguuccuga aggacaacag agaaaagauc 1320

gaaaagaucc ugacauucag aaucccguac uacgucggac cgcuggcaag aggaaacagc 1380

agauucgcau ggaugacaag aaagagcgaa gaaacaauca caccguggaa cuucgaagaa 1440

gucgucgaca agggagcaag cgcacagagc uucaucgaaa gaaugacaaa cuucgacaag 1500

aaccugccga acgaaaaggu ccugccgaag cacagccugc uguacgaaua cuucacaguc 1560

uacaacgaac ugacaaaggu caaguacguc acagaaggaa ugagaaagcc ggcauuccug 1620

agcggagaac agaagaaggc aaucgucgac cugcuguuca agacaaacag aaaggucaca 1680

gucaagcagc ugaaggaaga cuacuucaag aagaucgaau gcuucgacag cgucgaaauc 1740

agcggagucg aagacagauu caacgcaagc cugggaacau accacgaccu gcugaagauc 1800

aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgaa gaaaacgaag acauccugga agacaucguc 1860

cugacacuga cacuguucga agacagagaa augaucgaag aaagacugaa gacauacgca 1920

caccuguucg acgacaaggu caugaagcag cugaagagaa gaagauacac aggaugggga 1980

agacugagca gaaagcugau caacggaauc agagacaagc agagcggaaa gacaauccug 2040

gacuuccuga agagcgacgg auucgcaaac agaaacuuca ugcagcugau ccacgacgac 2100

agccugacau ucaaggaaga cauccagaag gcacagguca gcggacaggg agacagccug 2160

cacgaacaca ucgcaaaccu ggcaggaagc ccggcaauca agaagggaau ccugcagaca 2220

gucaaggucg ucgacgaacu ggucaagguc augggaagac acaagccgga aaacaucguc 2280

aucgaaaugg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga 2340

augaagagaa ucgaagaagg aaucaaggaa cugggaagcc agauccugaa ggaacacccg 2400

gucgaaaaca cacagcugca gaacgaaaag cuguaccugu acuaccugca gaacggaaga 2460

gacauguacg ucgaccagga acuggacauc aacagacuga gcgacuacga cgucgaccac 2520

aucgucccgc agagcuuccu gaaggacgac agcaucgaca acaagguccu gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaaagag cgacaacguc ccgagcgaag aagucgucaa gaagaugaag 2640

aacuacugga gacagcugcu gaacgcaaag cugaucacac agagaaaguu cgacaaccug 2700

acaaaggcag agagaggagg acugagcgaa cuggacaagg caggauucau caagagacag 2760

cuggucgaaa caagacagau cacaaagcac gucgcacaga uccuggacag cagaaugaac 2820

acaaaguacg acgaaaacga caagcugauc agagaaguca aggucaucac acugaagagc 2880

aagcugguca gcgacuucag aaaggacuuc caguucuaca aggucagaga aaucaacaac 2940

uaccaccacg cacacgacgc auaccugaac gcagucgucg gaacagcacu gaucaagaag 3000

uacccgaagc uggaaagcga auucgucuac ggagacuaca aggucuacga cgucagaaag 3060

augaucgcaa agagcgaaca ggaaaucgga aaggcaacag caaaguacuu cuucuacagc 3120

aacaucauga acuucuucaa gacagaaauc acacuggcaa acggagaaau cagaaagaga 3180

ccgcugaucg aaacaaacgg agaaacagga gaaaucgucu gggacaaggg aagagacuuc 3240

gcaacaguca gaaagguccu gagcaugccg caggucaaca ucgucaagaa gacagaaguc 3300

cagacaggag gauucagcaa ggaaagcauc cugccgaaga gaaacagcga caagcugauc 3360

gcaagaaaga aggacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgacagccc gacagucgca 3420

uacagcgucc uggucgucgc aaaggucgaa aagggaaaga gcaagaagcu gaagagcguc 3480

aaggaacugc ugggaaucac aaucauggaa agaagcagcu ucgaaaagaa cccgaucgac 3540

uuccuggaag caaagggaua caaggaaguc aagaaggacc ugaucaucaa gcugccgaag 3600

uacagccugu ucgaacugga aaacggaaga aagagaaugc uggcaagcgc aggagaacug 3660

cagaagggaa acgaacuggc acugccgagc aaguacguca acuuccugua ccuggcaagc 3720

cacuacgaaa agcugaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagcu guucgucgaa 3780

cagcacaagc acuaccugga cgaaaucauc gaacagauca gcgaauucag caagagaguc 3840

auccuggcag acgcaaaccu ggacaagguc cugagcgcau acaacaagca cagagacaag 3900

ccgaucagag aacaggcaga aaacaucauc caccuguuca cacugacaaa ccugggagca 3960

ccggcagcau ucaaguacuu cgacacaaca aucgacagaa agagauacac aagcacaaag 4020

gaaguccugg acgcaacacu gauccaccag agcaucacag gacuguacga aacaagaauc 4080

gaccugagcc agcugggagg agacuag 4107

<210> 215
<211> 4101
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de codificación de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 213 que usa codones de mínima uridina (sin codones de inicio y parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)

<400> 215
gacaagaagu acagcaucgg acuggacauc ggaacaaaca gcgucggaug ggcagucauc 60

acagacgaau acaaggcccc gagcaagaag uucaaggucc ugggaaacac agacagacac 120

agcaucaaga agaaccugau cggagcacug cuguucgaca gcggagaaac agcagaagca 180

acaagacuga agagaacagc aagaagaaga uacacaagaa gaaagaacag aaucugcuac 240

cugcaggaaa ucuucagcaa cgaaauggca aaggucgacg acagcuucuu ccacagacug 300

gaagaaagcu uccuggucga agaagacaag aagcacgaaa gacacccgau cuucggaaac 360

aucgucgacg aagucgcaua ccacgaaaag uacccgacaa ucuaccaccu gagaaagaag 420

cuggucgaca gcacagacaa ggcagaccug agacugaucu accuggcacu ggcacacaug 480

aucaaguuca gaggacacuu ccugaucgaa ggagaccuga acccggacaa cagcgacguc 540

gacaagcugu ucauccagcu gguccagaca uacaaccagc uguucgaaga aaacccgauc 600

aacgcaagcg gagucgacgc aaaggcaauc cugagcgcaa gacugagcaa gagcagaaga 660

cuggaaaacc ugaucgcaca gcugccggga gaaaagaaga acggacuguu cggaaaccug 720

aucgcacuga gccugggacu gacaccgaac uucaagagca acuucgaccu ggcagaagac 780

gcaaagcugc agcugagcaa ggacacauac gacgacgacc uggacaaccu gcuggcacag 840

aucggagacc aguacgcaga ccuguuccug gcagcaaaga accugagcga cgcaauccug 900

cugagcgaca uccugagagu caacacagaa aucacaaagg caccgcugag cgcaagcaug 960

aucaagagau acgacgaaca ccaccaggac cugacacugc ugaaggcacu ggucagacag 1020

cagcugccgg aaaaguacaa ggaaaucuuc uucgaccaga gcaagaacgg auacgcagga 1080

uacaucgacg gaggagcaag ccaggaagaa uucuacaagu ucaucaagcc gauccuggaa 1140

aagauggacg gaacagaaga acugcugguc aagcugaaca gagaagaccu gcugagaaag 1200

cagagaacau ucgacaacgg aagcaucccg caccagaucc accugggaga acugcacgca 1260

auccugagaa gacaggaaga cuucuacccg uuccugaagg acaacagaga aaagaucgaa 1320

aagauccuga cauucagaau cccguacuac gucggaccgc uggcaagagg aaacagcaga 1380

uucgcaugga ugacaagaaa gagcgaagaa acaaucacac cguggaacuu cgaagaaguc 1440

gucgacaagg gagcaagcgc acagagcuuc aucgaaagaa ugacaaacuu cgacaagaac 1500

cugccgaacg aaaagguccu gccgaagcac agccugcugu acgaauacuu cacagucuac 1560

aacgaacuga caaaggucaa guacgucaca gaaggaauga gaaagccggc auuccugagc 1620

ggagaacaga agaaggcaau cgucgaccug cuguucaaga caaacagaaa ggucacaguc 1680

aagcagcuga aggaagacua cuucaagaag aucgaaugcu ucgacagcgu cgaaaucagc 1740

ggagucgaag acagauucaa cgcaagccug ggaacauacc acgaccugcu gaagaucauc 1800

aaggacaagg acuuccugga caacgaagaa aacgaagaca uccuggaaga caucguccug 1860

acacugacac uguucgaaga cagagaaaug aucgaagaaa gacugaagac auacgcacac 1920

cuguucgacg acaaggucau gaagcagcug aagagaagaa gauacacagg auggggaaga 1980

cugagcagaa agcugaucaa cggaaucaga gacaagcaga gcggaaagac aauccuggac 2040

uuccugaaga gcgacggauu cgcaaacaga aacuucaugc agcugaucca cgacgacagc 2100

cugacauuca aggaagacau ccagaaggca caggucagcg gacagggaga cagccugcac 2160

gaacacaucg caaaccuggc aggaagcccg gcaaucaaga agggaauccu gcagacaguc 2220

aaggucgucg acgaacuggu caaggucaug ggaagacaca agccggaaaa caucgucauc 2280

gaaauggcaa gagaaaacca gacaacacag aagggacaga agaacagcag agaaagaaug 2340

aagagaaucg aagaaggaau caaggaacug ggaagccaga uccugaagga acacccgguc 2400

gaaaacacac agcugcagaa cgaaaagcug uaccuguacu accugcagaa cggaagagac 2460

auguacgucg accaggaacu ggacaucaac agacugagcg acuacgacgu cgaccacauc 2520

gucccgcaga gcuuccugaa ggacgacagc aucgacaaca agguccugac aagaagcgac 2580

aagaacagag gaaagagcga caacgucccg agcgaagaag ucgucaagaa gaugaagaac 2640

uacuggagac agcugcugaa cgcaaagcug aucacacaga gaaaguucga caaccugaca 2700

aaggcagaga gaggaggacu gagcgaacug gacaaggcag gauucaucaa gagacagcug 2760

gucgaaacaa gacagaucac aaagcacguc gcacagaucc uggacagcag aaugaacaca 2820

aaguacgacg aaaacgacaa gcugaucaga gaagucaagg ucaucacacu gaagagcaag 2880

cuggucagcg acuucagaaa ggacuuccag uucuacaagg ucagagaaau caacaacuac 2940

caccacgcac acgacgcaua ccugaacgca gucgucggaa cagcacugau caagaaguac 3000

ccgaagcugg aaagcgaauu cgucuacgga gacuacaagg ucuacgacgu cagaaagaug 3060

aucgcaaaga gcgaacagga aaucggaaag gcaacagcaa aguacuucuu cuacagcaac 3120

aucaugaacu ucuucaagac agaaaucaca cuggcaaacg gagaaaucag aaagagaccg 3180

cugaucgaaa caaacggaga aacaggagaa aucgucuggg acaagggaag agacuucgca 3240

acagucagaa agguccugag caugccgcag gucaacaucg ucaagaagac agaaguccag 3300

acaggaggau ucagcaagga aagcauccug ccgaagagaa acagcgacaa gcugaucgca 3360

agaaagaagg acugggaccc gaagaaguac ggaggauucg acagcccgac agucgcauac 3420

agcguccugg ucgucgcaaa ggucgaaaag ggaaagagca agaagcugaa gagcgucaag 3480

gaacugcugg gaaucacaau cauggaaaga agcagcuucg aaaagaaccc gaucgacuuc 3540

cuggaagcaa agggauacaa ggaagucaag aaggaccuga ucaucaagcu gccgaaguac 3600

agccuguucg aacuggaaaa cggaagaaag agaaugcugg caagcgcagg agaacugcag 3660

aagggaaacg aacuggcacu gccgagcaag uacgucaacu uccuguaccu ggcaagccac 3720

uacgaaaagc ugaagggaag cccggaagac aacgaacaga agcagcuguu cgucgaacag 3780

cacaagcacu accuggacga aaucaucgaa cagaucagcg aauucagcaa gagagucauc 3840

cuggcagacg caaaccugga caagguccug agcgcauaca acaagcacag agacaagccg 3900

aucagagaac aggcagaaaa caucauccac cuguucacac ugacaaaccu gggagcaccg 3960

gcagcauuca aguacuucga cacaacaauc gacagaaaga gauacacaag cacaaaggaa 4020

guccuggacg caacacugau ccaccagagc aucacaggac uguacgaaac aagaaucgac 4080

cugagccagc ugggaggaga c 4101

<210> 216
<211> 1368
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de aminoácidos de la nickasa Cas9 (sin NLS)

<400> 216

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Ala Ile Gly Thr Asn Ser Val
1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
210 215 220

Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
225 230 235 240

Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
245 250 255

Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
260 265 270

Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
275 280 285

Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
325 330 335

Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
340 345 350

Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
355 360 365

Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
370 375 380

Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
405 410 415

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
675 680 685

Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
690 695 700

Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
705 710 715 720

His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
1160 1165 1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
1175 1180 1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly
1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val
1220 1225 1230

Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys
1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys
1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala
1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn
1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala
1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser
1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr
1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
1355 1360 1365

<210> 217
<211> 4107
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF del ARNm de la nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 216 que usa codones de mínima uridina como se enumeran en la Tabla 3, con codones de inicio y parada

<400> 217
auggacaaga aguacagcau cggacuggca aucggaacaa acagcgucgg augggcaguc 60

aucacagacg aauacaaggu cccgagcaag aaguucaagg uccugggaaa cacagacaga 120

cacagcauca agaagaaccu gaucggagca cugcuguucg acagcggaga aacagcagaa 180

gcaacaagac ugaagagaac agcaagaaga agauacacaa gaagaaagaa cagaaucugc 240

uaccugcagg aaaucuucag caacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccacaga 300

cuggaagaaa gcuuccuggu cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gaucuucgga 360

aacaucgucg acgaagucgc auaccacgaa aaguacccga caaucuacca ccugagaaag 420

aagcuggucg acagcacaga caaggcagac cugagacuga ucuaccuggc acuggcacac 480

augaucaagu ucagaggaca cuuccugauc gaaggagacc ugaacccgga caacagcgac 540

gucgacaagc uguucaucca gcugguccag acauacaacc agcuguucga agaaaacccg 600

aucaacgcaa gcggagucga cgcaaaggca auccugagcg caagacugag caagagcaga 660

agacuggaaa accugaucgc acagcugccg ggagaaaaga agaacggacu guucggaaac 720

cugaucgcac ugagccuggg acugacaccg aacuucaaga gcaacuucga ccuggcagaa 780

gacgcaaagc ugcagcugag caaggacaca uacgacgacg accuggacaa ccugcuggca 840

cagaucggag accaguacgc agaccuguuc cuggcagcaa agaaccugag cgacgcaauc 900

cugcugagcg acauccugag agucaacaca gaaaucacaa aggcaccgcu gagcgcaagc 960

augaucaaga gauacgacga acaccaccag gaccugacac ugcugaaggc acuggucaga 1020

cagcagcugc cggaaaagua caaggaaauc uucuucgacc agagcaagaa cggauacgca 1080

ggauacaucg acggaggagc aagccaggaa gaauucuaca aguucaucaa gccgauccug 1140

gaaaagaugg acggaacaga agaacugcug gucaagcuga acagagaaga ccugcugaga 1200

aagcagagaa cauucgacaa cggaagcauc ccgcaccaga uccaccuggg agaacugcac 1260

gcaauccuga gaagacagga agacuucuac ccguuccuga aggacaacag agaaaagauc 1320

gaaaagaucc ugacauucag aaucccguac uacgucggac cgcuggcaag aggaaacagc 1380

agauucgcau ggaugacaag aaagagcgaa gaaacaauca caccguggaa cuucgaagaa 1440

gucgucgaca agggagcaag cgcacagagc uucaucgaaa gaaugacaaa cuucgacaag 1500

aaccugccga acgaaaaggu ccugccgaag cacagccugc uguacgaaua cuucacaguc 1560

uacaacgaac ugacaaaggu caaguacguc acagaaggaa ugagaaagcc ggcauuccug 1620

agcggagaac agaagaaggc aaucgucgac cugcuguuca agacaaacag aaaggucaca 1680

gucaagcagc ugaaggaaga cuacuucaag aagaucgaau gcuucgacag cgucgaaauc 1740

agcggagucg aagacagauu caacgcaagc cugggaacau accacgaccu gcugaagauc 1800

aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgaa gaaaacgaag acauccugga agacaucguc 1860

cugacacuga cacuguucga agacagagaa augaucgaag aaagacugaa gacauacgca 1920

caccuguucg acgacaaggu caugaagcag cugaagagaa gaagauacac aggaugggga 1980

agacugagca gaaagcugau caacggaauc agagacaagc agagcggaaa gacaauccug 2040

gacuuccuga agagcgacgg auucgcaaac agaaacuuca ugcagcugau ccacgacgac 2100

agccugacau ucaaggaaga cauccagaag gcacagguca gcggacaggg agacagccug 2160

cacgaacaca ucgcaaaccu ggcaggaagc ccggcaauca agaagggaau ccugcagaca 2220

gucaaggucg ucgacgaacu ggucaagguc augggaagac acaagccgga aaacaucguc 2280

aucgaaaugg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga 2340

augaagagaa ucgaagaagg aaucaaggaa cugggaagcc agauccugaa ggaacacccg 2400

gucgaaaaca cacagcugca gaacgaaaag cuguaccugu acuaccugca gaacggaaga 2460

gacauguacg ucgaccagga acuggacauc aacagacuga gcgacuacga cgucgaccac 2520

aucgucccgc agagcuuccu gaaggacgac agcaucgaca acaagguccu gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaaagag cgacaacguc ccgagcgaag aagucgucaa gaagaugaag 2640

aacuacugga gacagcugcu gaacgcaaag cugaucacac agagaaaguu cgacaaccug 2700

acaaaggcag agagaggagg acugagcgaa cuggacaagg caggauucau caagagacag 2760

cuggucgaaa caagacagau cacaaagcac gucgcacaga uccuggacag cagaaugaac 2820

acaaaguacg acgaaaacga caagcugauc agagaaguca aggucaucac acugaagagc 2880

aagcugguca gcgacuucag aaaggacuuc caguucuaca aggucagaga aaucaacaac 2940

uaccaccacg cacacgacgc auaccugaac gcagucgucg gaacagcacu gaucaagaag 3000

uacccgaagc uggaaagcga auucgucuac ggagacuaca aggucuacga cgucagaaag 3060

augaucgcaa agagcgaaca ggaaaucgga aaggcaacag caaaguacuu cuucuacagc 3120

aacaucauga acuucuucaa gacagaaauc acacuggcaa acggagaaau cagaaagaga 3180

ccgcugaucg aaacaaacgg agaaacagga gaaaucgucu gggacaaggg aagagacuuc 3240

gcaacaguca gaaagguccu gagcaugccg caggucaaca ucgucaagaa gacagaaguc 3300

cagacaggag gauucagcaa ggaaagcauc cugccgaaga gaaacagcga caagcugauc 3360

gcaagaaaga aggacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgacagccc gacagucgca 3420

uacagcgucc uggucgucgc aaaggucgaa aagggaaaga gcaagaagcu gaagagcguc 3480

aaggaacugc ugggaaucac aaucauggaa agaagcagcu ucgaaaagaa cccgaucgac 3540

uuccuggaag caaagggaua caaggaaguc aagaaggacc ugaucaucaa gcugccgaag 3600

uacagccugu ucgaacugga aaacggaaga aagagaaugc uggcaagcgc aggagaacug 3660

cagaagggaa acgaacuggc acugccgagc aaguacguca acuuccugua ccuggcaagc 3720

cacuacgaaa agcugaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagcu guucgucgaa 3780

cagcacaagc acuaccugga cgaaaucauc gaacagauca gcgaauucag caagagaguc 3840

auccuggcag acgcaaaccu ggacaagguc cugagcgcau acaacaagca cagagacaag 3900

ccgaucagag aacaggcaga aaacaucauc caccuguuca cacugacaaa ccugggagca 3960

ccggcagcau ucaaguacuu cgacacaaca aucgacagaa agagauacac aagcacaaag 4020

gaaguccugg acgcaacacu gauccaccag agcaucacag gacuguacga aacaagaauc 4080

gaccugagcc agcugggagg agacuag 4107

<210> 218
<211> 4101
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de codificación de la nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 216 que usa codones de mínima uridina como se enumeran en la Tabla 3 (sin codones de inicio y parada; adecuada para la inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)

<400> 218
gacaagaagu acagcaucgg acuggcaauc ggaacaaaca gcgucggaug ggcagucauc 60

acagacgaau acaaggcccc gagcaagaag uucaaggucc ugggaaacac agacagacac 120

agcaucaaga agaaccugau cggagcacug cuguucgaca gcggagaaac agcagaagca 180

acaagacuga agagaacagc aagaagaaga uacacaagaa gaaagaacag aaucugcuac 240

cugcaggaaa ucuucagcaa cgaaauggca aaggucgacg acagcuucuu ccacagacug 300

gaagaaagcu uccuggucga agaagacaag aagcacgaaa gacacccgau cuucggaaac 360

aucgucgacg aagucgcaua ccacgaaaag uacccgacaa ucuaccaccu gagaaagaag 420

cuggucgaca gcacagacaa ggcagaccug agacugaucu accuggcacu ggcacacaug 480

aucaaguuca gaggacacuu ccugaucgaa ggagaccuga acccggacaa cagcgacguc 540

gacaagcugu ucauccagcu gguccagaca uacaaccagc uguucgaaga aaacccgauc 600

aacgcaagcg gagucgacgc aaaggcaauc cugagcgcaa gacugagcaa gagcagaaga 660

cuggaaaacc ugaucgcaca gcugccggga gaaaagaaga acggacuguu cggaaaccug 720

aucgcacuga gccugggacu gacaccgaac uucaagagca acuucgaccu ggcagaagac 780

gcaaagcugc agcugagcaa ggacacauac gacgacgacc uggacaaccu gcuggcacag 840

aucggagacc aguacgcaga ccuguuccug gcagcaaaga accugagcga cgcaauccug 900

cugagcgaca uccugagagu caacacagaa aucacaaagg caccgcugag cgcaagcaug 960

aucaagagau acgacgaaca ccaccaggac cugacacugc ugaaggcacu ggucagacag 1020

cagcugccgg aaaaguacaa ggaaaucuuc uucgaccaga gcaagaacgg auacgcagga 1080

uacaucgacg gaggagcaag ccaggaagaa uucuacaagu ucaucaagcc gauccuggaa 1140

aagauggacg gaacagaaga acugcugguc aagcugaaca gagaagaccu gcugagaaag 1200

cagagaacau ucgacaacgg aagcaucccg caccagaucc accugggaga acugcacgca 1260

auccugagaa gacaggaaga cuucuacccg uuccugaagg acaacagaga aaagaucgaa 1320

aagauccuga cauucagaau cccguacuac gucggaccgc uggcaagagg aaacagcaga 1380

uucgcaugga ugacaagaaa gagcgaagaa acaaucacac cguggaacuu cgaagaaguc 1440

gucgacaagg gagcaagcgc acagagcuuc aucgaaagaa ugacaaacuu cgacaagaac 1500

cugccgaacg aaaagguccu gccgaagcac agccugcugu acgaauacuu cacagucuac 1560

aacgaacuga caaaggucaa guacgucaca gaaggaauga gaaagccggc auuccugagc 1620

ggagaacaga agaaggcaau cgucgaccug cuguucaaga caaacagaaa ggucacaguc 1680

aagcagcuga aggaagacua cuucaagaag aucgaaugcu ucgacagcgu cgaaaucagc 1740

ggagucgaag acagauucaa cgcaagccug ggaacauacc acgaccugcu gaagaucauc 1800

aaggacaagg acuuccugga caacgaagaa aacgaagaca uccuggaaga caucguccug 1860

acacugacac uguucgaaga cagagaaaug aucgaagaaa gacugaagac auacgcacac 1920

cuguucgacg acaaggucau gaagcagcug aagagaagaa gauacacagg auggggaaga 1980

cugagcagaa agcugaucaa cggaaucaga gacaagcaga gcggaaagac aauccuggac 2040

uuccugaaga gcgacggauu cgcaaacaga aacuucaugc agcugaucca cgacgacagc 2100

cugacauuca aggaagacau ccagaaggca caggucagcg gacagggaga cagccugcac 2160

gaacacaucg caaaccuggc aggaagcccg gcaaucaaga agggaauccu gcagacaguc 2220

aaggucgucg acgaacuggu caaggucaug ggaagacaca agccggaaaa caucgucauc 2280

gaaauggcaa gagaaaacca gacaacacag aagggacaga agaacagcag agaaagaaug 2340

aagagaaucg aagaaggaau caaggaacug ggaagccaga uccugaagga acacccgguc 2400

gaaaacacac agcugcagaa cgaaaagcug uaccuguacu accugcagaa cggaagagac 2460

auguacgucg accaggaacu ggacaucaac agacugagcg acuacgacgu cgaccacauc 2520

gucccgcaga gcuuccugaa ggacgacagc aucgacaaca agguccugac aagaagcgac 2580

aagaacagag gaaagagcga caacgucccg agcgaagaag ucgucaagaa gaugaagaac 2640

uacuggagac agcugcugaa cgcaaagcug aucacacaga gaaaguucga caaccugaca 2700

aaggcagaga gaggaggacu gagcgaacug gacaaggcag gauucaucaa gagacagcug 2760

gucgaaacaa gacagaucac aaagcacguc gcacagaucc uggacagcag aaugaacaca 2820

aaguacgacg aaaacgacaa gcugaucaga gaagucaagg ucaucacacu gaagagcaag 2880

cuggucagcg acuucagaaa ggacuuccag uucuacaagg ucagagaaau caacaacuac 2940

caccacgcac acgacgcaua ccugaacgca gucgucggaa cagcacugau caagaaguac 3000

ccgaagcugg aaagcgaauu cgucuacgga gacuacaagg ucuacgacgu cagaaagaug 3060

aucgcaaaga gcgaacagga aaucggaaag gcaacagcaa aguacuucuu cuacagcaac 3120

aucaugaacu ucuucaagac agaaaucaca cuggcaaacg gagaaaucag aaagagaccg 3180

cugaucgaaa caaacggaga aacaggagaa aucgucuggg acaagggaag agacuucgca 3240

acagucagaa agguccugag caugccgcag gucaacaucg ucaagaagac agaaguccag 3300

acaggaggau ucagcaagga aagcauccug ccgaagagaa acagcgacaa gcugaucgca 3360

agaaagaagg acugggaccc gaagaaguac ggaggauucg acagcccgac agucgcauac 3420

agcguccugg ucgucgcaaa ggucgaaaag ggaaagagca agaagcugaa gagcgucaag 3480

gaacugcugg gaaucacaau cauggaaaga agcagcuucg aaaagaaccc gaucgacuuc 3540

cuggaagcaa agggauacaa ggaagucaag aaggaccuga ucaucaagcu gccgaaguac 3600

agccuguucg aacuggaaaa cggaagaaag agaaugcugg caagcgcagg agaacugcag 3660

aagggaaacg aacuggcacu gccgagcaag uacgucaacu uccuguaccu ggcaagccac 3720

uacgaaaagc ugaagggaag cccggaagac aacgaacaga agcagcuguu cgucgaacag 3780

cacaagcacu accuggacga aaucaucgaa cagaucagcg aauucagcaa gagagucauc 3840

cuggcagacg caaaccugga caagguccug agcgcauaca acaagcacag agacaagccg 3900

aucagagaac aggcagaaaa caucauccac cuguucacac ugacaaaccu gggagcaccg 3960

gcagcauuca aguacuucga cacaacaauc gacagaaaga gauacacaag cacaaaggaa 4020

guccuggacg caacacugau ccaccagagc aucacaggac uguacgaaac aagaaucgac 4080

cugagccagc ugggaggaga c 4101

<210> 219
<211> 1368
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de aminoácidos de dCas9 (sin NLS)

<400> 219

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Ala Ile Gly Thr Asn Ser Val
1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
210 215 220

Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
225 230 235 240

Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
245 250 255

Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
260 265 270

Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
275 280 285

Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
325 330 335

Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
340 345 350

Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
355 360 365

Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
370 375 380

Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
405 410 415

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
675 680 685

Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
690 695 700

Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
705 710 715 720

His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp Ala Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
1160 1165 1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
1175 1180 1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly
1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val
1220 1225 1230

Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys
1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys
1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala
1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn
1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala
1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser
1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr
1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
1355 1360 1365

<210> 220
<211> 4107
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF del ARNm de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 219 que usa codones de mínima uridina como se enumeran en la Tabla 3, con codones de inicio y parada

<400> 220
auggacaaga aguacagcau cggacuggca aucggaacaa acagcgucgg augggcaguc 60

aucacagacg aauacaaggu cccgagcaag aaguucaagg uccugggaaa cacagacaga 120

cacagcauca agaagaaccu gaucggagca cugcuguucg acagcggaga aacagcagaa 180

gcaacaagac ugaagagaac agcaagaaga agauacacaa gaagaaagaa cagaaucugc 240

uaccugcagg aaaucuucag caacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccacaga 300

cuggaagaaa gcuuccuggu cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gaucuucgga 360

aacaucgucg acgaagucgc auaccacgaa aaguacccga caaucuacca ccugagaaag 420

aagcuggucg acagcacaga caaggcagac cugagacuga ucuaccuggc acuggcacac 480

augaucaagu ucagaggaca cuuccugauc gaaggagacc ugaacccgga caacagcgac 540

gucgacaagc uguucaucca gcugguccag acauacaacc agcuguucga agaaaacccg 600

aucaacgcaa gcggagucga cgcaaaggca auccugagcg caagacugag caagagcaga 660

agacuggaaa accugaucgc acagcugccg ggagaaaaga agaacggacu guucggaaac 720

cugaucgcac ugagccuggg acugacaccg aacuucaaga gcaacuucga ccuggcagaa 780

gacgcaaagc ugcagcugag caaggacaca uacgacgacg accuggacaa ccugcuggca 840

cagaucggag accaguacgc agaccuguuc cuggcagcaa agaaccugag cgacgcaauc 900

cugcugagcg acauccugag agucaacaca gaaaucacaa aggcaccgcu gagcgcaagc 960

augaucaaga gauacgacga acaccaccag gaccugacac ugcugaaggc acuggucaga 1020

cagcagcugc cggaaaagua caaggaaauc uucuucgacc agagcaagaa cggauacgca 1080

ggauacaucg acggaggagc aagccaggaa gaauucuaca aguucaucaa gccgauccug 1140

gaaaagaugg acggaacaga agaacugcug gucaagcuga acagagaaga ccugcugaga 1200

aagcagagaa cauucgacaa cggaagcauc ccgcaccaga uccaccuggg agaacugcac 1260

gcaauccuga gaagacagga agacuucuac ccguuccuga aggacaacag agaaaagauc 1320

gaaaagaucc ugacauucag aaucccguac uacgucggac cgcuggcaag aggaaacagc 1380

agauucgcau ggaugacaag aaagagcgaa gaaacaauca caccguggaa cuucgaagaa 1440

gucgucgaca agggagcaag cgcacagagc uucaucgaaa gaaugacaaa cuucgacaag 1500

aaccugccga acgaaaaggu ccugccgaag cacagccugc uguacgaaua cuucacaguc 1560

uacaacgaac ugacaaaggu caaguacguc acagaaggaa ugagaaagcc ggcauuccug 1620

agcggagaac agaagaaggc aaucgucgac cugcuguuca agacaaacag aaaggucaca 1680

gucaagcagc ugaaggaaga cuacuucaag aagaucgaau gcuucgacag cgucgaaauc 1740

agcggagucg aagacagauu caacgcaagc cugggaacau accacgaccu gcugaagauc 1800

aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgaa gaaaacgaag acauccugga agacaucguc 1860

cugacacuga cacuguucga agacagagaa augaucgaag aaagacugaa gacauacgca 1920

caccuguucg acgacaaggu caugaagcag cugaagagaa gaagauacac aggaugggga 1980

agacugagca gaaagcugau caacggaauc agagacaagc agagcggaaa gacaauccug 2040

gacuuccuga agagcgacgg auucgcaaac agaaacuuca ugcagcugau ccacgacgac 2100

agccugacau ucaaggaaga cauccagaag gcacagguca gcggacaggg agacagccug 2160

cacgaacaca ucgcaaaccu ggcaggaagc ccggcaauca agaagggaau ccugcagaca 2220

gucaaggucg ucgacgaacu ggucaagguc augggaagac acaagccgga aaacaucguc 2280

aucgaaaugg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga 2340

augaagagaa ucgaagaagg aaucaaggaa cugggaagcc agauccugaa ggaacacccg 2400

gucgaaaaca cacagcugca gaacgaaaag cuguaccugu acuaccugca gaacggaaga 2460

gacauguacg ucgaccagga acuggacauc aacagacuga gcgacuacga cgucgacgca 2520

aucgucccgc agagcuuccu gaaggacgac agcaucgaca acaagguccu gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaaagag cgacaacguc ccgagcgaag aagucgucaa gaagaugaag 2640

aacuacugga gacagcugcu gaacgcaaag cugaucacac agagaaaguu cgacaaccug 2700

acaaaggcag agagaggagg acugagcgaa cuggacaagg caggauucau caagagacag 2760

cuggucgaaa caagacagau cacaaagcac gucgcacaga uccuggacag cagaaugaac 2820

acaaaguacg acgaaaacga caagcugauc agagaaguca aggucaucac acugaagagc 2880

aagcugguca gcgacuucag aaaggacuuc caguucuaca aggucagaga aaucaacaac 2940

uaccaccacg cacacgacgc auaccugaac gcagucgucg gaacagcacu gaucaagaag 3000

uacccgaagc uggaaagcga auucgucuac ggagacuaca aggucuacga cgucagaaag 3060

augaucgcaa agagcgaaca ggaaaucgga aaggcaacag caaaguacuu cuucuacagc 3120

aacaucauga acuucuucaa gacagaaauc acacuggcaa acggagaaau cagaaagaga 3180

ccgcugaucg aaacaaacgg agaaacagga gaaaucgucu gggacaaggg aagagacuuc 3240

gcaacaguca gaaagguccu gagcaugccg caggucaaca ucgucaagaa gacagaaguc 3300

cagacaggag gauucagcaa ggaaagcauc cugccgaaga gaaacagcga caagcugauc 3360

gcaagaaaga aggacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgacagccc gacagucgca 3420

uacagcgucc uggucgucgc aaaggucgaa aagggaaaga gcaagaagcu gaagagcguc 3480

aaggaacugc ugggaaucac aaucauggaa agaagcagcu ucgaaaagaa cccgaucgac 3540

uuccuggaag caaagggaua caaggaaguc aagaaggacc ugaucaucaa gcugccgaag 3600

uacagccugu ucgaacugga aaacggaaga aagagaaugc uggcaagcgc aggagaacug 3660

cagaagggaa acgaacuggc acugccgagc aaguacguca acuuccugua ccuggcaagc 3720

cacuacgaaa agcugaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagcu guucgucgaa 3780

cagcacaagc acuaccugga cgaaaucauc gaacagauca gcgaauucag caagagaguc 3840

auccuggcag acgcaaaccu ggacaagguc cugagcgcau acaacaagca cagagacaag 3900

ccgaucagag aacaggcaga aaacaucauc caccuguuca cacugacaaa ccugggagca 3960

ccggcagcau ucaaguacuu cgacacaaca aucgacagaa agagauacac aagcacaaag 4020

gaaguccugg acgcaacacu gauccaccag agcaucacag gacuguacga aacaagaauc 4080

gaccugagcc agcugggagg agacuag 4107

<210> 221
<211> 4113
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de codificación de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 219 que usa codones de mínima uridina como se enumeran en la Tabla 3 (sin codones de inicio o parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)

