

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA EDICIÓN DE GENES DE CALICREÍNA (KLKB1)

[001] Esta solicitud de patente reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 62/971.906, presentada el 7 de febrero de 2020; la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 62/981.965, presentada el 26 de febrero de 2020; y la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 63/019.076, presentada el 1 de mayo de 2020, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia en su totalidad para todos los fines.

[002] La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presentó electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia en ASCII, creada el 4 de febrero de 2021, tiene el nombre 01155-0031-00PCT_ST25.txt y un tamaño de 184.584 bytes.

[003] El angioedema hereditario (HAE) afecta a una de cada 50.000 personas y contribuye a entre 15.000 y 30.000 visitas a la sala de emergencias por año. El HAE es un trastorno sanguíneo autosómico de herencia dominante poco común que se caracteriza por episodios recurrentes de hinchazón grave (angioedema). Las áreas más comunes del cuerpo que desarrollan hinchazón son las extremidades, la cara, el tracto gastrointestinal y las vías respiratorias. Un traumatismo menor o el estrés pueden desencadenar un ataque, pero la hinchazón a menudo ocurre sin un