<400> 221
gacaagaagu acagcaucgg acuggcaauc ggaacaaaca gcgucggaug ggcagucauc 60

acagacgaau acaaggcccc gagcaagaag uucaaggucc ugggaaacac agacagacac 120

agcaucaaga agaaccugau cggagcacug cuguucgaca gcggagaaac agcagaagca 180

acaagacuga agagaacagc aagaagaaga uacacaagaa gaaagaacag aaucugcuac 240

cugcaggaaa ucuucagcaa cgaaauggca aaggucgacg acagcuucuu ccacagacug 300

gaagaaagcu uccuggucga agaagacaag aagcacgaaa gacacccgau cuucggaaac 360

aucgucgacg aagucgcaua ccacgaaaag uacccgacaa ucuaccaccu gagaaagaag 420

cuggucgaca gcacagacaa ggcagaccug agacugaucu accuggcacu ggcacacaug 480

aucaaguuca gaggacacuu ccugaucgaa ggagaccuga acccggacaa cagcgacguc 540

gacaagcugu ucauccagcu gguccagaca uacaaccagc uguucgaaga aaacccgauc 600

aacgcaagcg gagucgacgc aaaggcaauc cugagcgcaa gacugagcaa gagcagaaga 660

cuggaaaacc ugaucgcaca gcugccggga gaaaagaaga acggacuguu cggaaaccug 720

aucgcacuga gccugggacu gacaccgaac uucaagagca acuucgaccu ggcagaagac 780

gcaaagcugc agcugagcaa ggacacauac gacgacgacc uggacaaccu gcuggcacag 840

aucggagacc aguacgcaga ccuguuccug gcagcaaaga accugagcga cgcaauccug 900

cugagcgaca uccugagagu caacacagaa aucacaaagg caccgcugag cgcaagcaug 960

aucaagagau acgacgaaca ccaccaggac cugacacugc ugaaggcacu ggucagacag 1020

cagcugccgg aaaaguacaa ggaaaucuuc uucgaccaga gcaagaacgg auacgcagga 1080

uacaucgacg gaggagcaag ccaggaagaa uucuacaagu ucaucaagcc gauccuggaa 1140

aagauggacg gaacagaaga acugcugguc aagcugaaca gagaagaccu gcugagaaag 1200

cagagaacau ucgacaacgg aagcaucccg caccagaucc accugggaga acugcacgca 1260

auccugagaa gacaggaaga cuucuacccg uuccugaagg acaacagaga aaagaucgaa 1320

aagauccuga cauucagaau cccguacuac gucggaccgc uggcaagagg aaacagcaga 1380

uucgcaugga ugacaagaaa gagcgaagaa acaaucacac cguggaacuu cgaagaaguc 1440

gucgacaagg gagcaagcgc acagagcuuc aucgaaagaa ugacaaacuu cgacaagaac 1500

cugccgaacg aaaagguccu gccgaagcac agccugcugu acgaauacuu cacagucuac 1560

aacgaacuga caaaggucaa guacgucaca gaaggaauga gaaagccggc auuccugagc 1620

ggagaacaga agaaggcaau cgucgaccug cuguucaaga caaacagaaa ggucacaguc 1680

aagcagcuga aggaagacua cuucaagaag aucgaaugcu ucgacagcgu cgaaaucagc 1740

ggagucgaag acagauucaa cgcaagccug ggaacauacc acgaccugcu gaagaucauc 1800

aaggacaagg acuuccugga caacgaagaa aacgaagaca uccuggaaga caucguccug 1860

acacugacac uguucgaaga cagagaaaug aucgaagaaa gacugaagac auacgcacac 1920

cuguucgacg acaaggucau gaagcagcug aagagaagaa gauacacagg auggggaaga 1980

cugagcagaa agcugaucaa cggaaucaga gacaagcaga gcggaaagac aauccuggac 2040

uuccugaaga gcgacggauu cgcaaacaga aacuucaugc agcugaucca cgacgacagc 2100

cugacauuca aggaagacau ccagaaggca caggucagcg gacagggaga cagccugcac 2160

gaacacaucg caaaccuggc aggaagcccg gcaaucaaga agggaauccu gcagacaguc 2220

aaggucgucg acgaacuggu caaggucaug ggaagacaca agccggaaaa caucgucauc 2280

gaaauggcaa gagaaaacca gacaacacag aagggacaga agaacagcag agaaagaaug 2340

aagagaaucg aagaaggaau caaggaacug ggaagccaga uccugaagga acacccgguc 2400

gaaaacacac agcugcagaa cgaaaagcug uaccuguacu accugcagaa cggaagagac 2460

auguacgucg accaggaacu ggacaucaac agacugagcg acuacgacgu cgacgcaauc 2520

gucccgcaga gcuuccugaa ggacgacagc aucgacaaca agguccugac aagaagcgac 2580

aagaacagag gaaagagcga caacgucccg agcgaagaag ucgucaagaa gaugaagaac 2640

uacuggagac agcugcugaa cgcaaagcug aucacacaga gaaaguucga caaccugaca 2700

aaggcagaga gaggaggacu gagcgaacug gacaaggcag gauucaucaa gagacagcug 2760

gucgaaacaa gacagaucac aaagcacguc gcacagaucc uggacagcag aaugaacaca 2820

aaguacgacg aaaacgacaa gcugaucaga gaagucaagg ucaucacacu gaagagcaag 2880

cuggucagcg acuucagaaa ggacuuccag uucuacaagg ucagagaaau caacaacuac 2940

caccacgcac acgacgcaua ccugaacgca gucgucggaa cagcacugau caagaaguac 3000

ccgaagcugg aaagcgaauu cgucuacgga gacuacaagg ucuacgacgu cagaaagaug 3060

aucgcaaaga gcgaacagga aaucggaaag gcaacagcaa aguacuucuu cuacagcaac 3120

aucaugaacu ucuucaagac agaaaucaca cuggcaaacg gagaaaucag aaagagaccg 3180

cugaucgaaa caaacggaga aacaggagaa aucgucuggg acaagggaag agacuucgca 3240

acagucagaa agguccugag caugccgcag gucaacaucg ucaagaagac agaaguccag 3300

acaggaggau ucagcaagga aagcauccug ccgaagagaa acagcgacaa gcugaucgca 3360

agaaagaagg acugggaccc gaagaaguac ggaggauucg acagcccgac agucgcauac 3420

agcguccugg ucgucgcaaa ggucgaaaag ggaaagagca agaagcugaa gagcgucaag 3480

gaacugcugg gaaucacaau cauggaaaga agcagcuucg aaaagaaccc gaucgacuuc 3540

cuggaagcaa agggauacaa ggaagucaag aaggaccuga ucaucaagcu gccgaaguac 3600

agccuguucg aacuggaaaa cggaagaaag agaaugcugg caagcgcagg agaacugcag 3660

aagggaaacg aacuggcacu gccgagcaag uacgucaacu uccuguaccu ggcaagccac 3720

uacgaaaagc ugaagggaag cccggaagac aacgaacaga agcagcuguu cgucgaacag 3780

cacaagcacu accuggacga aaucaucgaa cagaucagcg aauucagcaa gagagucauc 3840

cuggcagacg caaaccugga caagguccug agcgcauaca acaagcacag agacaagccg 3900

aucagagaac aggcagaaaa caucauccac cuguucacac ugacaaaccu gggagcaccg 3960

gcagcauuca aguacuucga cacaacaauc gacagaaaga gauacacaag cacaaaggaa 4020

guccuggacg caacacugau ccaccagagc aucacaggac uguacgaaac aagaaucgac 4080

cugagccagc ugggaggaga cggaggagga agc 4113

<210> 222
<211> 1392
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de aminoácidos de Cas9 con dos señales de localización nuclear (2xNLS) como los aminoácidos C-terminales

<400> 222

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala

195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
210 215 220

Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
225 230 235 240

Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
245 250 255

Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
260 265 270

Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
275 280 285

Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
325 330 335

Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
340 345 350

Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
355 360 365

Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
370 375 380

Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg

385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
405 410 415

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly

580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
675 680 685

Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
690 695 700

Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
705 710 715 720

His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile

770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg

965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys

1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
1160 1165 1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
1175 1180 1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly
1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val
1220 1225 1230

Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys
1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys
1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala
1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn
1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala
1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser

1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr
1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
1355 1360 1365

Gly Ser Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Asp Gly Ser Pro
1370 1375 1380

Lys Lys Lys Arg Lys Val Asp Ser Gly
1385 1390

<210> 223
<211> 4233
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF del ARNm de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 222 que usa codones de mínima uridina, con codones de inicio y parada

<400> 223
auggacaaga aguacagcau cggacuggac aucggaacaa acagcgucgg augggcaguc 60

aucacagacg aauacaaggu cccgagcaag aaguucaagg uccugggaaa cacagacaga 120

cacagcauca agaagaaccu gaucggagca cugcuguucg acagcggaga aacagcagaa 180

gcaacaagac ugaagagaac agcaagaaga agauacacaa gaagaaagaa cagaaucugc 240

uaccugcagg aaaucuucag caacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccacaga 300

cuggaagaaa gcuuccuggu cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gaucuucgga 360

aacaucgucg acgaagucgc auaccacgaa aaguacccga caaucuacca ccugagaaag 420

aagcuggucg acagcacaga caaggcagac cugagacuga ucuaccuggc acuggcacac 480

augaucaagu ucagaggaca cuuccugauc gaaggagacc ugaacccgga caacagcgac 540

gucgacaagc uguucaucca gcugguccag acauacaacc agcuguucga agaaaacccg 600

aucaacgcaa gcggagucga cgcaaaggca auccugagcg caagacugag caagagcaga 660

agacuggaaa accugaucgc acagcugccg ggagaaaaga agaacggacu guucggaaac 720

cugaucgcac ugagccuggg acugacaccg aacuucaaga gcaacuucga ccuggcagaa 780

gacgcaaagc ugcagcugag caaggacaca uacgacgacg accuggacaa ccugcuggca 840

cagaucggag accaguacgc agaccuguuc cuggcagcaa agaaccugag cgacgcaauc 900

cugcugagcg acauccugag agucaacaca gaaaucacaa aggcaccgcu gagcgcaagc 960

augaucaaga gauacgacga acaccaccag gaccugacac ugcugaaggc acuggucaga 1020

cagcagcugc cggaaaagua caaggaaauc uucuucgacc agagcaagaa cggauacgca 1080

ggauacaucg acggaggagc aagccaggaa gaauucuaca aguucaucaa gccgauccug 1140

gaaaagaugg acggaacaga agaacugcug gucaagcuga acagagaaga ccugcugaga 1200

aagcagagaa cauucgacaa cggaagcauc ccgcaccaga uccaccuggg agaacugcac 1260

gcaauccuga gaagacagga agacuucuac ccguuccuga aggacaacag agaaaagauc 1320

gaaaagaucc ugacauucag aaucccguac uacgucggac cgcuggcaag aggaaacagc 1380

agauucgcau ggaugacaag aaagagcgaa gaaacaauca caccguggaa cuucgaagaa 1440

gucgucgaca agggagcaag cgcacagagc uucaucgaaa gaaugacaaa cuucgacaag 1500

aaccugccga acgaaaaggu ccugccgaag cacagccugc uguacgaaua cuucacaguc 1560

uacaacgaac ugacaaaggu caaguacguc acagaaggaa ugagaaagcc ggcauuccug 1620

agcggagaac agaagaaggc aaucgucgac cugcuguuca agacaaacag aaaggucaca 1680

gucaagcagc ugaaggaaga cuacuucaag aagaucgaau gcuucgacag cgucgaaauc 1740

agcggagucg aagacagauu caacgcaagc cugggaacau accacgaccu gcugaagauc 1800

aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgaa gaaaacgaag acauccugga agacaucguc 1860

cugacacuga cacuguucga agacagagaa augaucgaag aaagacugaa gacauacgca 1920

caccuguucg acgacaaggu caugaagcag cugaagagaa gaagauacac aggaugggga 1980

agacugagca gaaagcugau caacggaauc agagacaagc agagcggaaa gacaauccug 2040

gacuuccuga agagcgacgg auucgcaaac agaaacuuca ugcagcugau ccacgacgac 2100

agccugacau ucaaggaaga cauccagaag gcacagguca gcggacaggg agacagccug 2160

cacgaacaca ucgcaaaccu ggcaggaagc ccggcaauca agaagggaau ccugcagaca 2220

gucaaggucg ucgacgaacu ggucaagguc augggaagac acaagccgga aaacaucguc 2280

aucgaaaugg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga 2340

augaagagaa ucgaagaagg aaucaaggaa cugggaagcc agauccugaa ggaacacccg 2400

gucgaaaaca cacagcugca gaacgaaaag cuguaccugu acuaccugca gaacggaaga 2460

gacauguacg ucgaccagga acuggacauc aacagacuga gcgacuacga cgucgaccac 2520

aucgucccgc agagcuuccu gaaggacgac agcaucgaca acaagguccu gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaaagag cgacaacguc ccgagcgaag aagucgucaa gaagaugaag 2640

aacuacugga gacagcugcu gaacgcaaag cugaucacac agagaaaguu cgacaaccug 2700

acaaaggcag agagaggagg acugagcgaa cuggacaagg caggauucau caagagacag 2760

cuggucgaaa caagacagau cacaaagcac gucgcacaga uccuggacag cagaaugaac 2820

acaaaguacg acgaaaacga caagcugauc agagaaguca aggucaucac acugaagagc 2880

aagcugguca gcgacuucag aaaggacuuc caguucuaca aggucagaga aaucaacaac 2940

uaccaccacg cacacgacgc auaccugaac gcagucgucg gaacagcacu gaucaagaag 3000

uacccgaagc uggaaagcga auucgucuac ggagacuaca aggucuacga cgucagaaag 3060

augaucgcaa agagcgaaca ggaaaucgga aaggcaacag caaaguacuu cuucuacagc 3120

aacaucauga acuucuucaa gacagaaauc acacuggcaa acggagaaau cagaaagaga 3180

ccgcugaucg aaacaaacgg agaaacagga gaaaucgucu gggacaaggg aagagacuuc 3240

gcaacaguca gaaagguccu gagcaugccg caggucaaca ucgucaagaa gacagaaguc 3300

cagacaggag gauucagcaa ggaaagcauc cugccgaaga gaaacagcga caagcugauc 3360

gcaagaaaga aggacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgacagccc gacagucgca 3420

uacagcgucc uggucgucgc aaaggucgaa aagggaaaga gcaagaagcu gaagagcguc 3480

aaggaacugc ugggaaucac aaucauggaa agaagcagcu ucgaaaagaa cccgaucgac 3540

uuccuggaag caaagggaua caaggaaguc aagaaggacc ugaucaucaa gcugccgaag 3600

uacagccugu ucgaacugga aaacggaaga aagagaaugc uggcaagcgc aggagaacug 3660

cagaagggaa acgaacuggc acugccgagc aaguacguca acuuccugua ccuggcaagc 3720

cacuacgaaa agcugaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagcu guucgucgaa 3780

cagcacaagc acuaccugga cgaaaucauc gaacagauca gcgaauucag caagagaguc 3840

auccuggcag acgcaaaccu ggacaaggUc cugagcgcau acaacaagca cagagacaag 3900

ccgaucagag aacaggcaga aaacaucauc caccuguuca cacugacaaa ccugggagca 3960

ccggcagcau ucaaguacuu cgacacaaca aucgacagaa agagauacac aagcacaaag 4020

gaaguccugg acgcaacacu gauccaccag agcaucacag gacuguacga aacaagaauc 4080

gaccugagcc agcugggagg agacggagga ggaagcccga agaagaagag aaaggucccg 4140

aagaagaaga gaaaggucgg aagcggaagc ccgaagaaga agagaaaggu cgacggaagc 4200

ccgaagaaga agagaaaggu cgacagcgga uag 4233

<210> 224
<211> 4227
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de codificación de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 222 que usa codones de mínima uridina (sin codones de inicio y parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)

<400> 224
gacaagaagu acagcaucgg acuggacauc ggaacaaaca gcgucggaug ggcagucauc 60

acagacgaau acaaggUccc gagcaagaag uucaaggUcc ugggaaacac agacagacac 120

agcaucaaga agaaccugau cggagcacug cuguucgaca gcggagaaac agcagaagca 180

acaagacuga agagaacagc aagaagaaga uacacaagaa gaaagaacag aaucugcuac 240

cugcaggaaa ucuucagcaa cgaaauggca aaggucgacg acagcuucuu ccacagacug 300

gaagaaagcu uccuggucga agaagacaag aagcacgaaa gacacccgau cuucggaaac 360

aucgucgacg aagucgcaua ccacgaaaag uacccgacaa ucuaccaccu gagaaagaag 420

cuggucgaca gcacagacaa ggcagaccug agacugaucu accuggcacu ggcacacaug 480

aucaaguuca gaggacacuu ccugaucgaa ggagaccuga acccggacaa cagcgacguc 540

gacaagcugu ucauccagcu gguccagaca uacaaccagc uguucgaaga aaacccgauc 600

aacgcaagcg gagucgacgc aaaggcaauc cugagcgcaa gacugagcaa gagcagaaga 660

cuggaaaacc ugaucgcaca gcugccggga gaaaagaaga acggacuguu cggaaaccug 720

aucgcacuga gccuggggacu gacaccgaac uucaagagca acuucgaccu ggcagaagac 780

gcaaagcugc agcugagcaa ggacacauac gacgacgacc uggacaaccu gcuggcacag 840

aucggagacc aguacgcaga ccuguuccug gcagcaaaga accugagcga cgcaauccug 900

cugagcgaca uccugagagu caacacagaa aucacaaagg caccgcugag cgcaagcaug 960

aucaagagau acgacgaaca ccaccaggac cugacacugc ugaaggcacu ggucagacag 1020

cagcugccgg aaaaguacaa ggaaaucuuc uucgaccaga gcaagaacgg auacgcagga 1080

uacaucgacg gaggagcaag ccaggaagaa uucuacaagu ucaucaagcc gauccuggaa 1140

aagauggacg gaacagaaga acugcugguc aagcugaaca gagaagaccu gcugagaaag 1200

cagagaacau ucgacaacgg aagcaucccg caccagaucc accugggaga acugcacgca 1260

auccugagaa gacaggaaga cuucuacccg uuccugaagg acaacagaga aaagaucgaa 1320

aagauccuga cauucagaau cccguacuac gucggaccgc uggcaagagg aaacagcaga 1380

uucgcaugga ugacaagaaa gagcgaagaa acaaucacac cguggaacuu cgaagaaguc 1440

gucgacaagg gagcaagcgc acagagcuuc aucgaaagaa ugacaaacuu cgacaagaac 1500

cugccgaacg aaaagguccu gccgaagcac agccugcugu acgaauacuu cacagucuac 1560

aacgaacuga caaaggucaa guacgucaca gaaggaauga gaaagccggc auuccugagc 1620

ggagaacaga agaaggcaau cgucgaccug cuguucaaga caaacagaaa ggucacaguc 1680

aagcagcuga aggaagacua cuucaagaag aucgaaugcu ucgacagcgu cgaaaucagc 1740

ggagucgaag acagauucaa cgcaagccug ggaacauacc acgaccugcu gaagaucauc 1800

aaggacaagg acuuccugga caacgaagaa aacgaagaca uccuggaaga caucguccug 1860

acacugacac uguucgaaga cagagaaaug aucgaagaaa gacugaagac auacgcacac 1920

cuguucgacg acaaggucau gaagcagcug aagagaagaa gauacacagg auggggaaga 1980

cugagcagaa agcugaucaa cggaaucaga gacaagcaga gcggaaagac aauccuggac 2040

uuccugaaga gcgacggauu cgcaaacaga aacuucaugc agcugaucca cgacgacagc 2100

cugacauuca aggaagacau ccagaaggca caggucagcg gacagggaga cagccugcac 2160

gaacacaucg caaaccuggc aggaagcccg gcaaucaaga agggaauccu gcagacaguc 2220

aaggucgucg acgaacuggu caaggucaug ggaagacaca agccggaaaa caucgucauc 2280

gaaauggcaa gagaaaacca gacaacacag aagggacaga agaacagcag agaaagaaug 2340

aagagaaucg aagaaggaau caaggaacug ggaagccaga uccugaagga acacccgguc 2400

gaaaacacac agcugcagaa cgaaaagcug uaccuguacu accugcagaa cggaagagac 2460

auguacgucg accaggaacu ggacaucaac agacugagcg acuacgacgu cgaccacauc 2520

gucccgcaga gcuuccugaa ggacgacagc aucgacaaca agguccugac aagaagcgac 2580

aagaacagag gaaagagcga caacgucccg agcgaagaag ucgucaagaa gaugaagaac 2640

uacuggagac agcugcugaa cgcaaagcug aucacacaga gaaaguucga caaccugaca 2700

aaggcagaga gaggaggacu gagcgaacug gacaaggcag gauucaucaa gagacagcug 2760

gucgaaacaa gacagaucac aaagcacguc gcacagaucc uggacagcag aaugaacaca 2820

aaguacgacg aaaacgacaa gcugaucaga gaagucaagg ucaucacacu gaagagcaag 2880

cuggucagcg acuucagaaa ggacuuccag uucuacaagg ucagagaaau caacaacuac 2940

caccacgcac acgacgcaua ccugaacgca gucgucggaa cagcacugau caagaaguac 3000

ccgaagcugg aaagcgaauu cgucuacgga gacuacaagg ucuacgacgu cagaaagaug 3060

aucgcaaaga gcgaacagga aaucggaaag gcaacagcaa aguacuucuu cuacagcaac 3120

aucaugaacu ucuucaagac agaaaucaca cuggcaaacg gagaaaucag aaagagaccg 3180

cugaucgaaa caaacggaga aacaggagaa aucgucuggg acaagggaag agacuucgca 3240

acagucagaa agguccugag caugccgcag gucaacaucg ucaagaagac agaaguccag 3300

acaggaggau ucagcaagga aagcauccug ccgaagagaa acagcgacaa gcugaucgca 3360

agaaagaagg acugggaccc gaagaaguac ggaggauucg acagcccgac agucgcauac 3420

agcguccugg ucgucgcaaa ggucgaaaag ggaaagagca agaagcugaa gagcgucaag 3480

gaacugcugg gaaucacaau cauggaaaga agcagcuucg aaaagaaccc gaucgacuuc 3540

cuggaagcaa agggauacaa ggaagucaag aaggaccuga ucaucaagcu gccgaaguac 3600

agccuguucg aacuggaaaa cggaagaaag agaaugcugg caagcgcagg agaacugcag 3660

aagggaaacg aacuggcacu gccgagcaag uacgucaacu uccuguaccu ggcaagccac 3720

uacgaaaagc ugaagggaag cccggaagac aacgaacaga agcagcuguu cgucgaacag 3780

cacaagcacu accuggacga aaucaucgaa cagaucagcg aauucagcaa gagagucauc 3840

cuggcagacg caaaccugga caagguccug agcgcauaca acaagcacag agacaagccg 3900

aucagagaac aggcagaaaa caucauccac cuguucacac ugacaaaccu gggagcaccg 3960

gcagcauuca aguacuucga cacaacaauc gacagaaaga gauacacaag cacaaaggaa 4020

guccuggacg caacacugau ccaccagagc aucacaggac uguacgaaac aagaaucgac 4080

cugagccagc ugggaggaga cggaggagga agcccgaaga agaagagaaa ggucccgaag 4140

aagaagagaa aggucggaag cggaagcccg aagaagaaga gaaaggucga cggaagcccg 4200

aagaagaaga gaaaggucga cagcgga 4227

<210> 225
<211> 1392
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de aminoácidos de la nickasa Cas9 con dos señales de localización nuclear como los aminoácidos C-terminales

<400> 225

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Ala Ile Gly Thr Asn Ser Val
1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
210 215 220

Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
225 230 235 240

Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
245 250 255

Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
260 265 270

Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
275 280 285

Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
325 330 335

Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
340 345 350

Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
355 360 365

Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
370 375 380

Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
405 410 415

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
675 680 685

Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
690 695 700

Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
705 710 715 720

His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
1160 1165 1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
1175 1180 1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly
1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val
1220 1225 1230

Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys
1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys
1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala
1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn
1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala
1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser
1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr
1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
1355 1360 1365

Gly Ser Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Asp Gly Ser Pro
1370 1375 1380

Lys Lys Lys Arg Lys Val Asp Ser Gly
1385 1390

<210> 226
<211> 4179
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF del ARNm de la nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 25 que usa codones de mínima uridina como se enumeran en la Tabla 3, sin codones de inicio y parada

<400> 226
auggacaaga aguacagcau cggacuggca aucggaacaa acagcgucgg augggcaguc 60

aucacagacg aauacaaggu cccgagcaag aaguucaagg uccugggaaa cacagacaga 120

cacagcauca agaagaaccu gaucggagca cugcuguucg acagcggaga aacagcagaa 180

gcaacaagac ugaagagaac agcaagaaga agauacacaa gaagaaagaa cagaaucugc 240

uaccugcagg aaaucuucag caacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccacaga 300

cuggaagaaa gcuuccuggu cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gaucuucgga 360

aacaucgucg acgaagucgc auaccacgaa aaguacccga caaucuacca ccugagaaag 420

aagcuggucg acagcacaga caaggcagac cugagacuga ucuaccuggc acuggcacac 480

augaucaagu ucagaggaca cuuccugauc gaaggagacc ugaacccgga caacagcgac 540

gucgacaagc uguucaucca gcugguccag acauacaacc agcuguucga agaaaacccg 600

aucaacgcaa gcggagucga cgcaaaggca auccugagcg caagacugag caagagcaga 660

agacuggaaa accugaucgc acagcugccg ggagaaaaga agaacggacu guucggaaac 720

cugaucgcac ugagccuggg acugacaccg aacuucaaga gcaacuucga ccuggcagaa 780

gacgcaaagc ugcagcugag caaggacaca uacgacgacg accuggacaa ccugcuggca 840

cagaucggag accaguacgc agaccuguuc cuggcagcaa agaaccugag cgacgcaauc 900

cugcugagcg acauccugag agucaacaca gaaaucacaa aggcaccgcu gagcgcaagc 960

augaucaaga gauacgacga acaccaccag gaccugacac ugcugaaggc acuggucaga 1020

cagcagcugc cggaaaagua caaggaaauc uucuucgacc agagcaagaa cggauacgca 1080

ggauacaucg acggaggagc aagccaggaa gaauucuaca aguucaucaa gccgauccug 1140

gaaaagaugg acggaacaga agaacugcug gucaagcuga acagagaaga ccugcugaga 1200

aagcagagaa cauucgacaa cggaagcauc ccgcaccaga uccaccuggg agaacugcac 1260

gcaauccuga gaagacagga agacuucuac ccguuccuga aggacaacag agaaaagauc 1320

gaaaagaucc ugacauucag aaucccguac uacgucggac cgcuggcaag aggaaacagc 1380

agauucgcau ggaugacaag aaagagcgaa gaaacaauca caccguggaa cuucgaagaa 1440

gucgucgaca agggagcaag cgcacagagc uucaucgaaa gaaugacaaa cuucgacaag 1500

aaccugccga acgaaaaggu ccugccgaag cacagccugc uguacgaaua cuucacaguc 1560

uacaacgaac ugacaaaggu caaguacguc acagaaggaa ugagaaagcc ggcauuccug 1620

agcggagaac agaagaaggc aaucgucgac cugcuguuca agacaaacag aaaggucaca 1680

gucaagcagc ugaaggaaga cuacuucaag aagaucgaau gcuucgacag cgucgaaauc 1740

agcggagucg aagacagauu caacgcaagc cugggaacau accacgaccu gcugaagauc 1800

aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgaa gaaaacgaag acauccugga agacaucguc 1860

cugacacuga cacuguucga agacagagaa augaucgaag aaagacugaa gacauacgca 1920

caccuguucg acgacaaggu caugaagcag cugaagagaa gaagauacac aggaugggga 1980

agacugagca gaaagcugau caacggaauc agagacaagc agagcggaaa gacaauccug 2040

gacuuccuga agagcgacgg auucgcaaac agaaacuuca ugcagcugau ccacgacgac 2100

agccugacau ucaaggaaga cauccagaag gcacagguca gcggacaggg agacagccug 2160

cacgaacaca ucgcaaaccu ggcaggaagc ccggcaauca agaagggaau ccugcagaca 2220

gucaaggucg ucgacgaacu ggucaagguc augggaagac acaagccgga aaacaucguc 2280

aucgaaaugg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga 2340

augaagagaa ucgaagaagg aaucaaggaa cugggaagcc agauccugaa ggaacacccg 2400

gucgaaaaca cacagcugca gaacgaaaag cuguaccugu acuaccugca gaacggaaga 2460

gacauguacg ucgaccagga acuggacauc aacagacuga gcgacuacga cgucgaccac 2520

aucgucccgc agagcuuccu gaaggacgac agcaucgaca acaagguccu gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaaagag cgacaacguc ccgagcgaag aagucgucaa gaagaugaag 2640

aacuacugga gacagcugcu gaacgcaaag cugaucacac agagaaaguu cgacaaccug 2700

acaaaggcag agagaggagg acugagcgaa cuggacaagg caggauucau caagagacag 2760

cuggucgaaa caagacagau cacaaagcac gucgcacaga uccuggacag cagaaugaac 2820

acaaaguacg acgaaaacga caagcugauc agagaaguca aggucaucac acugaagagc 2880

aagcugguca gcgacuucag aaaggacuuc caguucuaca aggucagaga aaucaacaac 2940

uaccaccacg cacacgacgc auaccugaac gcagucgucg gaacagcacu gaucaagaag 3000

uacccgaagc uggaaagcga auucgucuac ggagacuaca aggucuacga cgucagaaag 3060

augaucgcaa agagcgaaca ggaaaucgga aaggcaacag caaaguacuu cuucuacagc 3120

aacaucauga acuucuucaa gacagaaauc acacuggcaa acggagaaau cagaaagaga 3180

ccgcugaucg aaacaaacgg agaaacagga gaaaucgucu gggacaaggg aagagacuuc 3240

gcaacaguca gaaagguccu gagcaugccg caggucaaca ucgucaagaa gacagaaguc 3300

cagacaggag gauucagcaa ggaaagcauc cugccgaaga gaaacagcga caagcugauc 3360

gcaagaaaga aggacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgacagccc gacagucgca 3420

uacagcgucc uggucgucgc aaaggucgaa aagggaaaga gcaagaagcu gaagagcguc 3480

aaggaacugc ugggaaucac aaucauggaa agaagcagcu ucgaaaagaa cccgaucgac 3540

uuccuggaag caaagggaua caaggaaguc aagaaggacc ugaucaucaa gcugccgaag 3600

uacagccugu ucgaacugga aaacggaaga aagagaaugc uggcaagcgc aggagaacug 3660

cagaagggaa acgaacuggc acugccgagc aaguacguca acuuccugua ccuggcaagc 3720

cacuacgaaa agcugaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagcu guucgucgaa 3780

cagcacaagc acuaccugga cgaaaucauc gaacagauca gcgaauucag caagagaguc 3840

auccuggcag acgcaaaccu ggacaagguc cugagcgcau acaacaagca cagagacaag 3900

ccgaucagag aacaggcaga aaacaucauc caccuguuca cacugacaaa ccugggagca 3960

ccggcagcau ucaaguacuu cgacacaaca aucgacagaa agagauacac aagcacaaag 4020

gaaguccugg acgcaacacu gauccaccag agcaucacag gacuguacga aacaagaauc 4080

gaccugagcc agcugggagg agacggaagc ggaagcccga agaagaagag aaaggucgac 4140

ggaagcccga agaagaagag aaaggucgac agcggauag 4179

<210> 227
<211> 4173
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de codificación de la nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 25 que usa codones de mínima uridina (sin codones de inicio y parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)

<400> 227
gacaagaagu acagcaucgg acuggcaauc ggaacaaaca gcgucggaug ggcagucauc 60

acagacgaau acaaggcccc gagcaagaag uucaaggucc ugggaaacac agacagacac 120

agcaucaaga agaaccugau cggagcacug cuguucgaca gcggagaaac agcagaagca 180

acaagacuga agagaacagc aagaagaaga uacacaagaa gaaagaacag aaucugcuac 240

cugcaggaaa ucuucagcaa cgaaauggca aaggucgacg acagcuucuu ccacagacug 300

gaagaaagcu uccuggucga agaagacaag aagcacgaaa gacacccgau cuucggaaac 360

aucgucgacg aagucgcaua ccacgaaaag uacccgacaa ucuaccaccu gagaaagaag 420

cuggucgaca gcacagacaa ggcagaccug agacugaucu accuggcacu ggcacacaug 480

aucaaguuca gaggacacuu ccugaucgaa ggagaccuga acccggacaa cagcgacguc 540

gacaagcugu ucauccagcu gguccagaca uacaaccagc uguucgaaga aaacccgauc 600

aacgcaagcg gagucgacgc aaaggcaauc cugagcgcaa gacugagcaa gagcagaaga 660

cuggaaaacc ugaucgcaca gcugccggga gaaaagaaga acggacuguu cggaaaccug 720

aucgcacuga gccuggggacu gacaccgaac uucaagagca acuucgaccu ggcagaagac 780

gcaaagcugc agcugagcaa ggacacauac gacgacgacc uggacaaccu gcuggcacag 840

aucggagacc aguacgcaga ccuguuccug gcagcaaaga accugagcga cgcaauccug 900

cugagcgaca uccugagagu caacacagaa aucacaaagg caccgcugag cgcaagcaug 960

aucaagagau acgacgaaca ccaccaggac cugacacugc ugaaggcacu ggucagacag 1020

cagcugccgg aaaaguacaa ggaaaucuuc uucgaccaga gcaagaacgg auacgcagga 1080

uacaucgacg gaggagcaag ccaggaagaa uucuacaagu ucaucaagcc gauccuggaa 1140

aagauggacg gaacagaaga acugcugguc aagcugaaca gagaagaccu gcugagaaag 1200

cagagaacau ucgacaacgg aagcaucccg caccagaucc accugggaga acugcacgca 1260

auccugagaa gacaggaaga cuucuacccg uuccugaagg acaacagaga aaagaucgaa 1320

aagauccuga cauucagaau cccguacuac gucggaccgc uggcaagagg aaacagcaga 1380

uucgcaugga ugacaagaaa gagcgaagaa acaaucacac cguggaacuu cgaagaaguc 1440

gucgacaagg gagcaagcgc acagagcuuc aucgaaagaa ugacaaacuu cgacaagaac 1500

cugccgaacg aaaagguccu gccgaagcac agccugcugu acgaauacuu cacagucuac 1560

aacgaacuga caaaggucaa guacgucaca gaaggaauga gaaagccggc auuccugagc 1620

ggagaacaga agaaggcaau cgucgaccug cuguucaaga caaacagaaa ggucacaguc 1680

aagcagcuga aggaagacua cuucaagaag aucgaaugcu ucgacagcgu cgaaaucagc 1740

ggagucgaag acagauucaa cgcaagccug ggaacauacc acgaccugcu gaagaucauc 1800

aaggacaagg acuuccugga caacgaagaa aacgaagaca uccuggaaga caucguccug 1860

acacugacac uguucgaaga cagagaaaug aucgaagaaa gacugaagac auacgcacac 1920

cuguucgacg acaaggucau gaagcagcug aagagaagaa gauacacagg auggggaaga 1980

cugagcagaa agcugaucaa cggaaucaga gacaagcaga gcggaaagac aauccuggac 2040

uuccugaaga gcgacggauu cgcaaacaga aacuucaugc agcugaucca cgacgacagc 2100

cugacauuca aggaagacau ccagaaggca caggucagcg gacagggaga cagccugcac 2160

gaacacaucg caaaccuggc aggaagcccg gcaaucaaga agggaauccu gcagacaguc 2220

aaggucgucg acgaacuggu caaggucaug ggaagacaca agccggaaaa caucgucauc 2280

gaaauggcaa gagaaaacca gacaacacag aagggacaga agaacagcag agaaagaaug 2340

aagagaaucg aagaaggaau caaggaacug ggaagccaga uccugaagga acacccgguc 2400

gaaaacacac agcugcagaa cgaaaagcug uaccuguacu accugcagaa cggaagagac 2460

auguacgucg accaggaacu ggacaucaac agacugagcg acuacgacgu cgaccacauc 2520

gucccgcaga gcuuccugaa ggacgacagc aucgacaaca agguccugac aagaagcgac 2580

aagaacagag gaaagagcga caacgucccg agcgaagaag ucgucaagaa gaugaagaac 2640

uacuggagac agcugcugaa cgcaaagcug aucacacaga gaaaguucga caaccugaca 2700

aaggcagaga gaggaggacu gagcgaacug gacaaggcag gauucaucaa gagacagcug 2760

gucgaaacaa gacagaucac aaagcacguc gcacagaucc uggacagcag aaugaacaca 2820

aaguacgacg aaaacgacaa gcugaucaga gaagucaagg ucaucacacu gaagagcaag 2880

cuggucagcg acuucagaaa ggacuuccag uucuacaagg ucagagaaau caacaacuac 2940

caccacgcac acgacgcaua ccugaacgca gucgucggaa cagcacugau caagaaguac 3000

ccgaagcugg aaagcgaauu cgucuacgga gacuacaagg ucuacgacgu cagaaagaug 3060

aucgcaaaga gcgaacagga aaucggaaag gcaacagcaa aguacuucuu cuacagcaac 3120

aucaugaacu ucuucaagac agaaaucaca cuggcaaacg gagaaaucag aaagagaccg 3180

cugaucgaaa caaacggaga aacaggagaa aucgucuggg acaagggaag agacuucgca 3240

acagucagaa agguccugag caugccgcag gucaacaucg ucaagaagac agaaguccag 3300

acaggaggau ucagcaagga aagcauccug ccgaagagaa acagcgacaa gcugaucgca 3360

agaaagaagg acugggaccc gaagaaguac ggaggauucg acagcccgac agucgcauac 3420

agcguccugg ucgucgcaaa ggucgaaaag ggaaagagca agaagcugaa gagcgucaag 3480

gaacugcugg gaaucacaau cauggaaaga agcagcuucg aaaagaaccc gaucgacuuc 3540

cuggaagcaa agggauacaa ggaagucaag aaggaccuga ucaucaagcu gccgaaguac 3600

agccuguucg aacuggaaaa cggaagaaag agaaugcugg caagcgcagg agaacugcag 3660

aagggaaacg aacuggcacu gccgagcaag uacgucaacu uccuguaccu ggcaagccac 3720

uacgaaaagc ugaagggaag cccggaagac aacgaacaga agcagcuguu cgucgaacag 3780

cacaagcacu accuggacga aaucaucgaa cagaucagcg aauucagcaa gagagucauc 3840

cuggcagacg caaaccugga caagguccug agcgcauaca acaagcacag agacaagccg 3900

aucagagaac aggcagaaaa caucauccac cuguucacac ugacaaaccu gggagcaccg 3960

gcagcauuca aguacuucga cacaacaauc gacagaaaga gauacacaag cacaaaggaa 4020

guccuggacg caacacugau ccaccagagc aucacaggac uguacgaaac aagaaucgac 4080

cugagccagc ugggaggaga cggaagcgga agcccgaaga agaagagaaa ggucgacgga 4140

agcccgaaga agaagagaaa ggucgacagc gga 4173

<210> 228
<211> 1392
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: Secuencia de aminoácidos de dCas9 con dos señales de localización nuclear como los aminoácidos C-terminales

<400> 228

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Ala Ile Gly Thr Asn Ser Val
1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
210 215 220

Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
225 230 235 240

Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
245 250 255

Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
260 265 270

Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
275 280 285

Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
290 295 300

Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
305 310 315 320

Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
325 330 335

Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
340 345 350

Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
355 360 365

Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
370 375 380

Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
405 410 415

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
420 425 430

Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
675 680 685

Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
690 695 700

Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
705 710 715 720

His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp Ala Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
1160 1165 1170

Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
1175 1180 1185

Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly
1205 1210 1215

Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val
1220 1225 1230

Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
1235 1240 1245

Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys
1250 1255 1260

His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys
1265 1270 1275

Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala
1280 1285 1290

Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn
1295 1300 1305

Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala
1310 1315 1320

Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser
1325 1330 1335

Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr
1340 1345 1350

Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
1355 1360 1365

Gly Ser Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Asp Gly Ser Pro
1370 1375 1380

Lys Lys Lys Arg Lys Val Asp Ser Gly
1385 1390

<210> 229
<211> 4179
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF del ARNm de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 228 que usa codones de mínima uridina, con codones de inicio y parada

<400> 229
auggacaaga aguacagcau cggacuggca aucggaacaa acagcgucgg augggcaguc 60

aucacagacg aauacaaggu cccgagcaag aaguucaagg uccugggaaa cacagacaga 120

cacagcauca agaagaaccu gaucggagca cugcuguucg acagcggaga aacagcagaa 180

gcaacaagac ugaagagaac agcaagaaga agauacacaa gaagaaagaa cagaaucugc 240

uaccugcagg aaaucuucag caacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccacaga 300

cuggaagaaa gcuuccuggu cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gaucuucgga 360

aacaucgucg acgaagucgc auaccacgaa aaguacccga caaucuacca ccugagaaag 420

aagcuggucg acagcacaga caaggcagac cugagacuga ucuaccuggc acuggcacac 480

augaucaagu ucagaggaca cuuccugauc gaaggagacc ugaacccgga caacagcgac 540

gucgacaagc uguucaucca gcugguccag acauacaacc agcuguucga agaaaacccg 600

aucaacgcaa gcggagucga cgcaaaggca auccugagcg caagacugag caagagcaga 660

agacuggaaa accugaucgc acagcugccg ggagaaaaga agaacggacu guucggaaac 720

cugaucgcac ugagccuggg acugacaccg aacuucaaga gcaacuucga ccuggcagaa 780

gacgcaaagc ugcagcugag caaggacaca uacgacgacg accuggacaa ccugcuggca 840

cagaucggag accaguacgc agaccuguuc cuggcagcaa agaaccugag cgacgcaauc 900

cugcugagcg acauccugag agucaacaca gaaaucacaa aggcaccgcu gagcgcaagc 960

augaucaaga gauacgacga acaccaccag gaccugacac ugcugaaggc acuggucaga 1020

cagcagcugc cggaaaagua caaggaaauc uucuucgacc agagcaagaa cggauacgca 1080

ggauacaucg acggaggagc aagccaggaa gaauucuaca aguucaucaa gccgauccug 1140

gaaaagaugg acggaacaga agaacugcug gucaagcuga acagagaaga ccugcugaga 1200

aagcagagaa cauucgacaa cggaagcauc ccgcaccaga uccaccuggg agaacugcac 1260

gcaauccuga gaagacagga agacuucuac ccguuccuga aggacaacag agaaaagauc 1320

gaaaagaucc ugacauucag aaucccguac uacgucggac cgcuggcaag aggaaacagc 1380

agauucgcau ggaugacaag aaagagcgaa gaaacaauca caccguggaa cuucgaagaa 1440

gucgucgaca agggagcaag cgcacagagc uucaucgaaa gaaugacaaa cuucgacaag 1500

aaccugccga acgaaaaggu ccugccgaag cacagccugc uguacgaaua cuucacaguc 1560

uacaacgaac ugacaaaggu caaguacguc acagaaggaa ugagaaagcc ggcauuccug 1620

agcggagaac agaagaaggc aaucgucgac cugcuguuca agacaaacag aaaggucaca 1680

gucaagcagc ugaaggaaga cuacuucaag aagaucgaau gcuucgacag cgucgaaauc 1740

agcggagucg aagacagauu caacgcaagc cugggaacau accacgaccu gcugaagauc 1800

aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgaa gaaaacgaag acauccugga agacaucguc 1860

cugacacuga cacuguucga agacagagaa augaucgaag aaagacugaa gacauacgca 1920

caccuguucg acgacaaggu caugaagcag cugaagagaa gaagauacac aggaugggga 1980

agacugagca gaaagcugau caacggaauc agagacaagc agagcggaaa gacaauccug 2040

gacuuccuga agagcgacgg auucgcaaac agaaacuuca ugcagcugau ccacgacgac 2100

agccugacau ucaaggaaga cauccagaag gcacagguca gcggacaggg agacagccug 2160

cacgaacaca ucgcaaaccu ggcaggaagc ccggcaauca agaagggaau ccugcagaca 2220

gucaaggucg ucgacgaacu ggucaagguc augggaagac acaagccgga aaacaucguc 2280

aucgaaaugg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga 2340

augaagagaa ucgaagaagg aaucaaggaa cugggaagcc agauccugaa ggaacacccg 2400

gucgaaaaca cacagcugca gaacgaaaag cuguaccugu acuaccugca gaacggaaga 2460

gacauguacg ucgaccagga acuggacauc aacagacuga gcgacuacga cgucgacgca 2520

aucgucccgc agagcuuccu gaaggacgac agcaucgaca acaagguccu gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaaagag cgacaacguc ccgagcgaag aagucgucaa gaagaugaag 2640

aacuacugga gacagcugcu gaacgcaaag cugaucacac agagaaaguu cgacaaccug 2700

acaaaggcag agagaggagg acugagcgaa cuggacaagg caggauucau caagagacag 2760

cuggucgaaa caagacagau cacaaagcac gucgcacaga uccuggacag cagaaugaac 2820

acaaaguacg acgaaaacga caagcugauc agagaaguca aggucaucac acugaagagc 2880

aagcugguca gcgacuucag aaaggacuuc caguucuaca aggucagaga aaucaacaac 2940

uaccaccacg cacacgacgc auaccugaac gcagucgucg gaacagcacu gaucaagaag 3000

uacccgaagc uggaaagcga auucgucuac ggagacuaca aggucuacga cgucagaaag 3060

augaucgcaa agagcgaaca ggaaaucgga aaggcaacag caaaguacuu cuucuacagc 3120

aacaucauga acuucuucaa gacagaaauc acacuggcaa acggagaaau cagaaagaga 3180

ccgcugaucg aaacaaacgg agaaacagga gaaaucgucu gggacaaggg aagagacuuc 3240

gcaacaguca gaaagguccu gagcaugccg caggucaaca ucgucaagaa gacagaaguc 3300

cagacaggag gauucagcaa ggaaagcauc cugccgaaga gaaacagcga caagcugauc 3360

gcaagaaaga aggacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgacagccc gacagucgca 3420

uacagcgucc uggucgucgc aaaggucgaa aagggaaaga gcaagaagcu gaagagcguc 3480

aaggaacugc ugggaaucac aaucauggaa agaagcagcu ucgaaaagaa cccgaucgac 3540

uuccuggaag caaagggaua caaggaaguc aagaaggacc ugaucaucaa gcugccgaag 3600

uacagccugu ucgaacugga aaacggaaga aagagaaugc uggcaagcgc aggagaacug 3660

cagaagggaa acgaacuggc acugccgagc aaguacguca acuuccugua ccuggcaagc 3720

cacuacgaaa agcugaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagcu guucgucgaa 3780

cagcacaagc acuaccugga cgaaaucauc gaacagauca gcgaauucag caagagaguc 3840

auccuggcag acgcaaaccu ggacaaggguc cugagcgcau acaacaagca cagagacaag 3900

ccgaucagag aacaggcaga aaacaucauc caccuguuca cacugacaaa ccugggagca 3960

ccggcagcau ucaaguacuu cgacacaaca aucgacagaa agagauacac aagcacaaag 4020

gaaguccugg acgcaacacu gauccaccag agcaucacag gacuguacga aacaagaauc 4080

gaccugagcc agcugggagg agacggaagc ggaagcccga agaagaagag aaaggucgac 4140

ggaagcccga agaagaagag aaaggucgac agcggauag 4179

<210> 230
<211> 4173
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de codifiación de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 228 que usa codones de mínima uridina (sin codones de inicio y parada; adecuada para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)

<400> 230
gacaagaagu acagcaucgg acuggcaauc ggaacaaaca gcgucggaug ggcagucauc 60

acagacgaau acaaggaccc gagcaagaag uucaaggucc ugggaaacac agacagacac 120

agcaucaaga agaaccugau cggagcacug cuguucgaca gcggagaaac agcagaagca 180

acaagacuga agagaacagc aagaagaaga uacacaagaa gaaagaacag aaucugcuac 240

cugcaggaaa ucuucagcaa cgaaauggca aaggucgacg acagcuucuu ccacagacug 300

gaagaaagcu uccuggucga agaagacaag aagcacgaaa gacacccgau cuucggaaac 360

aucgucgacg aagucgcaua ccacgaaaag uacccgacaa ucuaccaccu gagaaagaag 420

cuggucgaca gcacagacaa ggcagaccug agacugaucu accuggcacu ggcacacaug 480

aucaaguuca gaggacacuu ccugaucgaa ggagaccuga acccggacaa cagcgacguc 540

gacaagcugu ucauccagcu gguccagaca uacaaccagc uguucgaaga aaacccgauc 600

aacgcaagcg gagucgacgc aaaggcaauc cugagcgcaa gacugagcaa gagcagaaga 660

cuggaaaacc ugaucgcaca gcugccggga gaaaagaaga acggacuguu cggaaaccug 720

aucgcacuga gccuggggacu gacaccgaac uucaagagca acuucgaccu ggcagaagac 780

gcaaagcugc agcugagcaa ggacacauac gacgacgacc uggacaaccu gcuggcacag 840

aucggagacc aguacgcaga ccuguuccug gcagcaaaga accugagcga cgcaauccug 900

cugagcgaca uccugagagu caacacagaa aucacaaagg caccgcugag cgcaagcaug 960

aucaagagau acgacgaaca ccaccaggac cugacacugc ugaaggcacu ggucagacag 1020

cagcugccgg aaaaguacaa ggaaaucuuc uucgaccaga gcaagaacgg auacgcagga 1080

uacaucgacg gaggagcaag ccaggaagaa uucuacaagu ucaucaagcc gauccuggaa 1140

aagauggacg gaacagaaga acugcugguc aagcugaaca gagaagaccu gcugagaaag 1200

cagagaacau ucgacaacgg aagcaucccg caccagaucc accugggaga acugcacgca 1260

auccugagaa gacaggaaga cuucuacccg uuccugaagg acaacagaga aaagaucgaa 1320

aagauccuga cauucagaau cccguacuac gucggaccgc uggcaagagg aaacagcaga 1380

uucgcaugga ugacaagaaa gagcgaagaa acaaucacac cguggaacuu cgaagaaguc 1440

gucgacaagg gagcaagcgc acagagcuuc aucgaaagaa ugacaaacuu cgacaagaac 1500

cugccgaacg aaaagguccu gccgaagcac agccugcugu acgaauacuu cacagucuac 1560

aacgaacuga caaaggucaa guacgucaca gaaggaauga gaaagccggc auuccugagc 1620

ggagaacaga agaaggcaau cgucgaccug cuguucaaga caaacagaaa ggucacaguc 1680

aagcagcuga aggaagacua cuucaagaag aucgaaugcu ucgacagcgu cgaaaucagc 1740

ggagucgaag acagauucaa cgcaagccug ggaacauacc acgaccugcu gaagaucauc 1800

aaggacaagg acuuccugga caacgaagaa aacgaagaca uccuggaaga caucguccug 1860

acacugacac uguucgaaga cagagaaaug aucgaagaaa gacugaagac auacgcacac 1920

cuguucgacg acaaggucau gaagcagcug aagagaagaa gauacacagg auggggaaga 1980

cugagcagaa agcugaucaa cggaaucaga gacaagcaga gcggaaagac aauccuggac 2040

uuccugaaga gcgacggauu cgcaaacaga aacuucaugc agcugaucca cgacgacagc 2100

cugacauuca aggaagacau ccagaaggca caggucagcg gacagggaga cagccugcac 2160

gaacacaucg caaaccuggc aggaagcccg gcaaucaaga agggaauccu gcagacaguc 2220

aaggucgucg acgaacuggu caaggucaug ggaagacaca agccggaaaa caucgucauc 2280

gaaauggcaa gagaaaacca gacaacacag aagggacaga agaacagcag agaaagaaug 2340

aagagaaucg aagaaggaau caaggaacug ggaagccaga uccugaagga acacccgguc 2400

gaaaacacac agcugcagaa cgaaaagcug uaccuguacu accugcagaa cggaagagac 2460

auguacgucg accaggaacu ggacaucaac agacugagcg acuacgacgu cgacgcaauc 2520

gucccgcaga gcuuccugaa ggacgacagc aucgacaaca agguccugac aagaagcgac 2580

aagaacagag gaaagagcga caacgucccg agcgaagaag ucgucaagaa gaugaagaac 2640

uacuggagac agcugcugaa cgcaaagcug aucacacaga gaaaguucga caaccugaca 2700

aaggcagaga gaggaggacu gagcgaacug gacaaggcag gauucaucaa gagacagcug 2760

gucgaaacaa gacagaucac aaagcacguc gcacagaucc uggacagcag aaugaacaca 2820

aaguacgacg aaaacgacaa gcugaucaga gaagucaagg ucaucacacu gaagagcaag 2880

cuggucagcg acuucagaaa ggacuuccag uucuacaagg ucagagaaau caacaacuac 2940

caccacgcac acgacgcaua ccugaacgca gucgucggaa cagcacugau caagaaguac 3000

ccgaagcugg aaagcgaauu cgucuacgga gacuacaagg ucuacgacgu cagaaagaug 3060

aucgcaaaga gcgaacagga aaucggaaag gcaacagcaa aguacuucuu cuacagcaac 3120

aucaugaacu ucuucaagac agaaaucaca cuggcaaacg gagaaaucag aaagagaccg 3180

cugaucgaaa caaacggaga aacaggagaa aucgucuggg acaagggaag agacuucgca 3240

acagucagaa agguccugag caugccgcag gucaacaucg ucaagaagac agaaguccag 3300

acaggaggau ucagcaagga aagcauccug ccgaagagaa acagcgacaa gcugaucgca 3360

agaaagaagg acugggaccc gaagaaguac ggaggauucg acagcccgac agucgcauac 3420

agcguccugg ucgucgcaaa ggucgaaaag ggaaagagca agaagcugaa gagcgucaag 3480

gaacugcugg gaaucacaau cauggaaaga agcagcuucg aaaagaaccc gaucgacuuc 3540

cuggaagcaa agggauacaa ggaagucaag aaggaccuga ucaucaagcu gccgaaguac 3600

agccuguucg aacuggaaaa cggaagaaag agaaugcugg caagcgcagg agaacugcag 3660

aagggaaacg aacuggcacu gccgagcaag uacgucaacu uccuguaccu ggcaagccac 3720

uacgaaaagc ugaagggaag cccggaagac aacgaacaga agcagcuguu cgucgaacag 3780

cacaagcacu accuggacga aaucaucgaa cagaucagcg aauucagcaa gagagucauc 3840

cuggcagacg caaaccugga caagguccug agcgcauaca acaagcacag agacaagccg 3900

aucagagaac aggcagaaaa caucauccac cuguucacac ugacaaaccu gggagcaccg 3960

gcagcauuca aguacuucga cacaacaauc gacagaaaga gauacacaag cacaaaggaa 4020

guccuggacg caacacugau ccaccagagc aucacaggac uguacgaaac aagaaucgac 4080

cugagccagc ugggaggaga cggaagcgga agcccgaaga agaagagaaa ggucgacgga 4140

agcccgaaga agaagagaaa ggucgacagc gga 4173

<210> 231
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: Promotor T7

<400> 231
taatacgact cactata 17

<210> 232

<211> 50
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(50)
<223> Beta-globina humana 5 UTR

<400> 232
acatttgctt ctgacacaac tgtgttcact agcaacctca aacagacacc 50

<210> 233
<211> 132
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(132)
<223> Beta-globina humana 3 UTR

<400> 233
gctcgctttc ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt tgttccctaa gtccaactac 60

taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat tctgcctaat aaaaaacatt 120

tattttcatt gc 132

<210> 234
<211> 66
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(66)
<223> Alfa-globina humana 5 UTR

<400> 234
cataaaccct ggcgcgctcg cggcccggca ctcttctggt ccccacagac tcagagagaa 60

cccacc 66

<210> 235
<211> 110
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(110)
<223> Alfa-globina humana 3 UTR

<400> 235
gctggagcct cggtggccat gcttcttgcc ccttgggcct ccccccagcc cctcctcccc 60

ttcctgcacc cgtacccccg tggtctttga ataaagtctg agtgggcggc 110

<210> 236
<211> 29
<212> ADN
<213> Xenopus laevis

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(29)
<223> beta-globina 5 UTR de Xenopus laevis

<400> 236
aagctcagaa taaacgctca actttggcc 29

<210> 237
<211> 130
<212> ADN
<213> Xenopus laevis

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(130)
<223> beta-globina 3’ UTR de Xenopus laevis

<400> 237
accagcctca agaacacccg aatggagtct ctaagctaca taataccaac ttacacttta 60

caaaatgttg tccccccaaaa tgtagccatt cgtatctgct cctaataaaa agaaagtttc 120

ttcacattct 130

<210> 238
<211> 27
<212> ADN
<213> Bos taurus

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(27)
<223> Hormona de crecimiento bovina 5 UTR

<400> 238
cagggtcctg tggacagctc accagct 27

<210> 239
<211> 102
<212> ADN
<213> Bos taurus

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(102)
<223> Hormona de crecimiento bovina 3 UTR

<400> 239
ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac 60

tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg ca 102

<210> 240
<211> 93
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(93)
<223> Hemoglobina alfa de Mus musculus, cadena adulta 1 (Hba-a1), 3UTR

<400> 240
gctgccttct gcggggcttg ccttctggcc atgcccttct tctctccctt gcacctgtac 60

ctcttggtct ttgaataaag cctgagtagg aag 93

<210> 241
<211> 61
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: HSD17B4 5 UTR

<400> 241
tcccgcagtc ggcgtccagc ggctctgctt gttcgtgtgt gtgtcgttgc aggccttatt 60

c 61

<210> 242
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARN de guía única G282 dirigido al gen TTR de ratón

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<400> 242
uuacagccac gucuacagca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 243

<400> 243
000

<210> 244
<211> 4405
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con 5 UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, y 3 UTR de ALB

<400> 244
gggtcccgca gtcggcgtcc agcggctctg cttgttcgtg tgtgtgtcgt tgcaggcctt 60

attcggatcc atggacaaga agtacagcat cggactggac atcggaacaa acagcgtcgg 120

atgggcagtc atcacagacg aatacaaggt cccgagcaag aagttcaagg tcctgggaaa 180

cacagacaga cacagcatca agaagaacct gatcggagca ctgctgttcg acagcggaga 240

aacagcagaa gcaacaagac tgaagagaac agcaagaaga agatacacaa gaagaaagaa 300

cagaatctgc tacctgcagg aaatcttcag caacgaaatg gcaaaggtcg acgacagctt 360

cttccacaga ctggaagaaa gcttcctggt cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc 420

gatcttcgga aacatcgtcg acgaagtcgc ataccacgaa aagtacccga caatctacca 480

cctgagaaag aagctggtcg acagcacaga caaggcagac ctgagactga tctacctggc 540

actggcacac atgatcaagt tcagaggaca cttcctgatc gaaggagacc tgaacccgga 600

caacagcgac gtcgacaagc tgttcatcca gctggtccag acatacaacc agctgttcga 660

agaaaacccg atcaacgcaa gcggagtcga cgcaaaggca atcctgagcg caagactgag 720

caagagcaga agactggaaa acctgatcgc acagctgccg ggagaaaaga agaacggact 780

gttcggaaac ctgatcgcac tgagcctggg actgacaccg aacttcaaga gcaacttcga 840

cctggcagaa gacgcaaagc tgcagctgag caaggacaca tacgacgacg acctggacaa 900

cctgctggca cagatcggag accagtacgc agacctgttc ctggcagcaa agaacctgag 960

cgacgcaatc ctgctgagcg acatcctgag agtcaacaca gaaatcacaa aggcaccgct 1020

gagcgcaagc atgatcaaga gatacgacga acaccaccag gacctgacac tgctgaaggc 1080

actggtcaga cagcagctgc cggaaaagta caaggaaatc ttcttcgacc agagcaagaa 1140

cggatacgca ggatacatcg acggaggagc aagccaggaa gaattctaca agttcatcaa 1200

gccgatcctg gaaaagatgg acggaacaga agaactgctg gtcaagctga acagagaaga 1260

cctgctgaga aagcagagaa cattcgacaa cggaagcatc ccgcaccaga tccacctggg 1320

agaactgcac gcaatcctga gaagacagga agacttctac ccgttcctga aggacaacag 1380

agaaaagatc gaaaagatcc tgacattcag aatcccgtac tacgtcggac cgctggcaag 1440

aggaaacagc agattcgcat ggatgacaag aaagagcgaa gaaacaatca caccgtggaa 1500

cttcgaagaa gtcgtcgaca agggagcaag cgcacagagc ttcatcgaaa gaatgacaaa 1560

cttcgacaag aacctgccga acgaaaaggt cctgccgaag cacagcctgc tgtacgaata 1620

cttcacagtc tacaacgaac tgacaaaggt caagtacgtc acagaaggaa tgagaaagcc 1680

ggcattcctg agcggagaac agaagaaggc aatcgtcgac ctgctgttca agacaaacag 1740

aaaggtcaca gtcaagcagc tgaaggaaga ctacttcaag aagatcgaat gcttcgacag 1800

cgtcgaaatc agcggagtcg aagacagatt caacgcaagc ctgggaacat accacgacct 1860

gctgaagatc atcaaggaca aggacttcct ggacaacgaa gaaaacgaag acatcctgga 1920

agacatcgtc ctgacactga cactgttcga agacagagaa atgatcgaag aaagactgaa 1980

gacatacgca cacctgttcg acgacaaggt catgaagcag ctgaagagaa gaagatacac 2040

aggatgggga agactgagca gaaagctgat caacggaatc agagacaagc agagcggaaa 2100

gacaatcctg gacttcctga agagcgacgg attcgcaaac agaaacttca tgcagctgat 2160

ccacgacgac agcctgacat tcaaggaaga catccagaag gcacaggtca gcggacaggg 2220

agacagcctg cacgaacaca tcgcaaacct ggcaggaagc ccggcaatca agaagggaat 2280

cctgcagaca gtcaaggtcg tcgacgaact ggtcaaggtc atgggaagac acaagccgga 2340

aaacatcgtc atcgaaatgg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag 2400

cagagaaaga atgaagagaa tcgaagaagg aatcaaggaa ctgggaagcc agatcctgaa 2460

ggaacacccg gtcgaaaaca cacagctgca gaacgaaaag ctgtacctgt actacctgca 2520

gaacggaaga gacatgtacg tcgaccagga actggacatc aacagactga gcgactacga 2580

cgtcgaccac atcgtcccgc agagcttcct gaaggacgac agcatcgaca acaaggtcct 2640

gacaagaagc gacaagaaca gaggaaagag cgacaacgtc ccgagcgaag aagtcgtcaa 2700

gaagatgaag aactactgga gacagctgct gaacgcaaag ctgatcacac agagaaagtt 2760

cgacaacctg acaaaggcag agagaggagg actgagcgaa ctggacaagg caggattcat 2820

caagagacag ctggtcgaaa caagacagat cacaaagcac gtcgcacaga tcctggacag 2880

cagaatgaac acaaagtacg acgaaaacga caagctgatc agagaagtca aggtcatcac 2940

actgaagagc aagctggtca gcgacttcag aaaggacttc cagttctaca aggtcagaga 3000

aatcaacaac taccaccacg cacacgacgc atacctgaac gcagtcgtcg gaacagcact 3060

gatcaagaag tacccgaagc tggaaagcga attcgtctac ggagactaca aggtctacga 3120

cgtcagaaag atgatcgcaa agagcgaaca ggaaatcgga aaggcaacag caaagtactt 3180

cttctacagc aacatcatga acttcttcaa gacagaaatc acactggcaa acggagaaat 3240

cagaaagaga ccgctgatcg aaacaaacgg agaaacagga gaaatcgtct gggacaaggg 3300

aagagacttc gcaacagtca gaaaggtcct gagcatgccg caggtcaaca tcgtcaagaa 3360

gacagaagtc cagacaggag gattcagcaa ggaaagcatc ctgccgaaga gaaacagcga 3420

caagctgatc gcaagaaaga aggactggga cccgaagaag tacggaggat tcgacagccc 3480

gacagtcgca tacagcgtcc tggtcgtcgc aaaggtcgaa aagggaaaga gcaagaagct 3540

gaagagcgtc aaggaactgc tgggaatcac aatcatggaa agaagcagct tcgaaaagaa 3600

cccgatcgac ttcctggaag caaagggata caaggaagtc aagaaggacc tgatcatcaa 3660

gctgccgaag tacagcctgt tcgaactgga aaacggaaga aagagaatgc tggcaagcgc 3720

aggagaactg cagaagggaa acgaactggc actgccgagc aagtacgtca acttcctgta 3780

cctggcaagc cactacgaaa agctgaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagct 3840

gttcgtcgaa cagcacaagc actacctgga cgaaatcatc gaacagatca gcgaattcag 3900

caagagagtc atcctggcag acgcaaacct ggacaaggtc ctgagcgcat acaacaagca 3960

cagagacaag ccgatcagag aacaggcaga aaacatcatc cacctgttca cactgacaaa 4020

cctgggagca ccggcagcat tcaagtactt cgacacaaca atcgacagaa agagatacac 4080

aagcacaaag gaagtcctgg acgcaacact gatccaccag agcatcacag gactgtacga 4140

aacaagaatc gacctgagcc agctgggagg agacggagga ggaagcccga agaagaagag 4200

aaaggtctag ctagccatca catttaaaag catctcagcc taccatgaga ataagagaaa 4260

gaaaatgaag atcaatagct tattcatctc ttttttctttt tcgttggtgt aaagccaaca 4320

ccctgtctaa aaaacataaa tttctttaat cattttgcct cttttctctg tgcttcaatt 4380

aataaaaaat ggaaagaacc tcgag 4405

<210> 245
<211> 4188
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF de Cas9 alternativo con 19.36 % de contenido de U

<400> 245
atggataaga agtactcgat cgggctggat atcggaacta attccgtggg ttgggcagtg 60

atcacggatg aatacaaagt gccgtccaag aagttcaagg tcctggggaa caccgataga 120

cacagcatca agaagaatct catcggagcc ctgctgtttg actccggcga aaccgcagaa 180

gcgacccggc tcaaacgtac cgcgaggcga cgctacaccc ggcggaagaa tcgcatctgc 240

tatctgcaag aaatcttttc gaacgaaatg gcaaaggtgg acgacagctt cttccaccgc 300

ctggaagaat ctttcctggt ggaggaggac aagaagcatg aacggcatcc tatctttgga 360

aacatcgtgg acgaagtggc gtaccacgaa aagtacccga ccatctacca tctgcggaag 420

aagttggttg actcaactga caaggccgac ctcagattga tctacttggc cctcgcccat 480

atgatcaaat tccgcggaca cttcctgatc gaaggcgatc tgaaccctga taactccgac 540

gtggataagc tgttcattca actggtgcag acctacaacc aactgttcga agaaaaccca 600

atcaatgcca gcggcgtcga tgccaaggcc atcctgtccg cccggctgtc gaagtcgcgg 660

cgcctcgaaa acctgatcgc acagctgccg ggagagaaga agaacggact tttcggcaac 720

ttgatcgctc tctcactggg actcactccc aatttcaagt ccaattttga cctggccgag 780

gacgcgaagc tgcaactctc aaaggacacc tacgacgacg acttggacaa tttgctggca 840

caaattggcg atcagtacgc ggatctgttc cttgccgcta agaacctttc ggacgcaatc 900

ttgctgtccg atatcctgcg cgtgaacacc gaaataacca aagcgccgct tagcgcctcg 960

atgattaagc ggtacgacga gcatcaccag gatctcacgc tgctcaaagc gctcgtgaga 1020

cagcaactgc ctgaaaagta caaggagatt ttcttcgacc agtccaagaa tgggtacgca 1080

gggtacatcg atggaggcgc cagccaggaa gagttctata agttcatcaa gccaatcctg 1140

gaaaagatgg acggaaccga agaactgctg gtcaagctga acagggagga tctgctccgc 1200

aaacagagaa cctttgacaa cggaagcatt ccacaccaga tccatctggg tgagctgcac 1260

gccatcttgc ggcgccagga ggacttttac ccattcctca aggacaaccg ggaaaagatc 1320

gagaaaattc tgacgttccg catcccgtat tacgtgggcc cactggcgcg cggcaattcg 1380

cgcttcgcgt ggatgactag aaaatcagag gaaaccatca ctccttggaa tttcgaggaa 1440

gttgtggata agggagcttc ggcacaatcc ttcatcgaac gaatgaccaa cttcgacaag 1500

aatctcccaa acgagaaggt gcttcctaag cacagcctcc tttacgaata cttcactgtc 1560

tacaacgaac tgactaaagt gaaatacgtt actgaaggaa tgaggaagcc ggcctttctg 1620

agcggagaac agaagaaagc gattgtcgat ctgctgttca agaccaaccg caaggtgacc 1680

gtcaagcagc ttaaagagga ctacttcaag aagatcgagt gtttcgactc agtggaaatc 1740

agcggagtgg aggacagatt caacgcttcg ctgggaacct atcatgatct cctgaagatc 1800

atcaaggaca aggacttcct tgacaacgag gagaacgagg acatcctgga agatatcgtc 1860

ctgaccttga ccctttttcga ggatcgcgag atgatcgagg agaggcttaa gacctacgct 1920

catctcttcg acgataaggt catgaaacaa ctcaagcgcc gccggtacac tggttggggc 1980

cgcctctccc gcaagctgat caacggtatt cgcgataaac agagcggtaa aactatcctg 2040

gatttcctca aatcggatgg cttcgctaat cgtaacttca tgcagttgat ccacgacgac 2100

agcctgacct ttaaggagga catccagaaa gcacaagtga gcggacaggg agactcactc 2160

catgaacaca tcgcgaatct ggccggttcg ccggcgatta agaagggaat cctgcaaact 2220

gtgaaggtgg tggacgagct ggtgaaggtc atgggacggc acaaaccgga gaatatcgtg 2280

attgaaatgg cccgagaaaa ccagactacc cagaagggcc agaagaactc ccgcgaaagg 2340

atgaagcgga tcgaagaagg aatcaaggag ctgggcagcc agatcctgaa agagcacccg 2400

gtggaaaaca cgcagctgca gaacgagaag ctctacctgt actatttgca aaatggacgg 2460

gacatgtacg tggaccaaga gctggacatc aatcggttgt ctgattacga cgtggaccac 2520

atcgttccac agtcctttct gaaggatgac tccatcgata acaaggtgtt gactcgcagc 2580

gacaagaaca gagggaagtc agataatgtg ccatcggagg aggtcgtgaa gaagatgaag 2640

aattactggc ggcagctcct gaatgcgaag ctgattaccc agagaaagtt tgacaatctc 2700

actaaagccg agcgcggcgg actctcagag ctggataagg ctggattcat caaacggcag 2760

ctggtcgaga ctcggcagat taccaagcac gtggcgcaga tcctggactc ccgcatgaac 2820

actaaatacg acgagaacga taagctcatc cgggaagtga aggtgattac cctgaaaagc 2880

aaacttgtgt cggactttcg gaaggacttt cagttttaca aagtgagaga aatcaacaac 2940

taccatcacg cgcatgacgc atacctcaac gctgtggtcg gcaccgccct gatcaagaag 3000

taccctaaac ttgaatcgga gtttgtgtac ggagactaca aggtctacga cgtgaggaag 3060

atgatagcca agtccgaaca ggaaatcggg aaagcaactg cgaaatactt cttttactca 3120

aacatcatga acttcttcaa gactgaaatt acgctggcca atggagaaat caggaagagg 3180

ccactgatcg aaactaacgg agaaacgggc gaaatcgtgt gggacaaggg cagggacttc 3240

gcaactgttc gcaaagtgct ctctatgccg caagtcaata ttgtgaagaa aaccgaagtg 3300

caaaccggcg gattttcaaa ggaatcgatc ctcccaaaga gaaatagcga caagctcatt 3360

gcacgcaaga aagactggga cccgaagaag tacggaggat tcgattcgcc gactgtcgca 3420

tactccgtcc tcgtggtggc caaggtggag aagggaaaga gcaagaagct caaatccgtc 3480

aaagagctgc tggggattac catcatggaa cgatcctcgt tcgagaagaa cccgattgat 3540

ttcctggagg cgaagggtta caaggaggtg aagaaggatc tgatcatcaa actgcccaag 3600

tactcactgt tcgaactgga aaatggtcgg aagcgcatgc tggcttcggc cggagaactc 3660

cagaaaggaa atgagctggc cttgcctagc aagtacgtca acttcctcta tcttgcttcg 3720

cactacgaga aactcaaagg gtcaccggaa gataacgaac agaagcagct tttcgtggag 3780

cagcacaagc attatctgga tgaaatcatc gaacaaatct ccgagttttc aaagcgcgtg 3840

atcctcgccg acgccaacct cgacaaagtc ctgtcggcct acaataagca tagagataag 3900

ccgatcagag aacaggccga gaacattatc cacttgttca ccctgactaa cctgggagct 3960

ccagccgcct tcaagtactt cgatactact atcgaccgca aaagatacac gtccaccaag 4020

gaagttctgg acgcgaccct gatccaccaa agcatcactg gactctacga aactaggatc 4080

gatctgtcgc agctgggtgg cgatggtggc ggtggatcct acccatacga cgtgcctgac 4140

tacgcctccg gaggtggtgg ccccaagaag aaacggaagg tgtgatag 4188

<210> 246
<211> 4459
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con 5 UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 245, secuencia de Kozak, y 3 UTR de ALB

<400> 246
gggtcccgca gtcggcgtcc agcggctctg cttgttcgtg tgtgtgtcgt tgcaggcctt 60

attcggatct gccaccatgg ataagaagta ctcgatcggg ctggatatcg gaactaattc 120

cgtgggttgg gcagtgatca cggatgaata caaagtgccg tccaagaagt tcaaggtcct 180

ggggaacacc gatagacaca gcatcaagaa gaatctcatc ggagccctgc tgtttgactc 240

cggcgaaacc gcagaagcga cccggctcaa acgtaccgcg aggcgacgct acacccggcg 300

gaagaatcgc atctgctatc tgcaagaaat cttttcgaac gaaatggcaa aggtggacga 360

cagcttcttc caccgcctgg aagaatcttt cctggtggag gaggacaaga agcatgaacg 420

gcatcctatc tttggaaaca tcgtggacga agtggcgtac cacgaaaagt acccgaccat 480

ctaccatctg cggaagaagt tggttgactc aactgacaag gccgacctca gattgatcta 540

cttggccctc gcccatatga tcaaattccg cggacacttc ctgatcgaag gcgatctgaa 600

ccctgataac tccgacgtgg ataagctgtt cattcaactg gtgcagacct acaaccaact 660

gttcgaagaa aacccaatca atgccagcgg cgtcgatgcc aaggccatcc tgtccgcccg 720

gctgtcgaag tcgcggcgcc tcgaaaacct gatcgcacag ctgccgggag agaagaagaa 780

cggacttttc ggcaacttga tcgctctctc actgggactc actcccaatt tcaagtccaa 840

ttttgacctg gccgaggacg cgaagctgca actctcaaag gacacctacg acgacgactt 900

ggacaatttg ctggcacaaa ttggcgatca gtacgcggat ctgttccttg ccgctaagaa 960

cctttcggac gcaatcttgc tgtccgatat cctgcgcgtg aacaccgaaa taaccaaagc 1020

gccgcttagc gcctcgatga ttaagcggta cgacgagcat caccaggatc tcacgctgct 1080

caaagcgctc gtgagacagc aactgcctga aaagtacaag gagattttct tcgaccagtc 1140

caagaatggg tacgcagggt acatcgatgg aggcgccagc caggaagagt tctataagtt 1200

catcaagcca atcctggaaa agatggacgg aaccgaagaa ctgctggtca agctgaacag 1260

ggaggatctg ctccgcaaac agagaacctt tgacaacgga agcattccac accagatcca 1320

tctgggtgag ctgcacgcca tcttgcggcg ccaggaggac ttttacccat tcctcaagga 1380

caaccgggaa aagatcgaga aaattctgac gttccgcatc ccgtattacg tgggcccact 1440

ggcgcgcggc aattcgcgct tcgcgtggat gactagaaaa tcagaggaaa ccatcactcc 1500

ttggaatttc gaggaagttg tggataaggg agcttcggca caatccttca tcgaacgaat 1560

gaccaacttc gacaagaatc tcccaaacga gaaggtgctt cctaagcaca gcctccttta 1620

cgaatacttc actgtctaca acgaactgac taaagtgaaa tacgttactg aaggaatgag 1680

gaagccggcc tttctgagcg gagaacagaa gaaagcgatt gtcgatctgc tgttcaagac 1740

caaccgcaag gtgaccgtca agcagcttaa agaggactac ttcaagaaga tcgagtgttt 1800

cgactcagtg gaaatcagcg gagtggagga cagattcaac gcttcgctgg gaacctatca 1860

tgatctcctg aagatcatca aggacaagga cttccttgac aacgaggaga acgaggacat 1920

cctggaagat atcgtcctga ccttgaccct tttcgaggat cgcgagatga tcgaggagag 1980

gcttaagacc tacgctcatc tcttcgacga taaggtcatg aaacaactca agcgccgccg 2040

gtacactggt tggggccgcc tctcccgcaa gctgatcaac ggtattcgcg ataaacagag 2100

cggtaaaact atcctggatt tcctcaaatc ggatggcttc gctaatcgta acttcatgca 2160

gttgatccac gacgacagcc tgacctttaa ggaggacatc cagaaagcac aagtgagcgg 2220

acagggagac tcactccatg aacacatcgc gaatctggcc ggttcgccgg cgattaagaa 2280

gggaatcctg caaactgtga aggtggtgga cgagctggtg aaggtcatgg gacggcacaa 2340

accggagaat atcgtgattg aaatggcccg agaaaaccag actacccaga agggccagaa 2400

gaactcccgc gaaaggatga agcggatcga agaaggaatc aaggagctgg gcagccagat 2460

cctgaaagag cacccggtgg aaaacacgca gctgcagaac gagaagctct acctgtacta 2520

tttgcaaaat ggacgggaca tgtacgtgga ccaagagctg gacatcaatc ggttgtctga 2580

ttacgacgtg gaccacatcg ttccacagtc ctttctgaag gatgactcca tcgataacaa 2640

ggtgttgact cgcagcgaca agaacagagg gaagtcagat aatgtgccat cggaggaggt 2700

cgtgaagaag atgaagaatt actggcggca gctcctgaat gcgaagctga ttacccagag 2760

aaagtttgac aatctcacta aagccgagcg cggcggactc tcagagctgg ataaggctgg 2820

attcatcaaa cggcagctgg tcgagactcg gcagattacc aagcacgtgg cgcagatcct 2880

ggactcccgc atgaacacta aatacgacga gaacgataag ctcatccggg aagtgaaggt 2940

gattaccctg aaaagcaaac ttgtgtcgga ctttcggaag gactttcagt tttacaaagt 3000

gagagaaatc aacaactacc atcacgcgca tgacgcatac ctcaacgctg tggtcggcac 3060

cgccctgatc aagaagtacc ctaaacttga atcggagttt gtgtacggag actacaaggt 3120

ctacgacgtg aggaagatga tagccaagtc cgaacaggaa atcgggaaag caactgcgaa 3180

atacttcttt tactcaaaca tcatgaactt cttcaagact gaaattacgc tggccaatgg 3240

agaaatcagg aagaggccac tgatcgaaac taacggagaa acgggcgaaa tcgtgtggga 3300

caagggcagg gacttcgcaa ctgttcgcaa agtgctctct atgccgcaag tcaatattgt 3360

gaagaaaacc gaagtgcaaa ccggcggatt ttcaaaggaa tcgatcctcc caaagagaaa 3420

tagcgacaag ctcattgcac gcaagaaaga ctgggacccg aagaagtacg gaggattcga 3480

ttcgccgact gtcgcatact ccgtcctcgt ggtggccaag gtggagaagg gaaagagcaa 3540

gaagctcaaa tccgtcaaag agctgctggg gattaccatc atggaacgat cctcgttcga 3600

gaagaacccg attgatttcc tggaggcgaa gggttacaag gaggtgaaga aggatctgat 3660

catcaaactg cccaagtact cactgttcga actggaaaat ggtcggaagc gcatgctggc 3720

ttcggccgga gaactccaga aaggaaatga gctggccttg cctagcaagt acgtcaactt 3780

cctctatctt gcttcgcact acgagaaact caaagggtca ccggaagata acgaacagaa 3840

gcagcttttc gtggagcagc acaagcatta tctggatgaa atcatcgaac aaatctccga 3900

gttttcaaag cgcgtgatcc tcgccgacgc caacctcgac aaagtcctgt cggcctacaa 3960

taagcataga gataagccga tcagagaaca ggccgagaac attatccact tgttcaccct 4020

gactaacctg ggagctccag ccgccttcaa gtacttcgat actactatcg accgcaaaag 4080

atacacgtcc accaaggaag ttctggacgc gaccctgatc caccaaagca tcactggact 4140

ctacgaaact aggatcgatc tgtcgcagct gggtggcgat ggtggcggtg gatcctaccc 4200

atacgacgtg cctgactacg cctccggagg tggtggcccc aagaagaaac ggaaggtgtg 4260

atagctagcc atcacattta aaagcatctc agcctaccat gagaataaga gaaagaaaat 4320

gaagatcaat agcttattca tctcttttttc tttttcgttg gtgtaaagcc aacaccctgt 4380

ctaaaaaaca taaatttctt taatcatttt gcctcttttc tctgtgcttc aattaataaa 4440

aaatggaaag aacctcgag 4459

<210> 247
<211> 4453
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con 5 UTR de HSD, ORF correspondiente de la SEQ ID NO: 245, y 3 UTR de ALB

<400> 247
gggtcccgca gtcggcgtcc agcggctctg cttgttcgtg tgtgtgtcgt tgcaggcctt 60

attcggatct atggataaga agtactcgat cgggctggat atcggaacta attccgtggg 120

ttgggcagtg atcacggatg aatacaaagt gccgtccaag aagttcaagg tcctggggaa 180

caccgataga cacagcatca agaagaatct catcggagcc ctgctgtttg actccggcga 240

aaccgcagaa gcgacccggc tcaaacgtac cgcgaggcga cgctacaccc ggcggaagaa 300

tcgcatctgc tatctgcaag aaatcttttc gaacgaaatg gcaaaggtgg acgacagctt 360

cttccaccgc ctggaagaat ctttcctggt ggaggaggac aagaagcatg aacggcatcc 420

tatctttgga aacatcgtgg acgaagtggc gtaccacgaa aagtacccga ccatctacca 480

tctgcggaag aagttggttg actcaactga caaggccgac ctcagattga tctacttggc 540

cctcgcccat atgatcaaat tccgcggaca cttcctgatc gaaggcgatc tgaaccctga 600

taactccgac gtggataagc tgttcattca actggtgcag acctacaacc aactgttcga 660

agaaaaccca atcaatgcca gcggcgtcga tgccaaggcc atcctgtccg cccggctgtc 720

gaagtcgcgg cgcctcgaaa acctgatcgc acagctgccg ggagagaaga agaacggact 780

tttcggcaac ttgatcgctc tctcactggg actcactccc aatttcaagt ccaattttga 840

cctggccgag gacgcgaagc tgcaactctc aaaggacacc tacgacgacg acttggacaa 900

tttgctggca caaattggcg atcagtacgc ggatctgttc cttgccgcta agaacctttc 960

ggacgcaatc ttgctgtccg atatcctgcg cgtgaacacc gaaataacca aagcgccgct 1020

tagcgcctcg atgattaagc ggtacgacga gcatcaccag gatctcacgc tgctcaaagc 1080

gctcgtgaga cagcaactgc ctgaaaagta caaggagatt ttcttcgacc agtccaagaa 1140

tgggtacgca gggtacatcg atggaggcgc cagccaggaa gagttctata agttcatcaa 1200

gccaatcctg gaaaagatgg acggaaccga agaactgctg gtcaagctga acagggagga 1260

tctgctccgc aaacagagaa cctttgacaa cggaagcatt ccacaccaga tccatctggg 1320

tgagctgcac gccatcttgc ggcgccagga ggacttttac ccattcctca aggacaaccg 1380

ggaaaagatc gagaaaattc tgacgttccg catcccgtat tacgtgggcc cactggcgcg 1440

cggcaattcg cgcttcgcgt ggatgactag aaaatcagag gaaaccatca ctccttggaa 1500

tttcgaggaa gttgtggata agggagcttc ggcacaatcc ttcatcgaac gaatgaccaa 1560

cttcgacaag aatctcccaa acgagaaggt gcttcctaag cacagcctcc tttacgaata 1620

cttcactgtc tacaacgaac tgactaaagt gaaatacgtt actgaaggaa tgaggaagcc 1680

ggcctttctg agcggagaac agaagaaagc gattgtcgat ctgctgttca agaccaaccg 1740

caaggtgacc gtcaagcagc ttaaagagga ctacttcaag aagatcgagt gtttcgactc 1800

agtggaaatc agcggagtgg aggacagatt caacgcttcg ctgggaacct atcatgatct 1860

cctgaagatc atcaaggaca aggacttcct tgacaacgag gagaacgagg acatcctgga 1920

agatatcgtc ctgaccttga ccctttttcga ggatcgcgag atgatcgagg agaggcttaa 1980

gacctacgct catctcttcg acgataaggt catgaaacaa ctcaagcgcc gccggtacac 2040

tggttggggc cgcctctccc gcaagctgat caacggtatt cgcgataaac agagcggtaa 2100

aactatcctg gatttcctca aatcggatgg cttcgctaat cgtaacttca tgcagttgat 2160

ccacgacgac agcctgacct ttaaggagga catccagaaa gcacaagtga gcggacaggg 2220

agactcactc catgaacaca tcgcgaatct ggccggttcg ccggcgatta agaagggaat 2280

cctgcaaact gtgaaggtgg tggacgagct ggtgaaggtc atgggacggc acaaaccgga 2340

gaatatcgtg attgaaatgg cccgagaaaa ccagactacc cagaagggcc agaagaactc 2400

ccgcgaaagg atgaagcgga tcgaagaagg aatcaaggag ctgggcagcc agatcctgaa 2460

agagcacccg gtggaaaaca cgcagctgca gaacgagaag ctctacctgt actatttgca 2520

aaatggacgg gacatgtacg tggaccaaga gctggacatc aatcggttgt ctgattacga 2580

cgtggaccac atcgttccac agtcctttct gaaggatgac tccatcgata acaaggtgtt 2640

gactcgcagc gacaagaaca gagggaagtc agataatgtg ccatcggagg aggtcgtgaa 2700

gaagatgaag aattactggc ggcagctcct gaatgcgaag ctgattaccc agagaaagtt 2760

tgacaatctc actaaagccg agcgcggcgg actctcagag ctggataagg ctggattcat 2820

caaacggcag ctggtcgaga ctcggcagat taccaagcac gtggcgcaga tcctggactc 2880

ccgcatgaac actaaatacg acgagaacga taagctcatc cgggaagtga aggtgattac 2940

cctgaaaagc aaacttgtgt cggactttcg gaaggacttt cagttttaca aagtgagaga 3000

aatcaacaac taccatcacg cgcatgacgc atacctcaac gctgtggtcg gcaccgccct 3060

gatcaagaag taccctaaac ttgaatcgga gtttgtgtac ggagactaca aggtctacga 3120

cgtgaggaag atgatagcca agtccgaaca ggaaatcggg aaagcaactg cgaaatactt 3180

cttttactca aacatcatga acttcttcaa gactgaaatt acgctggcca atggagaaat 3240

caggaagagg ccactgatcg aaactaacgg agaaacgggc gaaatcgtgt gggacaaggg 3300

cagggacttc gcaactgttc gcaaagtgct ctctatgccg caagtcaata ttgtgaagaa 3360

aaccgaagtg caaaccggcg gattttcaaa ggaatcgatc ctcccaaaga gaaatagcga 3420

caagctcatt gcacgcaaga aagactggga cccgaagaag tacggaggat tcgattcgcc 3480

gactgtcgca tactccgtcc tcgtggtggc caaggtggag aagggaaaga gcaagaagct 3540

caaatccgtc aaagagctgc tggggattac catcatggaa cgatcctcgt tcgagaagaa 3600

cccgattgat ttcctggagg cgaagggtta caaggaggtg aagaaggatc tgatcatcaa 3660

actgcccaag tactcactgt tcgaactgga aaatggtcgg aagcgcatgc tggcttcggc 3720

cggagaactc cagaaaggaa atgagctggc cttgcctagc aagtacgtca acttcctcta 3780

tcttgcttcg cactacgaga aactcaaagg gtcaccggaa gataacgaac agaagcagct 3840

tttcgtggag cagcacaagc attatctgga tgaaatcatc gaacaaatct ccgagttttc 3900

aaagcgcgtg atcctcgccg acgccaacct cgacaaagtc ctgtcggcct acaataagca 3960

tagagataag ccgatcagag aacaggccga gaacattatc cacttgttca ccctgactaa 4020

cctgggagct ccagccgcct tcaagtactt cgatactact atcgaccgca aaagatacac 4080

gtccaccaag gaagttctgg acgcgaccct gatccaccaa agcatcactg gactctacga 4140

aactaggatc gatctgtcgc agctgggtgg cgatggtggc ggtggatcct acccatacga 4200

cgtgcctgac tacgcctccg gaggtggtgg ccccaagaag aaacggaagg tgtgatagct 4260

agccatcaca tttaaaagca tctcagccta ccatgagaat aagagaaaga aaatgaagat 4320

caatagctta ttcatctctt tttctttttc gttggtgtaa agccaacacc ctgtctaaaa 4380

aacataaatt tctttaatca ttttgcctct tttctctgtg cttcaattaa taaaaaatgg 4440

aaagaacctc gag 4453

<210> 248

<400> 248
000

<210> 249
<211> 4409
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 que comprende la secuencia de Kozak con ORF de Cas9 que usa codones con expresión generalmente alta en humanos

<400> 249
gggtcccgca gtcggcgtcc agcggctctg cttgttcgtg tgtgtgtcgt tgcaggcctt 60

attcggatcc gccaccatgc ctaagaaaaa gcggaaggtc gacggggata agaagtactc 120

aatcgggctg gatatcggaa ctaattccgt gggttgggca gtgatcacgg atgaatacaa 180

agtgccgtcc aagaagttca aggtcctggg gaacaccgat agacacagca tcaagaaaaa 240

tctcatcgga gccctgctgt ttgactccgg cgaaaccgca gaagcgaccc ggctcaaacg 300

taccgcgagg cgacgctaca cccggcggaa gaatcgcatc tgctatctgc aagagatctt 360

ttcgaacgaa atggcaaagg tcgacgacag cttcttccac cgcctggaag aatctttcct 420

ggtggaggag gacaagaagc atgaacggca tcctatcttt ggaaacatcg tcgacgaagt 480

ggcgtaccac gaaaagtacc cgaccatcta ccatctgcgg aagaagttgg ttgactcaac 540

tgacaaggcc gacctcagat tgatctactt ggccctcgcc catatgatca aattccgcgg 600

acacttcctg atcgaaggcg atctgaaccc tgataactcc gacgtggata agcttttcat 660

tcaactggtg cagacctaca accaactgtt cgaagaaaac ccaatcaatg ctagcggcgt 720

cgatgccaag gccatcctgt ccgcccggct gtcgaagtcg cggcgcctcg aaaacctgat 780

cgcacagctg ccgggagaga aaaagaacgg acttttcggc aacttgatcg ctctctcact 840

gggactcact cccaatttca agtccaattt tgacctggcc gaggacgcga agctgcaact 900

ctcaaaggac acctacgacg acgacttgga caatttgctg gcacaaattg gcgatcagta 960

cgcggatctg ttccttgccg ctaagaacct ttcggacgca atcttgctgt ccgatatcct 1020

gcgcgtgaac accgaaataa ccaaagcgcc gcttagcgcc tcgatgatta agcggtacga 1080

cgagcatcac caggatctca cgctgctcaa agcgctcgtg agacagcaac tgcctgaaaa 1140

gtacaaggag atcttcttcg accagtccaa gaatgggtac gcagggtaca tcgatggagg 1200

cgctagccag gaagagttct ataagttcat caagccaatc ctggaaaaga tggacggaac 1260

cgaagaactg ctggtcaagc tgaacaggga ggatctgctc cggaaacaga gaacctttga 1320

caacggatcc attccccacc agatccatct gggtgagctg cacgccatct tgcggcgcca 1380

ggaggacttt tacccattcc tcaaggacaa ccgggaaaag atcgagaaaa ttctgacgtt 1440

ccgcatcccg tattacgtgg gcccactggc gcgcggcaat tcgcgcttcg cgtggatgac 1500

tagaaaatca gaggaaacca tcactccttg gaatttcgag gaagttgtgg ataagggagc 1560

ttcggcacaa agcttcatcg aacgaatgac caacttcgac aagaatctcc caaacgagaa 1620

ggtgcttcct aagcacagcc tcctttacga atacttcact gtctacaacg aactgactaa 1680

agtgaaatac gttactgaag gaatgaggaa gccggccttt ctgtccggag aacagaagaa 1740

agcaattgtc gatctgctgt tcaagaccaa ccgcaaggtg accgtcaagc agcttaaaga 1800

ggactacttc aagaagatcg agtgtttcga ctcagtggaa atcagcgggg tggaggacag 1860

attcaacgct tcgctgggaa cctatcatga tctcctgaag atcatcaagg acaaggactt 1920

ccttgacaac gaggagaacg aggacatcct ggaagatatc gtcctgacct tgacccttt 1980

cgaggatcgc gagatgatcg aggagaggct taagacctac gctcatctct tcgacgataa 2040

ggtcatgaaa caactcaagc gccgccggta cactggttgg ggccgcctct cccgcaagct 2100

gatcaacggt attcgcgata aacagagcgg taaaactatc ctggatttcc tcaaatcgga 2160

tggcttcgct aatcgtaact tcatgcaatt gatccacgac gacagcctga cctttaagga 2220

ggacatccaa aaagcacaag tgtccggaca gggagactca ctccatgaac acatcgcgaa 2280

tctggccggt tcgccggcga ttaagaaggg aattctgcaa actgtgaagg tggtcgacga 2340

gctggtgaag gtcatgggac ggcacaaacc ggagaatatc gtgattgaaa tggcccgaga 2400

aaaccagact acccagaagg gccagaaaaa ctcccgcgaa aggatgaagc ggatcgaaga 2460

aggaatcaag gagctgggca gccagatcct gaaagagcac ccggtggaaa acacgcagct 2520

gcagaacgag aagctctacc tgtactattt gcaaaatgga cgggacatgt acgtggacca 2580

agagctggac atcaatcggt tgtctgatta cgacgtggac cacatcgttc cacagtcctt 2640

tctgaaggat gactcgatcg ataacaaggt gttgactcgc agcgacaaga acagagggaa 2700

gtcagataat gtgccatcgg aggaggtcgt gaagaagatg aagaattact ggcggcagct 2760

cctgaatgcg aagctgatta cccagagaaa gtttgacaat ctcactaaag ccgagcgcgg 2820

cggactctca gagctggata aggctggatt catcaaacgg cagctggtcg agactcggca 2880

gattaccaag cacgtggcgc agatcttgga ctcccgcatg aacactaaat acgacgagaa 2940

cgataagctc atccgggaag tgaaggtgat taccctgaaa agcaaacttg tgtcggactt 3000

tcggaaggac tttcagtttt acaaagtgag agaaatcaac aactaccatc acgcgcatga 3060

cgcatacctc aacgctgtgg tcggtaccgc cctgatcaaa aagtacccta aacttgaatc 3120

ggagtttgtg tacggagact acaaggtcta cgacgtgagg aagatgatag ccaagtccga 3180

acaggaaatc gggaaagcaa ctgcgaaata cttcttttac tcaaacatca tgaacttttt 3240

caagactgaa attacgctgg ccaatggaga aatcaggaag aggccactga tcgaaactaa 3300

cggagaaacg ggcgaaatcg tgtgggacaa gggcagggac ttcgcaactg ttcgcaaagt 3360

gctctctatg ccgcaagtca atattgtgaa gaaaaccgaa gtgcaaaccg gcggattttc 3420

aaaggaatcg atcctcccaa agagaaatag cgacaagctc attgcacgca agaaagactg 3480

ggacccgaag aagtacggag gattcgattc gccgactgtc gcatactccg tcctcgtggt 3540

ggccaaggtg gagaagggaa agagcaaaaa gctcaaatcc gtcaaagagc tgctggggat 3600

taccatcatg gaacgatcct cgttcgagaa gaacccgatt gatttcctcg aggcgaaggg 3660

ttacaaggag gtgaagaagg atctgatcat caaactcccc aagtactcac tgttcgaact 3720

ggaaaatggt cggaagcgca tgctggcttc ggccggagaa ctccaaaaag gaaatgagct 3780

ggccttgcct agcaagtacg tcaacttcct ctatcttgct tcgcactacg aaaaactcaa 3840

agggtcaccg gaagataacg aacagaagca gcttttcgtg gagcagcaca agcattatct 3900

ggatgaaatc atcgaacaaa tctccgagtt ttcaaagcgc gtgatcctcg ccgacgccaa 3960

cctcgacaaa gtcctgtcgg cctacaataa gcatagagat aagccgatca gagaacaggc 4020

cgagaacatt atccacttgt tcaccctgac taacctggga gccccagccg ccttcaagta 4080

cttcgatact actatcgatc gcaaaagata cacgtccacc aaggaagttc tggacgcgac 4140

cctgatccac caaagcatca ctggactcta cgaaactagg atcgatctgt cgcagctggg 4200

tggcgattga tagtctagcc atcacattta aaagcatctc agcctaccat gagaataaga 4260

gaaagaaaat gaagatcaat agcttattca tctcttttttc tttttcgttg gtgtaaagcc 4320

aacaccctgt ctaaaaaaca taaatttctt taatcatttt gcctcttttc tctgtgcttc 4380

aattaataaa aaatggaaag aacctcgag 4409

<210> 250
<211> 4140
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF de Cas9 con uniones de empalme eliminadas; 12.75 % de contenido de U

<400> 250
atggacaaga agtacagcat cggactggac atcggaacaa acagcgtcgg atgggcagtc 60

atcacagacg aatacaaggt cccgagcaag aagttcaagg tcctgggaaa cacagacaga 120

cacagcatca agaagaacct gatcggagca ctgctgttcg acagcggaga aacagcagaa 180

gcaacaagac tgaagagaac agcaagaaga agatacacaa gaagaaagaa cagaatctgc 240

tacctgcagg aaatcttcag caacgaaatg gcaaaggtcg acgacagctt cttccaccgg 300

ctggaagaaa gcttcctggt cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gatcttcgga 360

aacatcgtcg acgaagtcgc ataccacgaa aagtacccga caatctacca cctgagaaag 420

aagctggtcg acagcacaga caaggcagac ctgagactga tctacctggc actggcacac 480

atgatcaagt tcagaggaca cttcctgatc gaaggagacc tgaacccgga caacagcgac 540

gtcgacaagc tgttcatcca gctggtccag acatacaacc agctgttcga agaaaacccg 600

atcaacgcaa gcggagtcga cgcaaaggca atcctgagcg caagactgag caagagcaga 660

agactggaaa acctgatcgc acagctgccg ggagaaaaga agaacggact gttcggaaac 720

ctgatcgcac tgagcctggg actgacaccg aacttcaaga gcaacttcga cctggcagaa 780

gacgcaaagc tgcagctgag caaggacaca tacgacgacg acctggacaa cctgctggca 840

cagatcggag accagtacgc agacctgttc ctggcagcaa agaacctgag cgacgcaatc 900

ctgctgagcg acatcctgag agtcaacaca gaaatcacaa aggcaccgct gagcgcaagc 960

atgatcaaga gatacgacga acaccaccag gacctgacac tgctgaaggc actggtcaga 1020

cagcagctgc cggaaaagta caaggaaatc ttcttcgacc agagcaagaa cggatacgca 1080

ggatacatcg acggaggagc aagccaggaa gaattctaca agttcatcaa gccgatcctg 1140

gaaaagatgg acggaacaga agaactgctg gtcaagctga acagagaaga cctgctgaga 1200

aagcagagaa cattcgacaa cggaagcatc ccgcaccaga tccacctggg agaactgcac 1260

gcaatcctga gaagacagga agacttctac ccgttcctga aggacaacag agaaaagatc 1320

gaaaagatcc tgacattcag aatcccgtac tacgtcggac cgctggcaag aggaaacagc 1380

agattcgcat ggatgacaag aaagagcgaa gaaacaatca caccgtggaa cttcgaagaa 1440

gtcgtcgaca agggagcaag cgcacagagc ttcatcgaaa gaatgacaaa cttcgacaag 1500

aacctgccga acgaaaaggt cctgccgaag cacagcctgc tgtacgaata cttcacagtc 1560

tacaacgaac tgacaaaggt caagtacgtc acagaaggaa tgagaaagcc ggcattcctg 1620

agcggagaac agaagaaggc aatcgtcgac ctgctgttca agacaaacag aaaggtcaca 1680

gtcaagcagc tgaaggaaga ctacttcaag aagatcgaat gcttcgacag cgtcgaaatc 1740

agcggagtcg aagacagatt caacgcaagc ctgggaacat accacgacct gctgaagatc 1800

atcaaggaca aggacttcct ggacaacgaa gaaaacgaag acatcctgga agacatcgtc 1860

ctgacactga cactgttcga agacagagaa atgatcgaag aaagactgaa gacatacgca 1920

cacctgttcg acgacaaggt catgaagcag ctgaagagaa gaagatacac aggatgggga 1980

agactgagca gaaagctgat caacggaatc agagacaagc agagcggaaa gacaatcctg 2040

gacttcctga agagcgacgg attcgcaaac agaaacttca tgcagctgat ccacgacgac 2100

agcctgacat tcaaggaaga catccagaag gcacaggtca gcggacaggg agacagcctg 2160

cacgaacaca tcgcaaacct ggcaggaagc ccggcaatca agaagggaat cctgcagaca 2220

gtcaaggtcg tcgacgaact ggtcaaggtc atgggaagac acaagccgga aaacatcgtc 2280

atcgaaatgg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga 2340

atgaagagaa tcgaagaagg aatcaaggaa ctgggaagcc agatcctgaa ggaacacccg 2400

gtcgaaaaca cacagctgca gaacgaaaag ctgtacctgt actacctgca aaacggaaga 2460

gacatgtacg tcgaccagga actggacatc aacagactga gcgactacga cgtcgaccac 2520

atcgtcccgc agagcttcct gaaggacgac agcatcgaca acaaggtcct gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaaagag cgacaacgtc ccgagcgaag aagtcgtcaa gaagatgaag 2640

aactactgga gacagctgct gaacgcaaag ctgatcacac agagaaagtt cgacaacctg 2700

acaaaggcag agagaggagg actgagcgaa ctggacaagg caggattcat caagagacag 2760

ctggtcgaaa caagacagat cacaaagcac gtcgcacaga tcctggacag cagaatgaac 2820

acaaagtacg acgaaaacga caagctgatc agagaagtca aggtcatcac actgaagagc 2880

aagctggtca gcgacttcag aaaggacttc cagttctaca aggtcagaga aatcaacaac 2940

taccaccacg cacacgacgc atacctgaac gcagtcgtcg gaacagcact gatcaagaag 3000

tacccgaagc tggaaagcga attcgtctac ggagactaca aggtctacga cgtcagaaag 3060

atgatcgcaa agagcgaaca ggaaatcgga aaggcaacag caaagtactt cttctacagc 3120

aacatcatga acttcttcaa gacagaaatc acactggcaa acggagaaat cagaaagaga 3180

ccgctgatcg aaacaaacgg agaaacagga gaaatcgtct gggacaaggg aagagacttc 3240

gcaacagtca gaaaggtcct gagcatgccg caggtcaaca tcgtcaagaa gacagaagtc 3300

cagacaggag gattcagcaa ggaaagcatc ctgccgaaga gaaacagcga caagctgatc 3360

gcaagaaaga aggactggga cccgaagaag tacggaggat tcgacagccc gacagtcgca 3420

tacagcgtcc tggtcgtcgc aaaggtcgaa aagggaaaga gcaagaagct gaagagcgtc 3480

aaggaactgc tgggaatcac aatcatggaa agaagcagct tcgaaaagaa cccgatcgac 3540

ttcctggaag caaagggata caaggaagtc aagaaggacc tgatcatcaa gctgccgaag 3600

tacagcctgt tcgaactgga aaacggaaga aagagaatgc tggcaagcgc aggagaactg 3660

cagaagggaa acgaactggc actgccgagc aagtacgtca acttcctgta cctggcaagc 3720

cactacgaaa agctgaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagct gttcgtcgaa 3780

cagcacaagc actacctgga cgaaatcatc gaacagatca gcgaattcag caagagagtc 3840

atcctggcag acgcaaacct ggacaaggtc ctgagcgcat acaacaagca cagagacaag 3900

ccgatcagag aacaggcaga aaacatcatc cacctgttca cactgacaaa cctgggagca 3960

ccggcagcat tcaagtactt cgacacaaca atcgacagaa agagatacac aagcacaaag 4020

gaagtcctgg acgcaacact gatccaccag agcatcacag gactgtacga aacaagaatc 4080

gacctgagcc agctgggagg agacggagga ggaagcccga agaagaagag aaaggtctag 4140

<210> 251
<211> 4411
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con 5 UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 250, secuencia de Kozak, y 3 UTR de ALB

<400> 251
gggtcccgca gtcggcgtcc agcggctctg cttgttcgtg tgtgtgtcgt tgcaggcctt 60

attcggatcc gccaccatgg acaagaagta cagcatcgga ctggacatcg gaacaaacag 120

cgtcggatgg gcagtcatca cagacgaata caaggtcccg agcaagaagt tcaaggtcct 180

gggaaacaca gacagacaca gcatcaagaa gaacctgatc ggagcactgc tgttcgacag 240

cggagaaaca gcagaagcaa caagactgaa gagaacagca agaagaagat acacaagaag 300

aaagaacaga atctgctacc tgcaggaaat cttcagcaac gaaatggcaa aggtcgacga 360

cagcttcttc caccggctgg aagaaagctt cctggtcgaa gaagacaaga agcacgaaag 420

acacccgatc ttcggaaaca tcgtcgacga agtcgcatac cacgaaaagt acccgacaat 480

ctaccacctg agaaagaagc tggtcgacag cacagacaag gcagacctga gactgatcta 540

cctggcactg gcacacatga tcaagttcag aggacacttc ctgatcgaag gagacctgaa 600

cccggacaac agcgacgtcg acaagctgtt catccagctg gtccagacat acaaccagct 660

gttcgaagaa aacccgatca acgcaagcgg agtcgacgca aaggcaatcc tgagcgcaag 720

actgagcaag agcagaagac tggaaaacct gatcgcacag ctgccgggag aaaagaagaa 780

cggactgttc ggaaacctga tcgcactgag cctgggactg acaccgaact tcaagagcaa 840

cttcgacctg gcagaagacg caaagctgca gctgagcaag gacacatacg acgacgacct 900

ggacaacctg ctggcacaga tcggagacca gtacgcagac ctgttcctgg cagcaaagaa 960

cctgagcgac gcaatcctgc tgagcgacat cctgagagtc aacacagaaa tcacaaaggc 1020

accgctgagc gcaagcatga tcaagagata cgacgaacac caccaggacc tgacactgct 1080

gaaggcactg gtcagacagc agctgccgga aaagtacaag gaaatcttct tcgaccagag 1140

caagaacgga tacgcaggat acatcgacgg aggagcaagc caggaagaat tctacaagtt 1200

catcaagccg atcctggaaa agatggacgg aacagaagaa ctgctggtca agctgaacag 1260

agaagacctg ctgagaaagc agagaacatt cgacaacgga agcatcccgc accagatcca 1320

cctgggagaa ctgcacgcaa tcctgagaag acaggaagac ttctacccgt tcctgaagga 1380

caacagagaa aagatcgaaa agatcctgac attcagaatc ccgtactacg tcggaccgct 1440

ggcaagagga aacagcagat tcgcatggat gacaagaaag agcgaagaaa caatcacacc 1500

gtggaacttc gaagaagtcg tcgacaaggg agcaagcgca cagagcttca tcgaaagaat 1560

gacaaacttc gacaagaacc tgccgaacga aaaggtcctg ccgaagcaca gcctgctgta 1620

cgaatacttc acagtctaca acgaactgac aaaggtcaag tacgtcacag aaggaatgag 1680

aaagccggca ttcctgagcg gagaacagaa gaaggcaatc gtcgacctgc tgttcaagac 1740

aaacagaaag gtcacagtca agcagctgaa ggaagactac ttcaagaaga tcgaatgctt 1800

cgacagcgtc gaaatcagcg gagtcgaaga cagattcaac gcaagcctgg gaacatacca 1860

cgacctgctg aagatcatca aggacaagga cttcctggac aacgaagaaa acgaagacat 1920

cctggaagac atcgtcctga cactgacact gttcgaagac agagaaatga tcgaagaaag 1980

actgaagaca tacgcacacc tgttcgacga caaggtcatg aagcagctga agagaagaag 2040

atacacagga tggggaagac tgagcagaaa gctgatcaac ggaatcagag acaagcagag 2100

cggaaagaca atcctggact tcctgaagag cgacggattc gcaaacagaa acttcatgca 2160

gctgatccac gacgacagcc tgacattcaa ggaagacatc cagaaggcac aggtcagcgg 2220

acagggagac agcctgcacg aacacatcgc aaacctggca ggaagcccgg caatcaagaa 2280

gggaatcctg cagacagtca aggtcgtcga cgaactggtc aaggtcatgg gaagacacaa 2340

gccggaaaac atcgtcatcg aaatggcaag agaaaaccag acaacacaga agggacagaa 2400

gaacagcaga gaaagaatga agagaatcga agaaggaatc aaggaactgg gaagccagat 2460

cctgaaggaa cacccggtcg aaaacacaca gctgcagaac gaaaagctgt acctgtacta 2520

cctgcaaaac ggaagagaca tgtacgtcga ccaggaactg gacatcaaca gactgagcga 2580

ctacgacgtc gaccacatcg tcccgcagag cttcctgaag gacgacagca tcgacaacaa 2640

ggtcctgaca agaagcgaca agaacagagg aaagagcgac aacgtcccga gcgaagaagt 2700

cgtcaagaag atgaagaact actggagaca gctgctgaac gcaaagctga tcacacagag 2760

aaagttcgac aacctgacaa aggcagagag aggaggactg agcgaactgg acaaggcagg 2820

attcatcaag agacagctgg tcgaaacaag acagatcaca aagcacgtcg cacagatcct 2880

ggacagcaga atgaacacaa agtacgacga aaacgacaag ctgatcagag aagtcaaggt 2940

catcacactg aagagcaagc tggtcagcga cttcagaaag gacttccagt tctacaaggt 3000

cagagaaatc aacaactacc accacgcaca cgacgcatac ctgaacgcag tcgtcggaac 3060

agcactgatc aagaagtacc cgaagctgga aagcgaattc gtctacggag actacaaggt 3120

ctacgacgtc agaaagatga tcgcaaagag cgaacaggaa atcggaaagg caacagcaaa 3180

gtacttcttc tacagcaaca tcatgaactt cttcaagaca gaaatcacac tggcaaacgg 3240

agaaatcaga aagagaccgc tgatcgaaac aaacggagaa acaggagaaa tcgtctggga 3300

caagggaaga gacttcgcaa cagtcagaaa ggtcctgagc atgccgcagg tcaacatcgt 3360

caagaagaca gaagtccaga caggaggatt cagcaaggaa agcatcctgc cgaagagaaa 3420

cagcgacaag ctgatcgcaa gaaagaagga ctgggacccg aagaagtacg gaggattcga 3480

cagcccgaca gtcgcataca gcgtcctggt cgtcgcaaag gtcgaaaagg gaaagagcaa 3540

gaagctgaag agcgtcaagg aactgctggg aatcacaatc atggaaagaa gcagcttcga 3600

aaagaacccg atcgacttcc tggaagcaaa gggatacaag gaagtcaaga aggacctgat 3660

catcaagctg ccgaagtaca gcctgttcga actggaaaac ggaagaaaga gaatgctggc 3720

aagcgcagga gaactgcaga agggaaacga actggcactg ccgagcaagt acgtcaactt 3780

cctgtacctg gcaagccact acgaaaagct gaagggaagc ccggaagaca acgaacagaa 3840

gcagctgttc gtcgaacagc acaagcacta cctggacgaa atcatcgaac agatcagcga 3900

attcagcaag agagtcatcc tggcagacgc aaacctggac aaggtcctga gcgcatacaa 3960

caagcacaga gacaagccga tcagagaaca ggcagaaaac atcatccacc tgttcacact 4020

gacaaacctg ggagcaccgg cagcattcaa gtacttcgac acaacaatcg acagaaagag 4080

atacacaagc acaaaggaag tcctggacgc aacactgatc caccagagca tcacaggact 4140

gtacgaaaca agaatcgacc tgagccagct gggaggagac ggaggaggaa gcccgaagaa 4200

gaagagaaag gtctagctag ccatcacatt taaaagcatc tcagcctacc atgagaataa 4260

gagaaagaaa atgaagatca atagcttatt catctctttt tctttttcgt tggtgtaaag 4320

ccaacaccct gtctaaaaaa cataaatttc tttaatcatt ttgcctcttt tctctgtgct 4380

tcaattaata aaaaatggaa agaacctcga g 4411

<210> 252
<211> 4140
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF de Cas9 con codones de mínima uridina de uso frecuente en humanos en general; 12.75 % de contenido de U

<400> 252
atggacaaga agtacagcat cggcctggac atcggcacca acagcgtggg ctgggccgtg 60

atcaccgacg agtacaaggt gcccagcaag aagttcaagg tgctgggcaa caccgacaga 120

cacagcatca agaagaacct gatcggcgcc ctgctgttcg acagcggcga gaccgccgag 180

gccaccagac tgaagagaac cgccagaaga agatacacca gaagaaagaa cagaatctgc 240

tacctgcagg agatcttcag caacgagatg gccaaggtgg acgacagctt cttccacaga 300

ctggaggaga gcttcctggt ggaggaggac aagaagcacg agagacaccc catcttcggc 360

aacatcgtgg acgaggtggc ctaccacgag aagtacccca ccatctacca cctgagaaag 420

aagctggtgg acagcaccga caaggccgac ctgagactga tctacctggc cctggcccac 480

atgatcaagt tcagaggcca cttcctgatc gagggcgacc tgaaccccga caacagcgac 540

gtggacaagc tgttcatcca gctggtgcag acctacaacc agctgttcga ggagaacccc 600

atcaacgcca gcggcgtgga cgccaaggcc atcctgagcg ccagactgag caagagcaga 660

agactggaga acctgatcgc ccagctgccc ggcgagaaga agaacggcct gttcggcaac 720

ctgatcgccc tgagcctggg cctgaccccc aacttcaaga gcaacttcga cctggccgag 780

gacgccaagc tgcagctgag caaggacacc tacgacgacg acctggacaa cctgctggcc 840

cagatcggcg accagtacgc cgacctgttc ctggccgcca agaacctgag cgacgccatc 900

ctgctgagcg acatcctgag agtgaacacc gagatcacca aggccccct gagcgccagc 960

atgatcaaga gatacgacga gcaccaccag gacctgaccc tgctgaaggc cctggtgaga 1020

cagcagctgc ccgagaagta caaggagatc ttcttcgacc agagcaagaa cggctacgcc 1080

ggctacatcg acggcggcgc cagccaggag gagttctaca agttcatcaa gcccatcctg 1140

gagaagatgg acggcaccga ggagctgctg gtgaagctga acagagagga cctgctgaga 1200

aagcagagaa ccttcgacaa cggcagcatc ccccaccaga tccacctggg cgagctgcac 1260

gccatcctga gaagacagga ggacttctac cccttcctga aggacaacag agagaagatc 1320

gagaagatcc tgaccttcag aatcccctac tacgtgggcc ccctggccag aggcaacagc 1380

agattcgcct ggatgaccag aaagagcgag gagaccatca ccccctggaa cttcgaggag 1440

gtggtggaca agggcgccag cgcccagagc ttcatcgaga gaatgaccaa cttcgacaag 1500

aacctgccca acgagaaggt gctgcccaag cacagcctgc tgtacgagta cttcaccgtg 1560

tacaacgagc tgaccaaggt gaagtacgtg accgagggca tgagaaagcc cgccttcctg 1620

agcggcgagc agaagaaggc catcgtggac ctgctgttca agaccaacag aaaggtgacc 1680

gtgaagcagc tgaaggagga ctacttcaag aagatcgagt gcttcgacag cgtggagatc 1740

agcggcgtgg aggacagatt caacgccagc ctgggcacct accacgacct gctgaagatc 1800

atcaaggaca aggacttcct ggacaacgag gagaacgagg acatcctgga ggacatcgtg 1860

ctgaccctga ccctgttcga ggacagagag atgatcgagg agagactgaa gacctacgcc 1920

cacctgttcg acgacaaggt gatgaagcag ctgaagagaa gaagatacac cggctggggc 1980

agactgagca gaaagctgat caacggcatc agagacaagc agagcggcaa gaccatcctg 2040

gacttcctga agagcgacgg cttcgccaac agaaacttca tgcagctgat ccacgacgac 2100

agcctgacct tcaaggagga catccagaag gcccaggtga gcggccaggg cgacagcctg 2160

cacgagcaca tcgccaacct ggccggcagc cccgccatca agaagggcat cctgcagacc 2220

gtgaaggtgg tggacgagct ggtgaaggtg atgggcagac acaagcccga gaacatcgtg 2280

atcgagatgg ccagagagaa ccagaccacc cagaagggcc agaagaacag cagagagaga 2340

atgaagagaa tcgaggaggg catcaaggag ctgggcagcc agatcctgaa ggagcacccc 2400

gtggagaaca cccagctgca gaacgagaag ctgtacctgt actacctgca gaacggcaga 2460

gacatgtacg tggaccagga gctggacatc aacagactga gcgactacga cgtggaccac 2520

atcgtgcccc agagcttcct gaaggacgac agcatcgaca acaaggtgct gaccagaagc 2580

gacaagaaca gaggcaagag cgacaacgtg cccagcgagg aggtggtgaa gaagatgaag 2640

aactactgga gacagctgct gaacgccaag ctgatcaccc agagaaagtt cgacaacctg 2700

accaaggccg agagaggcgg cctgagcgag ctggacaagg ccggcttcat caagagacag 2760

ctggtggaga ccagacagat caccaagcac gtggcccaga tcctggacag cagaatgaac 2820

accaagtacg acgagaacga caagctgatc agagaggtga aggtgatcac cctgaagagc 2880

aagctggtga gcgacttcag aaaggacttc cagttctaca aggtgagaga gatcaacaac 2940

taccaccacg cccacgacgc ctacctgaac gccgtggtgg gcaccgccct gatcaagaag 3000

taccccaagc tggagagcga gttcgtgtac ggcgactaca aggtgtacga cgtgagaaag 3060

atgatcgcca agagcgagca ggagatcggc aaggccaccg ccaagtactt cttctacagc 3120

aacatcatga acttcttcaa gaccgagatc accctggcca acggcgagat cagaaagaga 3180

cccctgatcg agaccaacgg cgagaccggc gagatcgtgt gggacaaggg cagagacttc 3240

gccaccgtga gaaaggtgct gagcatgccc caggtgaaca tcgtgaagaa gaccgaggtg 3300

cagaccggcg gcttcagcaa ggagagcatc ctgcccaaga gaaacagcga caagctgatc 3360

gccagaaaga aggactggga ccccaagaag tacggcggct tcgacagccc caccgtggcc 3420

tacagcgtgc tggtggtggc caaggtggag aagggcaaga gcaagaagct gaagagcgtg 3480

aaggagctgc tgggcatcac catcatggag agaagcagct tcgagaagaa ccccatcgac 3540

ttcctggagg ccaagggcta caaggaggtg aagaaggacc tgatcatcaa gctgcccaag 3600

tacagcctgt tcgagctgga gaacggcaga aagagaatgc tggccagcgc cggcgagctg 3660

cagaagggca acgagctggc cctgcccagc aagtacgtga acttcctgta cctggccagc 3720

cactacgaga agctgaaggg cagccccgag gacaacgagc agaagcagct gttcgtggag 3780

cagcacaagc actacctgga cgagatcatc gagcagatca gcgagttcag caagagagtg 3840

atcctggccg acgccaacct ggacaaggtg ctgagcgcct acaacaagca cagagacaag 3900

cccatcagag agcaggccga gaacatcatc cacctgttca ccctgaccaa cctgggcgcc 3960

cccgccgcct tcaagtactt cgacaccacc atcgacagaa agagatacac cagcaccaag 4020

gaggtgctgg acgccaccct gatccaccag agcatcaccg gcctgtacga gaccagaatc 4080

gacctgagcc agctgggcgg cgacggcggc ggcagcccca agaagaagag aaaggtgtga 4140

<210> 253
<211> 4411
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con 5 UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 252, secuencia de Kozak, y 3 UTR de ALB

<400> 253
gggtcccgca gtcggcgtcc agcggctctg cttgttcgtg tgtgtgtcgt tgcaggcctt 60

attcggatcc gccaccatgg acaagaagta cagcatcggc ctggacatcg gcaccaacag 120

cgtgggctgg gccgtgatca ccgacgagta caaggtgccc agcaagaagt tcaaggtgct 180

gggcaacacc gacagacaca gcatcaagaa gaacctgatc ggcgccctgc tgttcgacag 240

cggcgagacc gccgaggcca ccagactgaa gagaaccgcc agaagaagat acaccagaag 300

aaagaacaga atctgctacc tgcaggagat cttcagcaac gagatggcca aggtggacga 360

cagcttcttc cacagactgg aggagagctt cctggtggag gaggacaaga agcacgagag 420

acaccccatc ttcggcaaca tcgtggacga ggtggcctac cacgagaagt accccaccat 480

ctaccacctg agaaagaagc tggtggacag caccgacaag gccgacctga gactgatcta 540

cctggccctg gcccacatga tcaagttcag aggccacttc ctgatcgagg gcgacctgaa 600

ccccgacaac agcgacgtgg acaagctgtt catccagctg gtgcagacct acaaccagct 660

gttcgaggag aaccccatca acgccagcgg cgtggacgcc aaggccatcc tgagcgccag 720

actgagcaag agcagaagac tggagaacct gatcgcccag ctgcccggcg agaagaagaa 780

cggcctgttc ggcaacctga tcgccctgag cctgggcctg acccccaact tcaagagcaa 840

cttcgacctg gccgaggacg ccaagctgca gctgagcaag gacacctacg acgacgacct 900

ggacaacctg ctggcccaga tcggcgacca gtacgccgac ctgttcctgg ccgccaagaa 960

cctgagcgac gccatcctgc tgagcgacat cctgagagtg aacaccgaga tcaccaaggc 1020

ccccctgagc gccagcatga tcaagagata cgacgagcac caccaggacc tgaccctgct 1080

gaaggccctg gtgagacagc agctgcccga gaagtacaag gagatcttct tcgaccagag 1140

caagaacggc tacgccggct acatcgacgg cggcgccagc caggaggagt tctacaagtt 1200

catcaagccc atcctggaga agatggacgg caccgaggag ctgctggtga agctgaacag 1260

agaggacctg ctgagaaagc agagaacctt cgacaacggc agcatccccc accagatcca 1320

cctgggcgag ctgcacgcca tcctgagaag acaggaggac ttctacccct tcctgaagga 1380

caacagagag aagatcgaga agatcctgac cttcagaatc ccctactacg tgggcccccc 1440

ggccagaggc aacagcagat tcgcctggat gaccagaaag agcgaggaga ccatcacccc 1500

ctggaacttc gaggaggtgg tggacaaggg cgccagcgcc cagagcttca tcgagagaat 1560

gaccaacttc gacaagaacc tgcccaacga gaaggtgctg cccaagcaca gcctgctgta 1620

cgagtacttc accgtgtaca acgagctgac caaggtgaag tacgtgaccg agggcatgag 1680

aaagcccgcc ttcctgagcg gcgagcagaa gaaggccatc gtggacctgc tgttcaagac 1740

caacagaaag gtgaccgtga agcagctgaa ggaggactac ttcaagaaga tcgagtgctt 1800

cgacagcgtg gagatcagcg gcgtggagga cagattcaac gccagcctgg gcacctacca 1860

cgacctgctg aagatcatca aggacaagga cttcctggac aacgaggaga acgaggacat 1920

cctggaggac atcgtgctga ccctgaccct gttcgaggac agagagatga tcgaggagag 1980

actgaagacc tacgcccacc tgttcgacga caaggtgatg aagcagctga agagaagaag 2040

atacaccggc tggggcagac tgagcagaaa gctgatcaac ggcatcagag acaagcagag 2100

cggcaagacc atcctggact tcctgaagag cgacggcttc gccaacagaa acttcatgca 2160

gctgatccac gacgacagcc tgaccttcaa ggaggacatc cagaaggccc aggtgagcgg 2220

ccagggcgac agcctgcacg agcacatcgc caacctggcc ggcagccccg ccatcaagaa 2280

gggcatcctg cagaccgtga aggtggtgga cgagctggtg aaggtgatgg gcagacacaa 2340

gcccgagaac atcgtgatcg agatggccag agagaaccag accacccaga agggccagaa 2400

gaacagcaga gagagaatga agagaatcga ggagggcatc aaggagctgg gcagccagat 2460

cctgaaggag caccccgtgg agaacaccca gctgcagaac gagaagctgt acctgtacta 2520

cctgcagaac ggcagagaca tgtacgtgga ccaggagctg gacatcaaca gactgagcga 2580

ctacgacgtg gaccacatcg tgccccagag cttcctgaag gacgacagca tcgacaacaa 2640

ggtgctgacc agaagcgaca agaacagagg caagagcgac aacgtgccca gcgaggaggt 2700

ggtgaagaag atgaagaact actggagaca gctgctgaac gccaagctga tcacccagag 2760

aaagttcgac aacctgacca aggccgagag aggcggcctg agcgagctgg acaaggccgg 2820

cttcatcaag agacagctgg tggagaccag acagatcacc aagcacgtgg cccagatcct 2880

ggacagcaga atgaacacca agtacgacga gaacgacaag ctgatcagag aggtgaaggt 2940

gatcaccctg aagagcaagc tggtgagcga cttcagaaag gacttccagt tctacaaggt 3000

gagagagatc aacaactacc accacgccca cgacgcctac ctgaacgccg tggtgggcac 3060

cgccctgatc aagaagtacc ccaagctgga gagcgagttc gtgtacggcg actacaaggt 3120

gtacgacgtg agaaagatga tcgccaagag cgagcaggag atcggcaagg ccaccgccaa 3180

gtacttcttc tacagcaaca tcatgaactt cttcaagacc gagatcaccc tggccaacgg 3240

cgagatcaga aagagacccc tgatcgagac caacggcgag accggcgaga tcgtgtggga 3300

caagggcaga gacttcgcca ccgtgagaaa ggtgctgagc atgccccagg tgaacatcgt 3360

gaagaagacc gaggtgcaga ccggcggctt cagcaaggag agcatcctgc ccaagagaaa 3420

cagcgacaag ctgatcgcca gaaagaagga ctgggacccc aagaagtacg gcggcttcga 3480

cagccccacc gtggcctaca gcgtgctggt ggtggccaag gtggagaagg gcaagagcaa 3540

gaagctgaag agcgtgaagg agctgctggg catcaccatc atggagagaa gcagcttcga 3600

gaagaacccc atcgacttcc tggaggccaa gggctacaag gaggtgaaga aggacctgat 3660

catcaagctg cccaagtaca gcctgttcga gctggagaac ggcagaaaga gaatgctggc 3720

cagcgccggc gagctgcaga agggcaacga gctggccctg cccagcaagt acgtgaactt 3780

cctgtacctg gccagccact acgagaagct gaagggcagc cccgaggaca acgagcagaa 3840

gcagctgttc gtggagcagc acaagcacta cctggacgag atcatcgagc agatcagcga 3900

gttcagcaag agagtgatcc tggccgacgc caacctggac aaggtgctga gcgcctacaa 3960

caagcacaga gacaagccca tcagagagca ggccgagaac atcatccacc tgttcaccct 4020

gaccaacctg ggcgcccccg ccgccttcaa gtacttcgac accaccatcg acagaaagag 4080

atacaccagc accaaggagg tgctggacgc caccctgatc caccagagca tcaccggcct 4140

gtacgagacc agaatcgacc tgagccagct gggcggcgac ggcggcggca gccccaagaa 4200

gaagagaaag gtgtgactag ccatcacatt taaaagcatc tcagcctacc atgagaataa 4260

gagaaagaaa atgaagatca atagcttatt catctctttt tctttttcgt tggtgtaaag 4320

ccaacaccct gtctaaaaaa cataaatttc tttaatcatt ttgcctcttt tctctgtgct 4380

tcaattaata aaaaatggaa agaacctcga g 4411

<210> 254
<211> 4140
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF de Cas9 con codones de mínima uridina usados con poca frecuencia en humanos en general; 12.75 % de contenido de U

<400> 254
atggacaaaa aatacagcat agggctagac atagggacga acagcgtagg gtgggcggta 60

ataacggacg aatacaaagt accgagcaaa aaattcaaag tactagggaa cacggaccga 120

cacagcataa aaaaaaacct aataggggcg ctactattcg acagcgggga aacggcggaa 180

gcgacgcgac taaaacgaac ggcgcgacga cgatacacgc gacgaaaaaa ccgaatatgc 240

tacctacaag aaatattcag caacgaaatg gcgaaagtag acgacagctt cttccaccga 300

ctagaagaaa gcttcctagt agaagaagac aaaaaacacg aacgacaccc gatattcggg 360

aacatagtag acgaagtagc gtaccacgaa aaatacccga cgatatacca cctacgaaaa 420

aaactagtag acagcacgga caaagcggac ctacgactaa tatacctagc gctagcgcac 480

atgataaaat tccgagggca cttcctaata gaaggggacc taaacccgga caacagcgac 540

gtagacaaac tattcataca actagtacaa acgtacaacc aactattcga agaaaacccg 600

ataaacgcga gcggggtaga cgcgaaagcg atactaagcg cgcgactaag caaaagccga 660

cgactagaaa acctaatagc gcaactaccg ggggaaaaaa aaaacgggct attcgggaac 720

ctaatagcgc taagcctagg gctaacgccg aacttcaaaa gcaacttcga cctagcggaa 780

gacgcgaaac tacaactaag caaagacacg tacgacgacg acctagacaa cctactagcg 840

caaatagggg accaatacgc ggacctattc ctagcggcga aaaacctaag cgacgcgata 900

ctactaagcg acatactacg agtaaacacg gaaataacga aagcgccgct aagcgcgagc 960

atgataaaac gatacgacga acaccaccaa gacctaacgc tactaaaagc gctagtacga 1020

caacaactac cggaaaaata caaagaaata ttcttcgacc aaagcaaaaa cgggtacgcg 1080

gggtacatag acgggggggc gagccaagaa gaattctaca aattcataaa accgatacta 1140

gaaaaaatgg acgggacgga agaactacta gtaaaactaa accgagaaga cctactacga 1200

aaacaacgaa cgttcgacaa cgggagcata ccgcaccaaa tacacctagg ggaactacac 1260

gcgatactac gacgacaaga agacttctac ccgttcctaa aagacaaccg agaaaaaata 1320

gaaaaaatac taacgttccg aataccgtac tacgtagggc cgctagcgcg agggaacagc 1380

cgattcgcgt ggatgacgcg aaaaagcgaa gaaacgataa cgccgtggaa cttcgaagaa 1440

gtagtagaca aaggggcgag cgcgcaaagc ttcatagaac gaatgacgaa cttcgacaaa 1500

aacctaccga acgaaaaagt actaccgaaa cacagcctac tatacgaata cttcacggta 1560

tacaacgaac taacgaaagt aaaatacgta acggaaggga tgcgaaaacc ggcgttccta 1620

agcggggaac aaaaaaaagc gatagtagac ctactattca aaacgaaccg aaaagtaacg 1680

gtaaaacaac taaaagaaga ctacttcaaa aaaatagaat gcttcgacag cgtagaaata 1740

agcggggtag aagaccgatt caacgcgagc ctagggacgt accacgacct actaaaaata 1800

ataaaagaca aagacttcct agacaacgaa gaaaacgaag acatactaga agacatagta 1860

ctaacgctaa cgctattcga agaccgagaa atgatagaag aacgactaaa aacgtacgcg 1920

cacctattcg acgacaaagt aatgaaacaa ctaaaacgac gacgatacac ggggtggggg 1980

cgactaagcc gaaaactaat aaacgggata cgagacaaac aaagcgggaa aacgatacta 2040

gacttcctaa aaagcgacgg gttcgcgaac cgaaacttca tgcaactaat acacgacgac 2100

agcctaacgt tcaaagaaga catacaaaaa gcgcaagtaa gcgggcaagg ggacagccta 2160

cacgaacaca tagcgaacct agcggggagc ccggcgataa aaaaagggat actacaaacg 2220

gtaaaagtag tagacgaact agtaaaagta atggggcgac acaaaccgga aaacatagta 2280

atagaaatgg cgcgagaaaa ccaaacgacg caaaaagggc aaaaaaacag ccgagaacga 2340

atgaaacgaa tagaagaagg gataaaagaa ctagggagcc aaatactaaa agaacacccg 2400

gtagaaaaca cgcaactaca aaacgaaaaa ctatacctat actacctaca aaacgggcga 2460

gacatgtacg tagaccaaga actagacata aaccgactaa gcgactacga cgtagaccac 2520

atagtaccgc aaagcttcct aaaagacgac agcatagaca acaaagtact aacgcgaagc 2580

gacaaaaacc gagggaaaag cgacaacgta ccgagcgaag aagtagtaaa aaaaatgaaa 2640

aactactggc gacaactact aaacgcgaaa ctaataacgc aacgaaaatt cgacaaccta 2700

acgaaagcgg aacgaggggg gctaagcgaa ctagacaaag cggggttcat aaaacgacaa 2760

ctagtagaaa cgcgacaaat aacgaaacac gtagcgcaaa tactagacag ccgaatgaac 2820

acgaaatacg acgaaaacga caaactaata cgagaagtaa aagtaataac gctaaaaagc 2880

aaactagtaa gcgacttccg aaaagacttc caattctaca aagtacgaga aataaacaac 2940

taccaccacg cgcacgacgc gtacctaaac gcggtagtag ggacggcgct aataaaaaaa 3000

tacccgaaac tagaaagcga attcgtatac ggggactaca aagtatacga cgtacgaaaa 3060

atgatagcga aaagcgaaca agaaataggg aaagcgacgg cgaaatactt cttctacagc 3120

aacataatga acttcttcaa aacggaaata acgctagcga acggggaaat acgaaaacga 3180

ccgctaatag aaacgaacgg ggaaacgggg gaaatagtat gggacaaagg gcgagacttc 3240

gcgacggtac gaaaagtact aagcatgccg caagtaaaca tagtaaaaaa aacggaagta 3300

caaacggggg ggttcagcaa agaaagcata ctaccgaaac gaaacagcga caaactaata 3360

gcgcgaaaaa aagactggga cccgaaaaaa tacggggggt tcgacagccc gacggtagcg 3420

tacagcgtac tagtagtagc gaaagtagaa aaagggaaaa gcaaaaaact aaaaagcgta 3480

aaagaactac tagggataac gataatggaa cgaagcagct tcgaaaaaaa cccgatagac 3540

ttcctagaag cgaaagggta caaagaagta aaaaaagacc taataataaa actaccgaaa 3600

tacagcctat tcgaactaga aaacgggcga aaacgaatgc tagcgagcgc gggggaacta 3660

caaaaaggga acgaactagc gctaccgagc aaatacgtaa acttcctata cctagcgagc 3720

cactacgaaa aactaaaagg gagcccggaa gacaacgaac aaaaacaact attcgtagaa 3780

caacacaaac actacctaga cgaaataata gaacaaataa gcgaattcag caaacgagta 3840

atactagcgg acgcgaacct agacaaagta ctaagcgcgt acaacaaaca ccgagacaaa 3900

ccgatacgag aacaagcgga aaacataata cacctattca cgctaacgaa cctaggggcg 3960

ccggcggcgt tcaaatactt cgacacgacg atagaccgaa aacgatacac gagcacgaaa 4020

gaagtactag acgcgacgct aatacaccaa agcataacgg ggctatacga aacgcgaata 4080

gacctaagcc aactaggggg ggacgggggg gggagcccga aaaaaaaacg aaaagtatga 4140

<210> 255
<211> 4411
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con 5 UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 254, secuencia de Kozak, y 3 UTR de ALB

<400> 255
gggtcccgca gtcggcgtcc agcggctctg cttgttcgtg tgtgtgtcgt tgcaggcctt 60

attcggatcc gccaccatgg acaaaaaata cagcataggg ctagacatag ggacgaacag 120

cgtagggtgg gcggtaataa cggacgaata caaagtaccg agcaaaaaat tcaaagtact 180

agggaacacg gaccgacaca gcataaaaaa aaacctaata ggggcgctac tattcgacag 240

cggggaaacg gcggaagcga cgcgactaaa acgaacggcg cgacgacgat acacgcgacg 300

aaaaaaccga atatgctacc tacaagaaat attcagcaac gaaatggcga aagtagacga 360

cagcttcttc caccgactag aagaaagctt cctagtagaa gaagacaaaa aacacgaacg 420

acacccgata ttcgggaaca tagtagacga agtagcgtac cacgaaaaat acccgacgat 480

ataccaccta cgaaaaaaac tagtagacag cacggacaaa gcggacctac gactaatata 540

cctagcgcta gcgcacatga taaaattccg agggcacttc ctaatagaag gggacctaaa 600

cccggacaac agcgacgtag acaaactatt catacaacta gtacaaacgt acaaccaact 660

attcgaagaa aacccgataa acgcgagcgg ggtagacgcg aaagcgatac taagcgcgcg 720

actaagcaaa agccgacgac tagaaaacct aatagcgcaa ctaccggggg aaaaaaaaaa 780

cgggctattc gggaacctaa tagcgctaag cctagggcta acgccgaact tcaaaagcaa 840

cttcgaccta gcggaagacg cgaaactaca actaagcaaa gacacgtacg acgacgacct 900

agacaaccta ctagcgcaaa taggggacca atacgcggac ctattcctag cggcgaaaaa 960

cctaagcgac gcgatactac taagcgacat actacgagta aacacggaaa taacgaaagc 1020

gccgctaagc gcgagcatga taaaacgata cgacgaacac caccaagacc taacgctact 1080

aaaagcgcta gtacgacaac aactaccgga aaaatacaaa gaaatattct tcgaccaaag 1140

caaaaacggg tacgcggggt acatagacgg gggggcgagc caagaagaat tctacaaatt 1200

cataaaaccg atactagaaa aaatggacgg gacggaagaa ctactagtaa aactaaaccg 1260

agaagaccta ctacgaaaac aacgaacgtt cgacaacggg agcataccgc accaaataca 1320

cctaggggaa ctacacgcga tactacgacg acaagaagac ttctacccgt tcctaaaaga 1380

caaccgagaa aaaatagaaa aaatactaac gttccgaata ccgtactacg tagggccgct 1440

agcgcgaggg aacagccgat tcgcgtggat gacgcgaaaa agcgaagaaa cgataacgcc 1500

gtggaacttc gaagaagtag tagacaaagg ggcgagcgcg caaagcttca tagaacgaat 1560

gacgaacttc gacaaaaacc taccgaacga aaaagtacta ccgaaacaca gcctactata 1620

cgaatacttc acggtataca acgaactaac gaaagtaaaa tacgtaacgg aagggatgcg 1680

aaaaccggcg ttcctaagcg gggaacaaaa aaaagcgata gtagacctac tattcaaaac 1740

gaaccgaaaa gtaacggtaa aacaactaaa agaagactac ttcaaaaaaa tagaatgctt 1800

cgacagcgta gaaataagcg gggtagaaga ccgattcaac gcgagcctag ggacgtacca 1860

cgacctacta aaaataataa aagacaaaga cttcctagac aacgaagaaa acgaagacat 1920

actagaagac atagtactaa cgctaacgct attcgaagac cgagaaatga tagaagaacg 1980

actaaaaacg tacgcgcacc tattcgacga caaagtaatg aaacaactaa aacgacgacg 2040

atacacgggg tgggggcgac taagccgaaa actaataaac gggatacgag acaaacaaag 2100

cgggaaaacg atactagact tcctaaaaag cgacgggttc gcgaaccgaa acttcatgca 2160

actaatacac gacgacagcc taacgttcaa agaagacata caaaaagcgc aagtaagcgg 2220

gcaaggggac agcctacacg aacacatagc gaacctagcg gggagcccgg cgataaaaaa 2280

agggatacta caaacggtaa aagtagtaga cgaactagta aaagtaatgg ggcgacacaa 2340

accggaaaac atagtaatag aaatggcgcg agaaaaccaa acgacgcaaa aagggcaaaa 2400

aaacagccga gaacgaatga aacgaataga agaagggata aaagaactag ggagccaaat 2460

actaaaagaa cacccggtag aaaacacgca actacaaaac gaaaaactat acctatacta 2520

cctacaaaac gggcgagaca tgtacgtaga ccaagaacta gacataaacc gactaagcga 2580

ctacgacgta gaccacatag taccgcaaag cttcctaaaa gacgacagca tagacaacaa 2640

agtactaacg cgaagcgaca aaaaccgagg gaaaagcgac aacgtaccga gcgaagaagt 2700

agtaaaaaaa atgaaaaact actggcgaca actactaaac gcgaaactaa taacgcaacg 2760

aaaattcgac aacctaacga aagcggaacg agggggggcta agcgaactag acaaagcggg 2820

gttcataaaa cgacaactag tagaaacgcg acaaataacg aaacacgtag cgcaaatact 2880

agacagccga atgaacacga aatacgacga aaacgacaaa ctaatacgag aagtaaaagt 2940

aataacgcta aaaagcaaac tagtaagcga cttccgaaaa gacttccaat tctacaaagt 3000

acgagaaata aacaactacc accacgcgca cgacgcgtac ctaaacgcgg tagtagggac 3060

ggcgctaata aaaaaatacc cgaaactaga aagcgaattc gtatacgggg actacaaagt 3120

atacgacgta cgaaaaatga tagcgaaaag cgaacaagaa atagggaaag cgacggcgaa 3180

atacttcttc tacagcaaca taatgaactt cttcaaaacg gaaataacgc tagcgaacgg 3240

ggaaatacga aaacgaccgc taatagaaac gaacggggaa acgggggaaa tagtatggga 3300

caaagggcga gacttcgcga cggtacgaaa agtactaagc atgccgcaag taaacatagt 3360

aaaaaaaacg gaagtacaaa cgggggggtt cagcaaagaa agcatactac cgaaacgaaa 3420

cagcgacaaa ctaatagcgc gaaaaaaaga ctgggacccg aaaaaatacg gggggttcga 3480

cagcccgacg gtagcgtaca gcgtactagt agtagcgaaa gtagaaaaag ggaaaagcaa 3540

aaaactaaaa agcgtaaaag aactactagg gataacgata atggaacgaa gcagcttcga 3600

aaaaaacccg atagacttcc tagaagcgaa agggtacaaa gaagtaaaaa aagacctaat 3660

aataaaacta ccgaaataca gcctattcga actagaaaac gggcgaaaac gaatgctagc 3720

gagcgcgggg gaactacaaa aagggaacga actagcgcta ccgagcaaat acgtaaactt 3780

cctataccta gcgagccact acgaaaaact aaaagggagc ccggaagaca acgaacaaaa 3840

acaactattc gtagaacaac acaaacacta cctagacgaa ataatagaac aaataagcga 3900

attcagcaaa cgagtaatac tagcggacgc gaacctagac aaagtactaa gcgcgtacaa 3960

caaacaccga gacaaaccga tacgagaaca agcggaaaac ataatacacc tattcacgct 4020

aacgaaccta ggggcgccgg cggcgttcaa atacttcgac acgacgatag accgaaaacg 4080

atacacgagc acgaaagaag tactagacgc gacgctaata caccaaagca taacggggct 4140

atacgaaacg cgaatagacc taagccaact agggggggac gggggggggga gcccgaaaaa 4200

aaaacgaaaa gtatgactag ccatcacatt taaaagcatc tcagcctacc atgagaataa 4260

gagaaagaaa atgaagatca atagcttatt catctctttt tctttttcgt tggtgtaaag 4320

ccaacaccct gtctaaaaaa cataaatttc tttaatcatt ttgcctcttt tctctgtgct 4380

tcaattaata aaaaatggaa agaacctcga g 4411

<210> 256
<211> 4411
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con AGG como los primeros tres nucleótidos para el uso con CleanCapTM, 5 UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, Secuencia de Kozak, y 3 UTR de ALB

<400> 256
aggtcccgca gtcggcgtcc agcggctctg cttgttcgtg tgtgtgtcgt tgcaggcctt 60

attcggatcc gccaccatgg acaagaagta cagcatcgga ctggacatcg gaacaaacag 120

cgtcggatgg gcagtcatca cagacgaata caaggtcccg agcaagaagt tcaaggtcct 180

gggaaacaca gacagacaca gcatcaagaa gaacctgatc ggagcactgc tgttcgacag 240

cggagaaaca gcagaagcaa caagactgaa gagaacagca agaagaagat acacaagaag 300

aaagaacaga atctgctacc tgcaggaaat cttcagcaac gaaatggcaa aggtcgacga 360

cagcttcttc cacagactgg aagaaagctt cctggtcgaa gaagacaaga agcacgaaag 420

acacccgatc ttcggaaaca tcgtcgacga agtcgcatac cacgaaaagt acccgacaat 480

ctaccacctg agaaagaagc tggtcgacag cacagacaag gcagacctga gactgatcta 540

cctggcactg gcacacatga tcaagttcag aggacacttc ctgatcgaag gagacctgaa 600

cccggacaac agcgacgtcg acaagctgtt catccagctg gtccagacat acaaccagct 660

gttcgaagaa aacccgatca acgcaagcgg agtcgacgca aaggcaatcc tgagcgcaag 720

actgagcaag agcagaagac tggaaaacct gatcgcacag ctgccgggag aaaagaagaa 780

cggactgttc ggaaacctga tcgcactgag cctgggactg acaccgaact tcaagagcaa 840

cttcgacctg gcagaagacg caaagctgca gctgagcaag gacacatacg acgacgacct 900

ggacaacctg ctggcacaga tcggagacca gtacgcagac ctgttcctgg cagcaaagaa 960

cctgagcgac gcaatcctgc tgagcgacat cctgagagtc aacacagaaa tcacaaaggc 1020

accgctgagc gcaagcatga tcaagagata cgacgaacac caccaggacc tgacactgct 1080

gaaggcactg gtcagacagc agctgccgga aaagtacaag gaaatcttct tcgaccagag 1140

caagaacgga tacgcaggat acatcgacgg aggagcaagc caggaagaat tctacaagtt 1200

catcaagccg atcctggaaa agatggacgg aacagaagaa ctgctggtca agctgaacag 1260

agaagacctg ctgagaaagc agagaacatt cgacaacgga agcatcccgc accagatcca 1320

cctgggagaa ctgcacgcaa tcctgagaag acaggaagac ttctacccgt tcctgaagga 1380

caacagagaa aagatcgaaa agatcctgac attcagaatc ccgtactacg tcggaccgct 1440

ggcaagagga aacagcagat tcgcatggat gacaagaaag agcgaagaaa caatcacacc 1500

gtggaacttc gaagaagtcg tcgacaaggg agcaagcgca cagagcttca tcgaaagaat 1560

gacaaacttc gacaagaacc tgccgaacga aaaggtcctg ccgaagcaca gcctgctgta 1620

cgaatacttc acagtctaca acgaactgac aaaggtcaag tacgtcacag aaggaatgag 1680

aaagccggca ttcctgagcg gagaacagaa gaaggcaatc gtcgacctgc tgttcaagac 1740

aaacagaaag gtcacagtca agcagctgaa ggaagactac ttcaagaaga tcgaatgctt 1800

cgacagcgtc gaaatcagcg gagtcgaaga cagattcaac gcaagcctgg gaacatacca 1860

cgacctgctg aagatcatca aggacaagga cttcctggac aacgaagaaa acgaagacat 1920

cctggaagac atcgtcctga cactgacact gttcgaagac agagaaatga tcgaagaaag 1980

actgaagaca tacgcacacc tgttcgacga caaggtcatg aagcagctga agagaagaag 2040

atacacagga tggggaagac tgagcagaaa gctgatcaac ggaatcagag acaagcagag 2100

cggaaagaca atcctggact tcctgaagag cgacggattc gcaaacagaa acttcatgca 2160

gctgatccac gacgacagcc tgacattcaa ggaagacatc cagaaggcac aggtcagcgg 2220

acagggagac agcctgcacg aacacatcgc aaacctggca ggaagcccgg caatcaagaa 2280

gggaatcctg cagacagtca aggtcgtcga cgaactggtc aaggtcatgg gaagacacaa 2340

gccggaaaac atcgtcatcg aaatggcaag agaaaaccag acaacacaga agggacagaa 2400

gaacagcaga gaaagaatga agagaatcga agaaggaatc aaggaactgg gaagccagat 2460

cctgaaggaa cacccggtcg aaaacacaca gctgcagaac gaaaagctgt acctgtacta 2520

cctgcagaac ggaagagaca tgtacgtcga ccaggaactg gacatcaaca gactgagcga 2580

ctacgacgtc gaccacatcg tcccgcagag cttcctgaag gacgacagca tcgacaacaa 2640

ggtcctgaca agaagcgaca agaacagagg aaagagcgac aacgtcccga gcgaagaagt 2700

cgtcaagaag atgaagaact actggagaca gctgctgaac gcaaagctga tcacacagag 2760

aaagttcgac aacctgacaa aggcagagag aggaggactg agcgaactgg acaaggcagg 2820

attcatcaag agacagctgg tcgaaacaag acagatcaca aagcacgtcg cacagatcct 2880

ggacagcaga atgaacacaa agtacgacga aaacgacaag ctgatcagag aagtcaaggt 2940

catcacactg aagagcaagc tggtcagcga cttcagaaag gacttccagt tctacaaggt 3000

cagagaaatc aacaactacc accacgcaca cgacgcatac ctgaacgcag tcgtcggaac 3060

agcactgatc aagaagtacc cgaagctgga aagcgaattc gtctacggag actacaaggt 3120

ctacgacgtc agaaagatga tcgcaaagag cgaacaggaa atcggaaagg caacagcaaa 3180

gtacttcttc tacagcaaca tcatgaactt cttcaagaca gaaatcacac tggcaaacgg 3240

agaaatcaga aagagaccgc tgatcgaaac aaacggagaa acaggagaaa tcgtctggga 3300

caagggaaga gacttcgcaa cagtcagaaa ggtcctgagc atgccgcagg tcaacatcgt 3360

caagaagaca gaagtccaga caggaggatt cagcaaggaa agcatcctgc cgaagagaaa 3420

cagcgacaag ctgatcgcaa gaaagaagga ctgggacccg aagaagtacg gaggattcga 3480

cagcccgaca gtcgcataca gcgtcctggt cgtcgcaaag gtcgaaaagg gaaagagcaa 3540

gaagctgaag agcgtcaagg aactgctggg aatcacaatc atggaaagaa gcagcttcga 3600

aaagaacccg atcgacttcc tggaagcaaa gggatacaag gaagtcaaga aggacctgat 3660

catcaagctg ccgaagtaca gcctgttcga actggaaaac ggaagaaaga gaatgctggc 3720

aagcgcagga gaactgcaga agggaaacga actggcactg ccgagcaagt acgtcaactt 3780

cctgtacctg gcaagccact acgaaaagct gaagggaagc ccggaagaca acgaacagaa 3840

gcagctgttc gtcgaacagc acaagcacta cctggacgaa atcatcgaac agatcagcga 3900

attcagcaag agagtcatcc tggcagacgc aaacctggac aaggtcctga gcgcatacaa 3960

caagcacaga gacaagccga tcagagaaca ggcagaaaac atcatccacc tgttcacact 4020

gacaaacctg ggagcaccgg cagcattcaa gtacttcgac acaacaatcg acagaaagag 4080

atacacaagc acaaaggaag tcctggacgc aacactgatc caccagagca tcacaggact 4140

gtacgaaaca agaatcgacc tgagccagct gggaggagac ggaggaggaa gcccgaagaa 4200

gaagagaaag gtctagctag ccatcacatt taaaagcatc tcagcctacc atgagaataa 4260

gagaaagaaa atgaagatca atagcttatt catctctttt tctttttcgt tggtgtaaag 4320

ccaacaccct gtctaaaaaa cataaatttc tttaatcatt ttgcctcttt tctctgtgct 4380

tcaattaata aaaaatggaa agaacctcga g 4411

<210> 257
<211> 4481
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con 5 UTR de CMV, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, secuencia de Kozak, y 3 UTR de ALB

<400> 257
gggcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac 60

cgatccagcc tccgcggccg ggaacggtgc attggaacgc ggattccccg tgccaagagt 120

gactcaccgt ccttgacacg gccaccatgg acaagaagta cagcatcgga ctggacatcg 180

gaacaaacag cgtcggatgg gcagtcatca cagacgaata caaggtcccg agcaagaagt 240

tcaaggtcct gggaaacaca gacagacaca gcatcaagaa gaacctgatc ggagcactgc 300

tgttcgacag cggagaaaca gcagaagcaa caagactgaa gagaacagca agaagaagat 360

acacaagaag aaagaacaga atctgctacc tgcaggaaat cttcagcaac gaaatggcaa 420

aggtcgacga cagcttcttc cacagactgg aagaaagctt cctggtcgaa gaagacaaga 480

agcacgaaag acacccgatc ttcggaaaca tcgtcgacga agtcgcatac cacgaaaagt 540

acccgacaat ctaccacctg agaaagaagc tggtcgacag cacagacaag gcagacctga 600

gactgatcta cctggcactg gcacacatga tcaagttcag aggacacttc ctgatcgaag 660

gagacctgaa cccggacaac agcgacgtcg acaagctgtt catccagctg gtccagacat 720

acaaccagct gttcgaagaa aacccgatca acgcaagcgg agtcgacgca aaggcaatcc 780

tgagcgcaag actgagcaag agcagaagac tggaaaacct gatcgcacag ctgccgggag 840

aaaagaagaa cggactgttc ggaaacctga tcgcactgag cctgggactg acaccgaact 900

tcaagagcaa cttcgacctg gcagaagacg caaagctgca gctgagcaag gacacatacg 960

acgacgacct ggacaacctg ctggcacaga tcggagacca gtacgcagac ctgttcctgg 1020

cagcaaagaa cctgagcgac gcaatcctgc tgagcgacat cctgagagtc aacacagaaa 1080

tcacaaaggc accgctgagc gcaagcatga tcaagagata cgacgaacac caccaggacc 1140

tgacactgct gaaggcactg gtcagacagc agctgccgga aaagtacaag gaaatcttct 1200

tcgaccagag caagaacgga tacgcaggat acatcgacgg aggagcaagc caggaagaat 1260

tctacaagtt catcaagccg atcctggaaa agatggacgg aacagaagaa ctgctggtca 1320

agctgaacag agaagacctg ctgagaaagc agagaacatt cgacaacgga agcatcccgc 1380

accagatcca cctgggagaa ctgcacgcaa tcctgagaag acaggaagac ttctacccgt 1440

tcctgaagga caacagagaa aagatcgaaa agatcctgac attcagaatc ccgtactacg 1500

tcggaccgct ggcaagagga aacagcagat tcgcatggat gacaagaaag agcgaagaaa 1560

caatcacacc gtggaacttc gaagaagtcg tcgacaaggg agcaagcgca cagagcttca 1620

tcgaaagaat gacaaacttc gacaagaacc tgccgaacga aaaggtcctg ccgaagcaca 1680

gcctgctgta cgaatacttc acagtctaca acgaactgac aaaggtcaag tacgtcacag 1740

aaggaatgag aaagccggca ttcctgagcg gagaacagaa gaaggcaatc gtcgacctgc 1800

tgttcaagac aaacagaaag gtcacagtca agcagctgaa ggaagactac ttcaagaaga 1860

tcgaatgctt cgacagcgtc gaaatcagcg gagtcgaaga cagattcaac gcaagcctgg 1920

gaacatacca cgacctgctg aagatcatca aggacaagga cttcctggac aacgaagaaa 1980

acgaagacat cctggaagac atcgtcctga cactgacact gttcgaagac agagaaatga 2040

tcgaagaaag actgaagaca tacgcacacc tgttcgacga caaggtcatg aagcagctga 2100

agagaagaag atacacagga tggggaagac tgagcagaaa gctgatcaac ggaatcagag 2160

acaagcagag cggaaagaca atcctggact tcctgaagag cgacggattc gcaaacagaa 2220

acttcatgca gctgatccac gacgacagcc tgacattcaa ggaagacatc cagaaggcac 2280

aggtcagcgg acagggagac agcctgcacg aacacatcgc aaacctggca ggaagcccgg 2340

caatcaagaa gggaatcctg cagacagtca aggtcgtcga cgaactggtc aaggtcatgg 2400

gaagacacaa gccggaaaac atcgtcatcg aaatggcaag agaaaaccag acaacacaga 2460

agggacagaa gaacagcaga gaaagaatga agagaatcga agaaggaatc aaggaactgg 2520

gaagccagat cctgaaggaa cacccggtcg aaaacacaca gctgcagaac gaaaagctgt 2580

acctgtacta cctgcagaac ggaagagaca tgtacgtcga ccaggaactg gacatcaaca 2640

gactgagcga ctacgacgtc gaccacatcg tcccgcagag cttcctgaag gacgacagca 2700

tcgacaacaa ggtcctgaca agaagcgaca agaacagagg aaagagcgac aacgtcccga 2760

gcgaagaagt cgtcaagaag atgaagaact actggagaca gctgctgaac gcaaagctga 2820

tcacacagag aaagttcgac aacctgacaa aggcagagag aggaggactg agcgaactgg 2880

acaaggcagg attcatcaag agacagctgg tcgaaacaag acagatcaca aagcacgtcg 2940

cacagatcct ggacagcaga atgaacacaa agtacgacga aaacgacaag ctgatcagag 3000

aagtcaaggt catcacactg aagagcaagc tggtcagcga cttcagaaag gacttccagt 3060

tctacaaggt cagagaaatc aacaactacc accacgcaca cgacgcatac ctgaacgcag 3120

tcgtcggaac agcactgatc aagaagtacc cgaagctgga aagcgaattc gtctacggag 3180

actacaaggt ctacgacgtc agaaagatga tcgcaaagag cgaacaggaa atcggaaagg 3240

caacagcaaa gtacttcttc tacagcaaca tcatgaactt cttcaagaca gaaatcacac 3300

tggcaaacgg agaaatcaga aagagaccgc tgatcgaaac aaacggagaa acaggagaaa 3360

tcgtctggga caagggaaga gacttcgcaa cagtcagaaa ggtcctgagc atgccgcagg 3420

tcaacatcgt caagaagaca gaagtccaga caggaggatt cagcaaggaa agcatcctgc 3480

cgaagagaaa cagcgacaag ctgatcgcaa gaaagaagga ctgggacccg aagaagtacg 3540

gaggattcga cagcccgaca gtcgcataca gcgtcctggt cgtcgcaaag gtcgaaaagg 3600

gaaagagcaa gaagctgaag agcgtcaagg aactgctggg aatcacaatc atggaaagaa 3660

gcagcttcga aaagaacccg atcgacttcc tggaagcaaa gggatacaag gaagtcaaga 3720

aggacctgat catcaagctg ccgaagtaca gcctgttcga actggaaaac ggaagaaaga 3780

gaatgctggc aagcgcagga gaactgcaga agggaaacga actggcactg ccgagcaagt 3840

acgtcaactt cctgtacctg gcaagccact acgaaaagct gaagggaagc ccggaagaca 3900

acgaacagaa gcagctgttc gtcgaacagc acaagcacta cctggacgaa atcatcgaac 3960

agatcagcga attcagcaag agagtcatcc tggcagacgc aaacctggac aaggtcctga 4020

gcgcatacaa caagcacaga gacaagccga tcagagaaca ggcagaaaac atcatccacc 4080

tgttcacact gacaaacctg ggagcaccgg cagcattcaa gtacttcgac acaacaatcg 4140

acagaaagag atacacaagc acaaaggaag tcctggacgc aacactgatc caccagagca 4200

tcacaggact gtacgaaaca agaatcgacc tgagccagct gggaggagac ggaggaggaa 4260

gcccgaagaa gaagagaaag gtctagctag ccatcacatt taaaagcatc tcagcctacc 4320

atgagaataa gagaaagaaa atgaagatca atagcttatt catctctttt tctttttcgt 4380

tggtgtaaag ccaacaccct gtctaaaaaa cataaatttc tttaatcatt ttgcctcttt 4440

tctctgtgct tcaattaata aaaaatggaa agaacctcga g 4481

<210> 258
<211> 4348
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con 5 UTR de HBB, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, secuencia de Kozak, y 3 UTR de HBB

<400> 258
gggacatttg cttctgacac aactgtgttc actagcaacc tcaaacagac accggatctg 60

ccaccatgga caagaagtac agcatcggac tggacatcgg aacaaacagc gtcggatggg 120

cagtcatcac agacgaatac aaggtcccga gcaagaagtt caaggtcctg ggaaacacag 180

acagacacag catcaagaag aacctgatcg gagcactgct gttcgacagc ggagaaacag 240

cagaagcaac aagactgaag agaacagcaa gaagaagata cacaagaaga aagaacagaa 300

tctgctacct gcaggaaatc ttcagcaacg aaatggcaaa ggtcgacgac agcttcttcc 360

acagactgga agaaagcttc ctggtcgaag aagacaagaa gcacgaaaga cacccgatct 420

tcggaaacat cgtcgacgaa gtcgcatacc acgaaaagta cccgacaatc taccacctga 480

gaaagaagct ggtcgacagc acagacaagg cagacctgag actgatctac ctggcactgg 540

cacacatgat caagttcaga ggacacttcc tgatcgaagg agacctgaac ccggacaaca 600

gcgacgtcga caagctgttc atccagctgg tccagacata caaccagctg ttcgaagaaa 660

acccgatcaa cgcaagcgga gtcgacgcaa aggcaatcct gagcgcaaga ctgagcaaga 720

gcagaagact ggaaaacctg atcgcacagc tgccgggaga aaagaagaac ggactgttcg 780

gaaacctgat cgcactgagc ctgggactga caccgaactt caagagcaac ttcgacctgg 840

cagaagacgc aaagctgcag ctgagcaagg acacatacga cgacgacctg gacaacctgc 900

tggcacagat cggagaccag tacgcagacc tgttcctggc agcaaagaac ctgagcgacg 960

caatcctgct gagcgacatc ctgagagtca acacagaaat cacaaaggca ccgctgagcg 1020

caagcatgat caagagatac gacgaacacc accaggacct gacactgctg aaggcactgg 1080

tcagacagca gctgccggaa aagtacaagg aaatcttctt cgaccagagc aagaacggat 1140

acgcaggata catcgacgga ggagcaagcc aggaagaatt ctacaagttc atcaagccga 1200

tcctggaaaa gatggacgga acagaagaac tgctggtcaa gctgaacaga gaagacctgc 1260

tgagaaagca gagaacattc gacaacggaa gcatcccgca ccagatccac ctgggagaac 1320

tgcacgcaat cctgagaaga caggaagact tctacccgtt cctgaaggac aacagagaaa 1380

agatcgaaaa gatcctgaca ttcagaatcc cgtactacgt cggaccgctg gcaagaggaa 1440

acagcagatt cgcatggatg acaagaaaga gcgaagaaac aatcacaccg tggaacttcg 1500

aagaagtcgt cgacaaggga gcaagcgcac agagcttcat cgaaagaatg acaaacttcg 1560

acaagaacct gccgaacgaa aaggtcctgc cgaagcacag cctgctgtac gaatacttca 1620

cagtctacaa cgaactgaca aaggtcaagt acgtcacaga aggaatgaga aagccggcat 1680

tcctgagcgg agaacagaag aaggcaatcg tcgacctgct gttcaagaca aacagaaagg 1740

tcacagtcaa gcagctgaag gaagactact tcaagaagat cgaatgcttc gacagcgtcg 1800

aaatcagcgg agtcgaagac agattcaacg caagcctggg aacataccac gacctgctga 1860

agatcatcaa ggacaaggac ttcctggaca acgaagaaaa cgaagacatc ctggaagaca 1920

tcgtcctgac actgacactg ttcgaagaca gagaaatgat cgaagaaaga ctgaagacat 1980

acgcacacct gttcgacgac aaggtcatga agcagctgaa gagaagaaga tacacaggat 2040

ggggaagact gagcagaaag ctgatcaacg gaatcagaga caagcagagc ggaaagacaa 2100

tcctggactt cctgaagagc gacggattcg caaacagaaa cttcatgcag ctgatccacg 2160

acgacagcct gacattcaag gaagacatcc agaaggcaca ggtcagcgga cagggagaca 2220

gcctgcacga acacatcgca aacctggcag gaagcccggc aatcaagaag ggaatcctgc 2280

agacagtcaa ggtcgtcgac gaactggtca aggtcatggg aagacacaag ccggaaaaca 2340

tcgtcatcga aatggcaaga gaaaaccaga caacacagaa gggacagaag aacagcagag 2400

aaagaatgaa gagaatcgaa gaaggaatca aggaactggg aagccagatc ctgaaggaac 2460

acccggtcga aaacacacag ctgcagaacg aaaagctgta cctgtactac ctgcagaacg 2520

gaagagacat gtacgtcgac caggaactgg acatcaacag actgagcgac tacgacgtcg 2580

accacatcgt cccgcagagc ttcctgaagg acgacagcat cgacaacaag gtcctgacaa 2640

gaagcgacaa gaacagagga aagagcgaca acgtcccgag cgaagaagtc gtcaagaaga 2700

tgaagaacta ctggagacag ctgctgaacg caaagctgat cacacagaga aagttcgaca 2760

acctgacaaa ggcagagaga ggaggactga gcgaactgga caaggcagga ttcatcaaga 2820

gacagctggt cgaaacaaga cagatcacaa agcacgtcgc acagatcctg gacagcagaa 2880

tgaacacaaa gtacgacgaa aacgacaagc tgatcagaga agtcaaggtc atcacactga 2940

agagcaagct ggtcagcgac ttcagaaagg acttccagtt ctacaaggtc agagaaatca 3000

acaactacca ccacgcacac gacgcatacc tgaacgcagt cgtcggaaca gcactgatca 3060

agaagtaccc gaagctggaa agcgaattcg tctacggaga ctacaaggtc tacgacgtca 3120

gaaagatgat cgcaaagagc gaacaggaaa tcggaaaggc aacagcaaag tacttcttct 3180

acagcaacat catgaacttc ttcaagacag aaatcacact ggcaaacgga gaaatcagaa 3240

agagaccgct gatcgaaaca aacggagaaa caggagaaat cgtctgggac aagggaagag 3300

acttcgcaac agtcagaaag gtcctgagca tgccgcaggt caacatcgtc aagaagacag 3360

aagtccagac aggaggattc agcaaggaaa gcatcctgcc gaagagaaac agcgacaagc 3420

tgatcgcaag aaagaaggac tgggacccga agaagtacgg aggattcgac agcccgacag 3480

tcgcatacag cgtcctggtc gtcgcaaagg tcgaaaaggg aaagagcaag aagctgaaga 3540

gcgtcaagga actgctggga atcacaatca tggaaagaag cagcttcgaa aagaacccga 3600

tcgacttcct ggaagcaaag ggatacaagg aagtcaagaa ggacctgatc atcaagctgc 3660

cgaagtacag cctgttcgaa ctggaaaacg gaagaaagag aatgctggca agcgcaggag 3720

aactgcagaa gggaaacgaa ctggcactgc cgagcaagta cgtcaacttc ctgtacctgg 3780

caagccacta cgaaaagctg aagggaagcc cggaagacaa cgaacagaag cagctgttcg 3840

tcgaacagca caagcactac ctggacgaaa tcatcgaaca gatcagcgaa ttcagcaaga 3900

gagtcatcct ggcagacgca aacctggaca aggtcctgag cgcatacaac aagcacagag 3960

acaagccgat cagagaacag gcagaaaaca tcatccacct gttcacactg acaaacctgg 4020

gagcaccggc agcattcaag tacttcgaca caacaatcga cagaaagaga tacacaagca 4080

caaaggaagt cctggacgca acactgatcc accagagcat cacaggactg tacgaaacaa 4140

gaatcgacct gagccagctg ggaggagacg gaggaggaag cccgaagaag aagagaaagg 4200

tctagctagc gctcgctttc ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt tgttccctaa 4260

gtccaactac taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat tctgcctaat 4320

aaaaaacatt tattttcatt gcctcgag 4348

<210> 259
<211> 4325
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con 5 UTR de XBG, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, secuencia de Kozak, y 3 UTR de XBG

<400> 259
gggaagctca gaataaacgc tcaactttgg ccggatctgc caccatggac aagaagtaca 60

gcatcggact ggacatcgga acaaacagcg tcggatgggc agtcatcaca gacgaataca 120

aggtcccgag caagaagttc aaggtcctgg gaaacacaga cagacacagc atcaagaaga 180

acctgatcgg agcactgctg ttcgacagcg gagaaacagc agaagcaaca agactgaaga 240

gaacagcaag aagaagatac acaagaagaa agaacagaat ctgctacctg caggaaatct 300

tcagcaacga aatggcaaag gtcgacgaca gcttcttcca cagactggaa gaaagcttcc 360

tggtcgaaga agacaagaag cacgaaagac acccgatctt cggaaacatc gtcgacgaag 420

tcgcatacca cgaaaagtac ccgacaatct accacctgag aaagaagctg gtcgacagca 480

cagacaaggc agacctgaga ctgatctacc tggcactggc acacatgatc aagttcagag 540

gacacttcct gatcgaagga gacctgaacc cggacaacag cgacgtcgac aagctgttca 600

tccagctggt ccagacatac aaccagctgt tcgaagaaaa cccgatcaac gcaagcggag 660

tcgacgcaaa ggcaatcctg agcgcaagac tgagcaagag cagaagactg gaaaacctga 720

tcgcacagct gccgggagaa aagaagaacg gactgttcgg aaacctgatc gcactgagcc 780

tgggactgac accgaacttc aagagcaact tcgacctggc agaagacgca aagctgcagc 840

tgagcaagga cacatacgac gacgacctgg acaacctgct ggcacagatc ggagaccagt 900

acgcagacct gttcctggca gcaaagaacc tgagcgacgc aatcctgctg agcgacatcc 960

tgagagtcaa cacagaaatc acaaaggcac cgctgagcgc aagcatgatc aagagatacg 1020

acgaacacca ccaggacctg acactgctga aggcactggt cagacagcag ctgccggaaa 1080

agtacaagga aatcttcttc gaccagagca agaacggata cgcaggatac atcgacggag 1140

gagcaagcca ggaagaattc tacaagttca tcaagccgat cctggaaaag atggacggaa 1200

cagaagaact gctggtcaag ctgaacagag aagacctgct gagaaagcag agaacattcg 1260

acaacggaag catcccgcac cagatccacc tgggagaact gcacgcaatc ctgagaagac 1320

aggaagactt ctacccgttc ctgaaggaca acagagaaaa gatcgaaaag atcctgacat 1380

tcagaatccc gtactacgtc ggaccgctgg caagaggaaa cagcagattc gcatggatga 1440

caagaaagag cgaagaaaca atcacaccgt ggaacttcga agaagtcgtc gacaagggag 1500

caagcgcaca gagcttcatc gaaagaatga caaacttcga caagaacctg ccgaacgaaa 1560

aggtcctgcc gaagcacagc ctgctgtacg aatacttcac agtctacaac gaactgacaa 1620

aggtcaagta cgtcacagaa ggaatgagaa agccggcatt cctgagcgga gaacagaaga 1680

aggcaatcgt cgacctgctg ttcaagacaa acagaaaggt cacagtcaag cagctgaagg 1740

aagactactt caagaagatc gaatgcttcg acagcgtcga aatcagcgga gtcgaagaca 1800

gattcaacgc aagcctggga acataccacg acctgctgaa gatcatcaag gacaaggact 1860

tcctggacaa cgaagaaaac gaagacatcc tggaagacat cgtcctgaca ctgacactgt 1920

tcgaagacag agaaatgatc gaagaaagac tgaagacata cgcacacctg ttcgacgaca 1980

aggtcatgaa gcagctgaag agaagaagat acacaggatg gggaagactg agcagaaagc 2040

tgatcaacgg aatcagagac aagcagagcg gaaagacaat cctggacttc ctgaagagcg 2100

acggattcgc aaacagaaac ttcatgcagc tgatccacga cgacagcctg acattcaagg 2160

aagacatcca gaaggcacag gtcagcggac agggagacag cctgcacgaa cacatcgcaa 2220

acctggcagg aagcccggca atcaagaagg gaatcctgca gacagtcaag gtcgtcgacg 2280

aactggtcaa ggtcatggga agacacaagc cggaaaacat cgtcatcgaa atggcaagag 2340

aaaaccagac aacacagaag ggacagaaga acagcagaga aagaatgaag agaatcgaag 2400

aaggaatcaa ggaactggga agccagatcc tgaaggaaca cccggtcgaa aacacacagc 2460

tgcagaacga aaagctgtac ctgtactacc tgcagaacgg aagagacatg tacgtcgacc 2520

aggaactgga catcaacaga ctgagcgact acgacgtcga ccacatcgtc ccgcagagct 2580

tcctgaagga cgacagcatc gacaacaagg tcctgacaag aagcgacaag aacagaggaa 2640

agagcgacaa cgtcccgagc gaagaagtcg tcaagaagat gaagaactac tggagacagc 2700

tgctgaacgc aaagctgatc acacagagaa agttcgacaa cctgacaaag gcagagagag 2760

gaggactgag cgaactggac aaggcaggat tcatcaagag acagctggtc gaaacaagac 2820

agatcacaaa gcacgtcgca cagatcctgg acagcagaat gaacacaaag tacgacgaaa 2880

acgacaagct gatcagagaa gtcaaggtca tcacactgaa gagcaagctg gtcagcgact 2940

tcagaaagga cttccagttc tacaaggtca gagaaatcaa caactaccac cacgcacacg 3000

acgcatacct gaacgcagtc gtcggaacag cactgatcaa gaagtacccg aagctggaaa 3060

gcgaattcgt ctacggagac tacaaggtct acgacgtcag aaagatgatc gcaaagagcg 3120

aacaggaaat cggaaaggca acagcaaagt acttcttcta cagcaacatc atgaacttct 3180

tcaagacaga aatcacactg gcaaacggag aaatcagaaa gagaccgctg atcgaaacaa 3240

acggagaaac aggagaaatc gtctgggaca agggaagaga cttcgcaaca gtcagaaagg 3300

tcctgagcat gccgcaggtc aacatcgtca agaagacaga agtccagaca ggaggattca 3360

gcaaggaaag catcctgccg aagagaaaca gcgacaagct gatcgcaaga aagaaggact 3420

gggacccgaa gaagtacgga ggattcgaca gcccgacagt cgcatacagc gtcctggtcg 3480

tcgcaaaggt cgaaaaggga aagagcaaga agctgaagag cgtcaaggaa ctgctgggaa 3540

tcacaatcat ggaaagaagc agcttcgaaa agaacccgat cgacttcctg gaagcaaagg 3600

gatacaagga agtcaagaag gacctgatca tcaagctgcc gaagtacagc ctgttcgaac 3660

tggaaaacgg aagaaagaga atgctggcaa gcgcaggaga actgcagaag ggaaacgaac 3720

tggcactgcc gagcaagtac gtcaacttcc tgtacctggc aagccactac gaaaagctga 3780

agggaagccc ggaagacaac gaacagaagc agctgttcgt cgaacagcac aagcactacc 3840

tggacgaaat catcgaacag atcagcgaat tcagcaagag agtcatcctg gcagacgcaa 3900

acctggacaa ggtcctgagc gcatacaaca agcacagaga caagccgatc agagaacagg 3960

cagaaaacat catccacctg ttcacactga caaacctggg agcaccggca gcattcaagt 4020

acttcgacac aacaatcgac agaaagagat acacaagcac aaaggaagtc ctggacgcaa 4080

cactgatcca ccagagcatc acaggactgt acgaaacaag aatcgacctg agccagctgg 4140

gaggagacgg aggaggaagc ccgaagaaga agagaaaggt ctagctagca ccagcctcaa 4200

gaacacccga atggagtctc taagctacat aataccaact tacactttac aaaatgttgt 4260

cccccaaaat gtagccattc gtatctgctc ctaataaaaa gaaagtttct tcacattctc 4320

tcgag 4325

<210> 260
<211> 4325
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con AGG como los primeros tres nucleótidos para el uso con CleanCapTM, 5 UTR de XBG, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, secuencia de Kozak, y 3 UTR de XBG

<400> 260
aggaagctca gaataaacgc tcaactttgg ccggatctgc caccatggac aagaagtaca 60

gcatcggact ggacatcgga acaaacagcg tcggatgggc agtcatcaca gacgaataca 120

aggtcccgag caagaagttc aaggtcctgg gaaacacaga cagacacagc atcaagaaga 180

acctgatcgg agcactgctg ttcgacagcg gagaaacagc agaagcaaca agactgaaga 240

gaacagcaag aagaagatac acaagaagaa agaacagaat ctgctacctg caggaaatct 300

tcagcaacga aatggcaaag gtcgacgaca gcttcttcca cagactggaa gaaagcttcc 360

tggtcgaaga agacaagaag cacgaaagac acccgatctt cggaaacatc gtcgacgaag 420

tcgcatacca cgaaaagtac ccgacaatct accacctgag aaagaagctg gtcgacagca 480

cagacaaggc agacctgaga ctgatctacc tggcactggc acacatgatc aagttcagag 540

gacacttcct gatcgaagga gacctgaacc cggacaacag cgacgtcgac aagctgttca 600

tccagctggt ccagacatac aaccagctgt tcgaagaaaa cccgatcaac gcaagcggag 660

tcgacgcaaa ggcaatcctg agcgcaagac tgagcaagag cagaagactg gaaaacctga 720

tcgcacagct gccgggagaa aagaagaacg gactgttcgg aaacctgatc gcactgagcc 780

tgggactgac accgaacttc aagagcaact tcgacctggc agaagacgca aagctgcagc 840

tgagcaagga cacatacgac gacgacctgg acaacctgct ggcacagatc ggagaccagt 900

acgcagacct gttcctggca gcaaagaacc tgagcgacgc aatcctgctg agcgacatcc 960

tgagagtcaa cacagaaatc acaaaggcac cgctgagcgc aagcatgatc aagagatacg 1020

acgaacacca ccaggacctg acactgctga aggcactggt cagacagcag ctgccggaaa 1080

agtacaagga aatcttcttc gaccagagca agaacggata cgcaggatac atcgacggag 1140

gagcaagcca ggaagaattc tacaagttca tcaagccgat cctggaaaag atggacggaa 1200

cagaagaact gctggtcaag ctgaacagag aagacctgct gagaaagcag agaacattcg 1260

acaacggaag catcccgcac cagatccacc tgggagaact gcacgcaatc ctgagaagac 1320

aggaagactt ctacccgttc ctgaaggaca acagagaaaa gatcgaaaag atcctgacat 1380

tcagaatccc gtactacgtc ggaccgctgg caagaggaaa cagcagattc gcatggatga 1440

caagaaagag cgaagaaaca atcacaccgt ggaacttcga agaagtcgtc gacaagggag 1500

caagcgcaca gagcttcatc gaaagaatga caaacttcga caagaacctg ccgaacgaaa 1560

aggtcctgcc gaagcacagc ctgctgtacg aatacttcac agtctacaac gaactgacaa 1620

aggtcaagta cgtcacagaa ggaatgagaa agccggcatt cctgagcgga gaacagaaga 1680

aggcaatcgt cgacctgctg ttcaagacaa acagaaaggt cacagtcaag cagctgaagg 1740

aagactactt caagaagatc gaatgcttcg acagcgtcga aatcagcgga gtcgaagaca 1800

gattcaacgc aagcctggga acataccacg acctgctgaa gatcatcaag gacaaggact 1860

tcctggacaa cgaagaaaac gaagacatcc tggaagacat cgtcctgaca ctgacactgt 1920

tcgaagacag agaaatgatc gaagaaagac tgaagacata cgcacacctg ttcgacgaca 1980

aggtcatgaa gcagctgaag agaagaagat acacaggatg gggaagactg agcagaaagc 2040

tgatcaacgg aatcagagac aagcagagcg gaaagacaat cctggacttc ctgaagagcg 2100

acggattcgc aaacagaaac ttcatgcagc tgatccacga cgacagcctg acattcaagg 2160

aagacatcca gaaggcacag gtcagcggac agggagacag cctgcacgaa cacatcgcaa 2220

acctggcagg aagcccggca atcaagaagg gaatcctgca gacagtcaag gtcgtcgacg 2280

aactggtcaa ggtcatggga agacacaagc cggaaaacat cgtcatcgaa atggcaagag 2340

aaaaccagac aacacagaag ggacagaaga acagcagaga aagaatgaag agaatcgaag 2400

aaggaatcaa ggaactggga agccagatcc tgaaggaaca cccggtcgaa aacacacagc 2460

tgcagaacga aaagctgtac ctgtactacc tgcagaacgg aagagacatg tacgtcgacc 2520

aggaactgga catcaacaga ctgagcgact acgacgtcga ccacatcgtc ccgcagagct 2580

tcctgaagga cgacagcatc gacaacaagg tcctgacaag aagcgacaag aacagaggaa 2640

agagcgacaa cgtcccgagc gaagaagtcg tcaagaagat gaagaactac tggagacagc 2700

tgctgaacgc aaagctgatc acacagagaa agttcgacaa cctgacaaag gcagagagag 2760

gaggactgag cgaactggac aaggcaggat tcatcaagag acagctggtc gaaacaagac 2820

agatcacaaa gcacgtcgca cagatcctgg acagcagaat gaacacaaag tacgacgaaa 2880

acgacaagct gatcagagaa gtcaaggtca tcacactgaa gagcaagctg gtcagcgact 2940

tcagaaagga cttccagttc tacaaggtca gagaaatcaa caactaccac cacgcacacg 3000

acgcatacct gaacgcagtc gtcggaacag cactgatcaa gaagtacccg aagctggaaa 3060

gcgaattcgt ctacggagac tacaaggtct acgacgtcag aaagatgatc gcaaagagcg 3120

aacaggaaat cggaaaggca acagcaaagt acttcttcta cagcaacatc atgaacttct 3180

tcaagacaga aatcacactg gcaaacggag aaatcagaaa gagaccgctg atcgaaacaa 3240

acggagaaac aggagaaatc gtctgggaca agggaagaga cttcgcaaca gtcagaaagg 3300

tcctgagcat gccgcaggtc aacatcgtca agaagacaga agtccagaca ggaggattca 3360

gcaaggaaag catcctgccg aagagaaaca gcgacaagct gatcgcaaga aagaaggact 3420

gggacccgaa gaagtacgga ggattcgaca gcccgacagt cgcatacagc gtcctggtcg 3480

tcgcaaaggt cgaaaaggga aagagcaaga agctgaagag cgtcaaggaa ctgctgggaa 3540

tcacaatcat ggaaagaagc agcttcgaaa agaacccgat cgacttcctg gaagcaaagg 3600

gatacaagga agtcaagaag gacctgatca tcaagctgcc gaagtacagc ctgttcgaac 3660

tggaaaacgg aagaaagaga atgctggcaa gcgcaggaga actgcagaag ggaaacgaac 3720

tggcactgcc gagcaagtac gtcaacttcc tgtacctggc aagccactac gaaaagctga 3780

agggaagccc ggaagacaac gaacagaagc agctgttcgt cgaacagcac aagcactacc 3840

tggacgaaat catcgaacag atcagcgaat tcagcaagag agtcatcctg gcagacgcaa 3900

acctggacaa ggtcctgagc gcatacaaca agcacagaga caagccgatc agagaacagg 3960

cagaaaacat catccacctg ttcacactga caaacctggg agcaccggca gcattcaagt 4020

acttcgacac aacaatcgac agaaagagat acacaagcac aaaggaagtc ctggacgcaa 4080

cactgatcca ccagagcatc acaggactgt acgaaacaag aatcgacctg agccagctgg 4140

gaggagacgg aggaggaagc ccgaagaaga agagaaaggt ctagctagca ccagcctcaa 4200

gaacacccga atggagtctc taagctacat aataccaact tacactttac aaaatgttgt 4260

cccccaaaat gtagccattc gtatctgctc ctaataaaaa gaaagtttct tcacattctc 4320

tcgag 4325

<210> 261
<211> 4411
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito de Cas9 con AGG como los primeros tres nucleótidos para el uso con CleanCapTM, 5 UTR de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 204, secuencia de Kozak, y 3 UTR de ALB

<400> 261
aggtcccgca gtcggcgtcc agcggctctg cttgttcgtg tgtgtgtcgt tgcaggcctt 60

attcggatcc gccaccatgg acaagaagta cagcatcgga ctggacatcg gaacaaacag 120

cgtcggatgg gcagtcatca cagacgaata caaggtcccg agcaagaagt tcaaggtcct 180

gggaaacaca gacagacaca gcatcaagaa gaacctgatc ggagcactgc tgttcgacag 240

cggagaaaca gcagaagcaa caagactgaa gagaacagca agaagaagat acacaagaag 300

aaagaacaga atctgctacc tgcaggaaat cttcagcaac gaaatggcaa aggtcgacga 360

cagcttcttc cacagactgg aagaaagctt cctggtcgaa gaagacaaga agcacgaaag 420

acacccgatc ttcggaaaca tcgtcgacga agtcgcatac cacgaaaagt acccgacaat 480

ctaccacctg agaaagaagc tggtcgacag cacagacaag gcagacctga gactgatcta 540

cctggcactg gcacacatga tcaagttcag aggacacttc ctgatcgaag gagacctgaa 600

cccggacaac agcgacgtcg acaagctgtt catccagctg gtccagacat acaaccagct 660

gttcgaagaa aacccgatca acgcaagcgg agtcgacgca aaggcaatcc tgagcgcaag 720

actgagcaag agcagaagac tggaaaacct gatcgcacag ctgccgggag aaaagaagaa 780

cggactgttc ggaaacctga tcgcactgag cctgggactg acaccgaact tcaagagcaa 840

cttcgacctg gcagaagacg caaagctgca gctgagcaag gacacatacg acgacgacct 900

ggacaacctg ctggcacaga tcggagacca gtacgcagac ctgttcctgg cagcaaagaa 960

cctgagcgac gcaatcctgc tgagcgacat cctgagagtc aacacagaaa tcacaaaggc 1020

accgctgagc gcaagcatga tcaagagata cgacgaacac caccaggacc tgacactgct 1080

gaaggcactg gtcagacagc agctgccgga aaagtacaag gaaatcttct tcgaccagag 1140

caagaacgga tacgcaggat acatcgacgg aggagcaagc caggaagaat tctacaagtt 1200

catcaagccg atcctggaaa agatggacgg aacagaagaa ctgctggtca agctgaacag 1260

agaagacctg ctgagaaagc agagaacatt cgacaacgga agcatcccgc accagatcca 1320

cctgggagaa ctgcacgcaa tcctgagaag acaggaagac ttctacccgt tcctgaagga 1380

caacagagaa aagatcgaaa agatcctgac attcagaatc ccgtactacg tcggaccgct 1440

ggcaagagga aacagcagat tcgcatggat gacaagaaag agcgaagaaa caatcacacc 1500

gtggaacttc gaagaagtcg tcgacaaggg agcaagcgca cagagcttca tcgaaagaat 1560

gacaaacttc gacaagaacc tgccgaacga aaaggtcctg ccgaagcaca gcctgctgta 1620

cgaatacttc acagtctaca acgaactgac aaaggtcaag tacgtcacag aaggaatgag 1680

aaagccggca ttcctgagcg gagaacagaa gaaggcaatc gtcgacctgc tgttcaagac 1740

aaacagaaag gtcacagtca agcagctgaa ggaagactac ttcaagaaga tcgaatgctt 1800

cgacagcgtc gaaatcagcg gagtcgaaga cagattcaac gcaagcctgg gaacatacca 1860

cgacctgctg aagatcatca aggacaagga cttcctggac aacgaagaaa acgaagacat 1920

cctggaagac atcgtcctga cactgacact gttcgaagac agagaaatga tcgaagaaag 1980

actgaagaca tacgcacacc tgttcgacga caaggtcatg aagcagctga agagaagaag 2040

atacacagga tggggaagac tgagcagaaa gctgatcaac ggaatcagag acaagcagag 2100

cggaaagaca atcctggact tcctgaagag cgacggattc gcaaacagaa acttcatgca 2160

gctgatccac gacgacagcc tgacattcaa ggaagacatc cagaaggcac aggtcagcgg 2220

acagggagac agcctgcacg aacacatcgc aaacctggca ggaagcccgg caatcaagaa 2280

gggaatcctg cagacagtca aggtcgtcga cgaactggtc aaggtcatgg gaagacacaa 2340

gccggaaaac atcgtcatcg aaatggcaag agaaaaccag acaacacaga agggacagaa 2400

gaacagcaga gaaagaatga agagaatcga agaaggaatc aaggaactgg gaagccagat 2460

cctgaaggaa cacccggtcg aaaacacaca gctgcagaac gaaaagctgt acctgtacta 2520

cctgcagaac ggaagagaca tgtacgtcga ccaggaactg gacatcaaca gactgagcga 2580

ctacgacgtc gaccacatcg tcccgcagag cttcctgaag gacgacagca tcgacaacaa 2640

ggtcctgaca agaagcgaca agaacagagg aaagagcgac aacgtcccga gcgaagaagt 2700

cgtcaagaag atgaagaact actggagaca gctgctgaac gcaaagctga tcacacagag 2760

aaagttcgac aacctgacaa aggcagagag aggaggactg agcgaactgg acaaggcagg 2820

attcatcaag agacagctgg tcgaaacaag acagatcaca aagcacgtcg cacagatcct 2880

ggacagcaga atgaacacaa agtacgacga aaacgacaag ctgatcagag aagtcaaggt 2940

catcacactg aagagcaagc tggtcagcga cttcagaaag gacttccagt tctacaaggt 3000

cagagaaatc aacaactacc accacgcaca cgacgcatac ctgaacgcag tcgtcggaac 3060

agcactgatc aagaagtacc cgaagctgga aagcgaattc gtctacggag actacaaggt 3120

ctacgacgtc agaaagatga tcgcaaagag cgaacaggaa atcggaaagg caacagcaaa 3180

gtacttcttc tacagcaaca tcatgaactt cttcaagaca gaaatcacac tggcaaacgg 3240

agaaatcaga aagagaccgc tgatcgaaac aaacggagaa acaggagaaa tcgtctggga 3300

caagggaaga gacttcgcaa cagtcagaaa ggtcctgagc atgccgcagg tcaacatcgt 3360

caagaagaca gaagtccaga caggaggatt cagcaaggaa agcatcctgc cgaagagaaa 3420

cagcgacaag ctgatcgcaa gaaagaagga ctgggacccg aagaagtacg gaggattcga 3480

cagcccgaca gtcgcataca gcgtcctggt cgtcgcaaag gtcgaaaagg gaaagagcaa 3540

gaagctgaag agcgtcaagg aactgctggg aatcacaatc atggaaagaa gcagcttcga 3600

aaagaacccg atcgacttcc tggaagcaaa gggatacaag gaagtcaaga aggacctgat 3660

catcaagctg ccgaagtaca gcctgttcga actggaaaac ggaagaaaga gaatgctggc 3720

aagcgcagga gaactgcaga agggaaacga actggcactg ccgagcaagt acgtcaactt 3780

cctgtacctg gcaagccact acgaaaagct gaagggaagc ccggaagaca acgaacagaa 3840

gcagctgttc gtcgaacagc acaagcacta cctggacgaa atcatcgaac agatcagcga 3900

attcagcaag agagtcatcc tggcagacgc aaacctggac aaggtcctga gcgcatacaa 3960

caagcacaga gacaagccga tcagagaaca ggcagaaaac atcatccacc tgttcacact 4020

gacaaacctg ggagcaccgg cagcattcaa gtacttcgac acaacaatcg acagaaagag 4080

atacacaagc acaaaggaag tcctggacgc aacactgatc caccagagca tcacaggact 4140

gtacgaaaca agaatcgacc tgagccagct gggaggagac ggaggaggaa gcccgaagaa 4200

gaagagaaag gtctagctag ccatcacatt taaaagcatc tcagcctacc atgagaataa 4260

gagaaagaaa atgaagatca atagcttatt catctctttt tctttttcgt tggtgtaaag 4320

ccaacaccct gtctaaaaaa cataaatttc tttaatcatt ttgcctcttt tctctgtgct 4380

tcaattaata aaaaatggaa agaacctcga g 4411

<210> 262

<400> 262
000

<210> 263
<211> 93
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia poli-A 100

<400> 263
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 93

<210> 264
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARN de guía única G209 dirigido al gen TTR de ratón

<400> 264
aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc cacc 44

<210> 265
<211> 3312
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis que usa codones de mínima uridina, con codones de inicio y parada

<400> 265
atggcagcat tcaagccgaa ctcgatcaac tacatcctgg gactggacat cggaatcgca 60

tcggtcggat gggcaatggt cgaaatcgac gaagaagaaa acccgatcag actgatcgac 120

ctgggagtca gagtcttcga aagagcagaa gtcccgaaga caggagactc gctggcaatg 180

gcaagaagac tggcaagatc ggtcagaaga ctgacaagaa gaagagcaca cagactgctg 240

agaacaagaa gactgctgaa gagagaagga gtcctgcagg cagcaaactt cgacgaaaac 300

ggactgatca agtcgctgcc gaacacaccg tggcagctga gagcagcagc actggacaga 360

aagctgacac cgctggaatg gtcggcagtc ctgctgcacc tgatcaagca cagaggatac 420

ctgtcgcaga gaaagaacga aggagaaaca gcagacaagg aactgggagc actgctgaag 480

ggagtcgcag gaaacgcaca cgcactgcag acaggagact tcagaacacc ggcagaactg 540

gcactgaaca agttcgaaaa ggaatcggga cacatcagaa accagagatc ggactactcg 600

cacacattct cgagaaagga cctgcaggca gaactgatcc tgctgttcga aaagcagaag 660

gaattcggaa acccgcacgt ctcgggagga ctgaaggaag gaatcgaaac actgctgatg 720

acacagagac cggcactgtc gggagacgca gtccagaaga tgctgggaca ctgcacattc 780

gaaccggcag aaccgaaggc agcaaagaac acatacacag cagaaagatt catctggctg 840

acaaagctga acaacctgag aatcctggaa cagggatcgg aaagaccgct gacagacaca 900

gaaagagcaa cactgatgga cgaaccgtac agaaagtcga agctgacata cgcacaggca 960

agaaagctgc tgggactgga agacacagca ttcttcaagg gactgagata cggaaaggac 1020

aacgcagaag catcgacact gatggaaatg aaggcatacc acgcaatctc gagagcactg 1080

gaaaaggaag gactgaagga caagaagtcg ccgctgaacc tgtcgccgga actgcaggac 1140

gaaatcggaa cagcattctc gctgttcaag acagacgaag acatcacagg aagactgaag 1200

gacagaatcc agccggaaat cctggaagca ctgctgaagc acatctcgtt cgacaagttc 1260

gtccagatct cgctgaaggc actgagaaga atcgtcccgc tgatggaaca gggaaagaga 1320

tacgacgaag catgcgcaga aatctacgga gaccactacg gaaagaagaa cacagaagaa 1380

aagatctacc tgccgccgat cccggcagac gaaatcagaa acccggtcgt cctgagagca 1440

ctgtcgcagg caagaaaggt catcaacgga gtcgtcagaa gatacggatc gccggcaaga 1500

atccacatcg aaacagcaag agaagtcgga aagtcgttca aggacagaaa ggaaatcgaa 1560

aagagacagg aagaaaacag aaaggacaga gaaaaggcag cagcaaagtt cagagaatac 1620

ttcccgaact tcgtcggaga accgaagtcg aaggacatcc tgaagctgag actgtacgaa 1680

cagcagcacg gaaagtgcct gtactcggga aaggaaatca acctgggaag actgaacgaa 1740

aagggatacg tcgaaatcga ccacgcactg ccgttctcga gaacatggga cgactcgttc 1800

aacaacaagg tcctggtcct gggatcggaa aaccagaaca agggaaacca gacaccgtac 1860

gaatacttca acggaaagga caactcgaga gaatggcagg aattcaaggc aagagtcgaa 1920

acatcgagat tcccgagatc gaagaagcag agaatcctgc tgcagaagtt cgacgaagac 1980

ggattcaagg aaagaaacct gaacgacaca agatacgtca acagattcct gtgccagttc 2040

gtcgcagaca gaatgagact gacaggaaag ggaaagaaga gagtcttcgc atcgaacgga 2100

cagatcacaa acctgctgag aggattctgg ggactgagaa aggtcagagc agaaaacgac 2160

agacaccacg cactggacgc agtcgtcgtc gcatgctcga cagtcgcaat gcagcagaag 2220

atcacaagat tcgtcagata caaggaaatg aacgcattcg acggaaagac aatcgacaag 2280

gaaacaggag aagtcctgca ccagaagaca cacttcccgc agccgtggga attcttcgca 2340

caggaagtca tgatcagagt cttcggaaag ccggacggaa agccggaatt cgaagaagca 2400

gacacactgg aaaagctgag aacactgctg gcagaaaagc tgtcgtcgag accggaagca 2460

gtccacgaat acgtcacacc gctgttcgtc tcgagagcac cgaacagaaa gatgtcggga 2520

cagggacaca tggaaacagt caagtcggca aagagactgg acgaaggagt ctcggtcctg 2580

agagtcccgc tgacacagct gaagctgaag gacctggaaa agatggtcaa cagagaaaga 2640

gaaccgaagc tgtacgaagc actgaaggca agactggaag cacacaagga cgacccggca 2700

aaggcattcg cagaaccgtt ctacaagtac gacaaggcag gaaacagaac acagcaggtc 2760

aaggcagtca gagtcgaaca ggtccagaag acaggagtct gggtcagaaa ccacaacgga 2820

atcgcagaca acgcaacaat ggtcagagta gacgtcttcg aaaagggaga caagtactac 2880

ctggtcccga tctactcgtg gcaggtcgca aagggaatcc tgccggacag agcagtcgtc 2940

cagggaaagg acgaagaaga ctggcagctg atcgacgact cgttcaactt caagttctcg 3000

ctgcacccga acgacctggt cgaagtcatc acaaagaagg caagaatgtt cggatacttc 3060

gcatcgtgcc acagaggaac aggaaacatc aacatcagaa tccacgacct ggaccacaag 3120

atcggaaaga acggaatcct ggaaggaatc ggagtcaaga cagcactgtc gttccagaag 3180

taccagatcg acgaactggg aaaggaaatc agaccgtgca gactgaagaa gagaccgccg 3240

gtcagatccg gaaagagaac agcagacgga tcggaattcg aatcgccgaa gaagaagaga 3300

aaggtcgaat ga 3312

<210> 266
<211> 3306
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ORF que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis que usa codones de mínima uridina (sin codones de inicio y parada; adecuado para su inclusión en la secuencia de codificación de proteínas de fusión)

<400> 266
gcagcattca agccgaactc gatcaactac atcctgggac tggacatcgg aatcgcatcg 60

gtcggatggg caatggtcga aatcgacgaa gaagaaaacc cgatcagact gatcgacctg 120

ggagtcagag tcttcgaaag agcagaagtc ccgaagacag gagactcgct ggcaatggca 180

agaagactgg caagatcggt cagaagactg acaagaagaa gagcacacag actgctgaga 240

acaagaagac tgctgaagag agaaggagtc ctgcaggcag caaacttcga cgaaaacgga 300

ctgatcaagt cgctgccgaa cacaccgtgg cagctgagag cagcagcact ggacagaaag 360

ctgacaccgc tggaatggtc ggcagtcctg ctgcacctga tcaagcacag aggatacctg 420

tcgcagagaa agaacgaagg agaaacagca gacaaggaac tgggagcact gctgaaggga 480

gtcgcaggaa acgcacacgc actgcagaca ggagacttca gaacaccggc agaactggca 540

ctgaacaagt tcgaaaagga atcgggacac atcagaaacc agagatcgga ctactcgcac 600

acattctcga gaaaggacct gcaggcagaa ctgatcctgc tgttcgaaaa gcagaaggaa 660

ttcggaaacc cgcacgtctc gggaggactg aaggaaggaa tcgaaacact gctgatgaca 720

cagagaccgg cactgtcggg agacgcagtc cagaagatgc tgggacactg cacattcgaa 780

ccggcagaac cgaaggcagc aaagaacaca tacacagcag aaagattcat ctggctgaca 840

aagctgaaca acctgagaat cctggaacag ggatcggaaa gaccgctgac agacacagaa 900

agagcaacac tgatggacga accgtacaga aagtcgaagc tgacatacgc acaggcaaga 960

aagctgctgg gactggaaga cacagcattc ttcaagggac tgagatacgg aaaggacaac 1020

gcagaagcat cgacactgat ggaaatgaag gcataccacg caatctcgag agcactggaa 1080

aaggaaggac tgaaggacaa gaagtcgccg ctgaacctgt cgccggaact gcaggacgaa 1140

atcggaacag cattctcgct gttcaagaca gacgaagaca tcacaggaag actgaaggac 1200

agaatccagc cggaaatcct ggaagcactg ctgaagcaca tctcgttcga caagttcgtc 1260

cagatctcgc tgaaggcact gagaagaatc gtcccgctga tggaacaggg aaagagatac 1320

gacgaagcat gcgcagaaat ctacggagac cactacggaa agaagaacac agaagaaaag 1380

atctacctgc cgccgatccc ggcagacgaa atcagaaacc cggtcgtcct gagagcactg 1440

tcgcaggcaa gaaaggtcat caacggagtc gtcagaagat acggatcgcc ggcaagaatc 1500

cacatcgaaa cagcaagaga agtcggaaag tcgttcaagg acagaaagga aatcgaaaag 1560

agacaggaag aaaacagaaa ggacagagaa aaggcagcag caaagttcag agaatacttc 1620

ccgaacttcg tcggagaacc gaagtcgaag gacatcctga agctgagact gtacgaacag 1680

cagcacggaa agtgcctgta ctcgggaaag gaaatcaacc tgggaagact gaacgaaaag 1740

ggatacgtcg aaatcgacca cgcactgccg ttctcgagaa catgggacga ctcgttcaac 1800

aacaaggtcc tggtcctggg atcggaaaac cagaacaagg gaaaccagac accgtacgaa 1860

tacttcaacg gaaaggacaa ctcgagagaa tggcaggaat tcaaggcaag agtcgaaaca 1920

tcgagattcc cgagatcgaa gaagcagaga atcctgctgc agaagttcga cgaagacgga 1980

ttcaaggaaa gaaacctgaa cgacacaaga tacgtcaaca gattcctgtg ccagttcgtc 2040

gcagacagaa tgagactgac aggaaaggga aagaagagag tcttcgcatc gaacggacag 2100

atcacaaacc tgctgagagg attctgggga ctgagaaagg tcagagcaga aaacgacaga 2160

caccacgcac tggacgcagt cgtcgtcgca tgctcgacag tcgcaatgca gcagaagatc 2220

acaagattcg tcagatacaa ggaaatgaac gcattcgacg gaaagacaat cgacaaggaa 2280

acaggagaag tcctgcacca gaagacacac ttcccgcagc cgtgggaatt cttcgcacag 2340

gaagtcatga tcagagtctt cggaaagccg gacggaaagc cggaattcga agaagcagac 2400

acactggaaa agctgagaac actgctggca gaaaagctgt cgtcgagacc ggaagcagtc 2460

cacgaatacg tcacaccgct gttcgtctcg agagcaccga acagaaagat gtcgggacag 2520

ggacacatgg aaacagtcaa gtcggcaaag agactggacg aaggagtctc ggtcctgaga 2580

gtcccgctga cacagctgaa gctgaaggac ctggaaaaga tggtcaacag agaaagagaa 2640

ccgaagctgt acgaagcact gaaggcaaga ctggaagcac acaaggacga cccggcaaag 2700

gcattcgcag aaccgttcta caagtacgac aaggcaggaa acagaacaca gcaggtcaag 2760

gcagtcagag tcgaacaggt ccagaagaca ggagtctggg tcagaaacca caacggaatc 2820

gcagacaacg caacaatggt cagagtagac gtcttcgaaa agggagacaa gtactacctg 2880

gtcccgatct actcgtggca ggtcgcaaag ggaatcctgc cggacagagc agtcgtccag 2940

ggaaaggacg aagaagactg gcagctgatc gacgactcgt tcaacttcaa gttctcgctg 3000

cacccgaacg acctggtcga agtcatcaca aagaaggcaa gaatgttcgg atacttcgca 3060

tcgtgccaca gaggaacagg aaacatcaac atcagaatcc acgacctgga ccacaagatc 3120

ggaaagaacg gaatcctgga aggaatcgga gtcaagacag cactgtcgtt ccagaagtac 3180

cagatcgacg aactgggaaa ggaaatcaga ccgtgcagac tgaagaagag accgccggtc 3240

agatccggaa agagaacagc agacggatcg gaattcgaat cgccgaagaa gaagagaaag 3300

gtcgaa 3306

<210> 267
<211> 3636
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: transcrito que comprende la SEQ ID NO: 265 (que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis)

<400> 267
gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttgga tccgccacca tggcagcatt 60

caagccgaac tcgatcaact acatcctggg actggacatc ggaatcgcat cggtcggatg 120

ggcaatggtc gaaatcgacg aagaagaaaa cccgatcaga ctgatcgacc tgggagtcag 180

agtcttcgaa agagcagaag tcccgaagac aggagactcg ctggcaatgg caagaagact 240

ggcaagatcg gtcagaagac tgacaagaag aagagcacac agactgctga gaacaagaag 300

actgctgaag agagaaggag tcctgcaggc agcaaacttc gacgaaaacg gactgatcaa 360

gtcgctgccg aacacaccgt ggcagctgag agcagcagca ctggacagaa agctgacacc 420

gctggaatgg tcggcagtcc tgctgcacct gatcaagcac agaggatacc tgtcgcagag 480

aaagaacgaa ggagaaacag cagacaagga actgggagca ctgctgaagg gagtcgcagg 540

aaacgcacac gcactgcaga caggagactt cagaacaccg gcagaactgg cactgaacaa 600

gttcgaaaag gaatcgggac acatcagaaa ccagagatcg gactactcgc acacattctc 660

gagaaaggac ctgcaggcag aactgatcct gctgttcgaa aagcagaagg aattcggaaa 720

cccgcacgtc tcgggaggac tgaaggaagg aatcgaaaca ctgctgatga cacagagacc 780

ggcactgtcg ggagacgcag tccagaagat gctgggacac tgcacattcg aaccggcaga 840

accgaaggca gcaaagaaca catacacagc agaaagattc atctggctga caaagctgaa 900

caacctgaga atcctggaac agggatcgga aagaccgctg acagacacag aaagagcaac 960

actgatggac gaaccgtaca gaaagtcgaa gctgacatac gcacaggcaa gaaagctgct 1020

gggactggaa gacacagcat tcttcaaggg actgagatac ggaaaggaca acgcagaagc 1080

atcgacactg atggaaatga aggcatacca cgcaatctcg agagcactgg aaaaggaagg 1140

actgaaggac aagaagtcgc cgctgaacct gtcgccggaa ctgcaggacg aaatcggaac 1200

agcattctcg ctgttcaaga cagacgaaga catcacagga agactgaagg acagaatcca 1260

gccggaaatc ctggaagcac tgctgaagca catctcgttc gacaagttcg tccagatctc 1320

gctgaaggca ctgagaagaa tcgtcccgct gatggaacag ggaaagagat acgacgaagc 1380

atgcgcagaa atctacggag accactacgg aaagaagaac acagaagaaa agatctacct 1440

gccgccgatc ccggcagacg aaatcagaaa cccggtcgtc ctgagagcac tgtcgcaggc 1500

aagaaaggtc atcaacggag tcgtcagaag atacggatcg ccggcaagaa tccacatcga 1560

aacagcaaga gaagtcggaa agtcgttcaa ggacagaaag gaaatcgaaa agagacagga 1620

agaaaacaga aaggacagag aaaaggcagc agcaaagttc agagaatact tcccgaactt 1680

cgtcggagaa ccgaagtcga aggacatcct gaagctgaga ctgtacgaac agcagcacgg 1740

aaagtgcctg tactcgggaa aggaaatcaa cctgggaaga ctgaacgaaa agggatacgt 1800

cgaaatcgac cacgcactgc cgttctcgag aacatgggac gactcgttca acaacaaggt 1860

cctggtcctg ggatcggaaa accagaacaa gggaaaccag acaccgtacg aatacttcaa 1920

cggaaaggac aactcgagag aatggcagga attcaaggca agagtcgaaa catcgagatt 1980

cccgagatcg aagaagcaga gaatcctgct gcagaagttc gacgaagacg gattcaagga 2040

aagaaacctg aacgacacaa gatacgtcaa cagattcctg tgccagttcg tcgcagacag 2100

aatgagactg acaggaaagg gaaagaagag agtcttcgca tcgaacggac agatcacaaa 2160

cctgctgaga ggattctggg gactgagaaa ggtcagagca gaaaacgaca gacaccacgc 2220

actggacgca gtcgtcgtcg catgctcgac agtcgcaatg cagcagaaga tcacaagatt 2280

cgtcagatac aaggaaatga acgcattcga cggaaagaca atcgacaagg aaacaggaga 2340

agtcctgcac cagaagacac acttcccgca gccgtgggaa ttcttcgcac aggaagtcat 2400

gatcagagtc ttcggaaagc cggacggaaa gccggaattc gaagaagcag acacactgga 2460

aaagctgaga acactgctgg cagaaaagct gtcgtcgaga ccggaagcag tccacgaata 2520

cgtcacaccg ctgttcgtct cgagagcacc gaacagaaag atgtcgggac agggacacat 2580

ggaaacagtc aagtcggcaa agagactgga cgaaggagtc tcggtcctga gagtcccgct 2640

gacacagctg aagctgaagg acctggaaaa gatggtcaac agagaaagag aaccgaagct 2700

gtacgaagca ctgaaggcaa gactggaagc acacaaggac gacccggcaa aggcattcgc 2760

agaaccgttc tacaagtacg acaaggcagg aaacagaaca cagcaggtca aggcagtcag 2820

agtcgaacag gtccagaaga caggagtctg ggtcagaaac cacaacggaa tcgcagacaa 2880

cgcaacaatg gtcagagtag acgtcttcga aaagggagac aagtactacc tggtcccgat 2940

ctactcgtgg caggtcgcaa agggaatcct gccggacaga gcagtcgtcc agggaaagga 3000

cgaagaagac tggcagctga tcgacgactc gttcaacttc aagttctcgc tgcacccgaa 3060

cgacctggtc gaagtcatca caaagaaggc aagaatgttc ggatacttcg catcgtgcca 3120

cagaggaaca ggaaacatca acatcagaat ccacgacctg gaccacaaga tcggaaagaa 3180

cggaatcctg gaaggaatcg gagtcaagac agcactgtcg ttccagaagt accagatcga 3240

cgaactggga aaggaaatca gaccgtgcag actgaagaag agaccgccgg tcagatccgg 3300

aaagagaaca gcagacggat cggaattcga atcgccgaag aagaagagaa aggtcgaatg 3360

atagctagct cgagtctaga gggcccgttt aaacccgctg atcagcctcg actgtgcctt 3420

ctagttgcca gccatctgtt gtttgcccct cccccgtgcc ttccttgacc ctggaaggtg 3480

ccactcccac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcattgt ctgagtaggt 3540

gtcattctat tctgggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca 3600

atagcaggca tgctggggat gcggtgggct ctatgg 3636

<210> 268
<211> 1103
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de aminoácidos de Cas9 de Neisseria meningitidis

<400> 268

Met Ala Ala Phe Lys Pro Asn Ser Ile Asn Tyr Ile Leu Gly Leu Asp
1 5 10 15

Ile Gly Ile Ala Ser Val Gly Trp Ala Met Val Glu Ile Asp Glu Glu
20 25 30

Glu Asn Pro Ile Arg Leu Ile Asp Leu Gly Val Arg Val Phe Glu Arg
35 40 45

Ala Glu Val Pro Lys Thr Gly Asp Ser Leu Ala Met Ala Arg Arg Leu
50 55 60

Ala Arg Ser Val Arg Arg Leu Thr Arg Arg Arg Ala His Arg Leu Leu
65 70 75 80

Arg Thr Arg Arg Leu Leu Lys Arg Glu Gly Val Leu Gln Ala Ala Asn
85 90 95

Phe Asp Glu Asn Gly Leu Ile Lys Ser Leu Pro Asn Thr Pro Trp Gln
100 105 110

Leu Arg Ala Ala Ala Leu Asp Arg Lys Leu Thr Pro Leu Glu Trp Ser
115 120 125

Ala Val Leu Leu His Leu Ile Lys His Arg Gly Tyr Leu Ser Gln Arg
130 135 140

Lys Asn Glu Gly Glu Thr Ala Asp Lys Glu Leu Gly Ala Leu Leu Lys
145 150 155 160

Gly Val Ala Gly Asn Ala His Ala Leu Gln Thr Gly Asp Phe Arg Thr
165 170 175

Pro Ala Glu Leu Ala Leu Asn Lys Phe Glu Lys Glu Ser Gly His Ile
180 185 190

Arg Asn Gln Arg Ser Asp Tyr Ser His Thr Phe Ser Arg Lys Asp Leu
195 200 205

Gln Ala Glu Leu Ile Leu Leu Phe Glu Lys Gln Lys Glu Phe Gly Asn
210 215 220

Pro His Val Ser Gly Gly Leu Lys Glu Gly Ile Glu Thr Leu Leu Met
225 230 235 240

Thr Gln Arg Pro Ala Leu Ser Gly Asp Ala Val Gln Lys Met Leu Gly
245 250 255

His Cys Thr Phe Glu Pro Ala Glu Pro Lys Ala Ala Lys Asn Thr Tyr
260 265 270

Thr Ala Glu Arg Phe Ile Trp Leu Thr Lys Leu Asn Asn Leu Arg Ile
275 280 285

Leu Glu Gln Gly Ser Glu Arg Pro Leu Thr Asp Thr Glu Arg Ala Thr
290 295 300

Leu Met Asp Glu Pro Tyr Arg Lys Ser Lys Leu Thr Tyr Ala Gln Ala
305 310 315 320

Arg Lys Leu Leu Gly Leu Glu Asp Thr Ala Phe Phe Lys Gly Leu Arg
325 330 335

Tyr Gly Lys Asp Asn Ala Glu Ala Ser Thr Leu Met Glu Met Lys Ala
340 345 350

Tyr His Ala Ile Ser Arg Ala Leu Glu Lys Glu Gly Leu Lys Asp Lys
355 360 365

Lys Ser Pro Leu Asn Leu Ser Pro Glu Leu Gln Asp Glu Ile Gly Thr
370 375 380

Ala Phe Ser Leu Phe Lys Thr Asp Glu Asp Ile Thr Gly Arg Leu Lys
385 390 395 400

Asp Arg Ile Gln Pro Glu Ile Leu Glu Ala Leu Leu Lys His Ile Ser
405 410 415

Phe Asp Lys Phe Val Gln Ile Ser Leu Lys Ala Leu Arg Arg Ile Val
420 425 430

Pro Leu Met Glu Gln Gly Lys Arg Tyr Asp Glu Ala Cys Ala Glu Ile
435 440 445

Tyr Gly Asp His Tyr Gly Lys Lys Asn Thr Glu Glu Lys Ile Tyr Leu
450 455 460

Pro Pro Ile Pro Ala Asp Glu Ile Arg Asn Pro Val Val Leu Arg Ala
465 470 475 480

Leu Ser Gln Ala Arg Lys Val Ile Asn Gly Val Val Arg Arg Tyr Gly
485 490 495

Ser Pro Ala Arg Ile His Ile Glu Thr Ala Arg Glu Val Gly Lys Ser
500 505 510

Phe Lys Asp Arg Lys Glu Ile Glu Lys Arg Gln Glu Glu Asn Arg Lys
515 520 525

Asp Arg Glu Lys Ala Ala Ala Lys Phe Arg Glu Tyr Phe Pro Asn Phe
530 535 540

Val Gly Glu Pro Lys Ser Lys Asp Ile Leu Lys Leu Arg Leu Tyr Glu
545 550 555 560

Gln Gln His Gly Lys Cys Leu Tyr Ser Gly Lys Glu Ile Asn Leu Gly
565 570 575

Arg Leu Asn Glu Lys Gly Tyr Val Glu Ile Asp His Ala Leu Pro Phe
580 585 590

Ser Arg Thr Trp Asp Asp Ser Phe Asn Asn Lys Val Leu Val Leu Gly
595 600 605

Ser Glu Asn Gln Asn Lys Gly Asn Gln Thr Pro Tyr Glu Tyr Phe Asn
610 615 620

Gly Lys Asp Asn Ser Arg Glu Trp Gln Glu Phe Lys Ala Arg Val Glu
625 630 635 640

Thr Ser Arg Phe Pro Arg Ser Lys Lys Gln Arg Ile Leu Leu Gln Lys
645 650 655

Phe Asp Glu Asp Gly Phe Lys Glu Arg Asn Leu Asn Asp Thr Arg Tyr
660 665 670

Val Asn Arg Phe Leu Cys Gln Phe Val Ala Asp Arg Met Arg Leu Thr
675 680 685

Gly Lys Gly Lys Lys Arg Val Phe Ala Ser Asn Gly Gln Ile Thr Asn
690 695 700

Leu Leu Arg Gly Phe Trp Gly Leu Arg Lys Val Arg Ala Glu Asn Asp
705 710 715 720

Arg His His Ala Leu Asp Ala Val Val Val Ala Cys Ser Thr Val Ala
725 730 735

Met Gln Gln Lys Ile Thr Arg Phe Val Arg Tyr Lys Glu Met Asn Ala
740 745 750

Phe Asp Gly Lys Thr Ile Asp Lys Glu Thr Gly Glu Val Leu His Gln
755 760 765

Lys Thr His Phe Pro Gln Pro Trp Glu Phe Phe Ala Gln Glu Val Met
770 775 780

Ile Arg Val Phe Gly Lys Pro Asp Gly Lys Pro Glu Phe Glu Glu Ala
785 790 795 800

Asp Thr Leu Glu Lys Leu Arg Thr Leu Leu Ala Glu Lys Leu Ser Ser
805 810 815

Arg Pro Glu Ala Val His Glu Tyr Val Thr Pro Leu Phe Val Ser Arg
820 825 830

Ala Pro Asn Arg Lys Met Ser Gly Gln Gly His Met Glu Thr Val Lys
835 840 845

Ser Ala Lys Arg Leu Asp Glu Gly Val Ser Val Leu Arg Val Pro Leu
850 855 860

Thr Gln Leu Lys Leu Lys Asp Leu Glu Lys Met Val Asn Arg Glu Arg
865 870 875 880

Glu Pro Lys Leu Tyr Glu Ala Leu Lys Ala Arg Leu Glu Ala His Lys
885 890 895

Asp Asp Pro Ala Lys Ala Phe Ala Glu Pro Phe Tyr Lys Tyr Asp Lys
900 905 910

Ala Gly Asn Arg Thr Gln Gln Val Lys Ala Val Arg Val Glu Gln Val
915 920 925

Gln Lys Thr Gly Val Trp Val Arg Asn His Asn Gly Ile Ala Asp Asn
930 935 940

Ala Thr Met Val Arg Val Asp Val Phe Glu Lys Gly Asp Lys Tyr Tyr
945 950 955 960

Leu Val Pro Ile Tyr Ser Trp Gln Val Ala Lys Gly Ile Leu Pro Asp
965 970 975

Arg Ala Val Val Gln Gly Lys Asp Glu Glu Asp Trp Gln Leu Ile Asp
980 985 990

Asp Ser Phe Asn Phe Lys Phe Ser Leu His Pro Asn Asp Leu Val Glu
995 1000 1005

Val Ile Thr Lys Lys Ala Arg Met Phe Gly Tyr Phe Ala Ser Cys
1010 1015 1020

His Arg Gly Thr Gly Asn Ile Asn Ile Arg Ile His Asp Leu Asp
1025 1030 1035

His Lys Ile Gly Lys Asn Gly Ile Leu Glu Gly Ile Gly Val Lys
1040 1045 1050

Thr Ala Leu Ser Phe Gln Lys Tyr Gln Ile Asp Glu Leu Gly Lys
1055 1060 1065

Glu Ile Arg Pro Cys Arg Leu Lys Lys Arg Pro Pro Val Arg Ser
1070 1075 1080

Gly Lys Arg Thr Ala Asp Gly Ser Glu Phe Glu Ser Pro Lys Lys
1085 1090 1095

Lys Arg Lys Val Glu
1100

<210> 269
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARN de guía única G390 dirigido al gen TTR de rata

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2'-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 269
gccgagucug gagagcugca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 270
<211> 74
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARNtr

<400> 270
aacagcauag caaguuaaaa uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag 60

ucggugcuuu uuuu 74

<210> 271

<400> 271
000

<210> 272
<211> 100
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: ARN de guía única G534 dirigido al gen TTR de rata

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (29)..(40)

<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (69)..(96)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (97)..(100)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 272
acgcaaauau caguccagcg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 273
<211> 95
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia modificada de ARNsg G000395 inactiva truncada 5’

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (24)..(35)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (64)..(91)
<223> nucleótido 2’-O-Me

<220>
<221> base_modificada
<222> (92)..(95)
<223> Enlace PS, nucleótido 2’-O-Me

<400> 273

gcaauggugu agcggguuuu agagcuagaa auagcaaguu aaaauaaggc uaguccguua 60

ucaacuugaa aaaguggcac cgagucggug cuuuu 95

<210> 274
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: NLS de SV40

<400> 274

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 275
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: NLS de SV40 alterno
<400> 275

Pro Lys Lys Lys Arg Arg Val
1 5

<210> 276
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: NLS de nucleoplasmina

<400> 276

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

<210> 277

<211> 10
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de Kozak ejemplar

<400> 277
gccrccaugg 10

<210> 278
<211> 13
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de Kozak ejemplar

<400> 278
gccgccrcca ugg 13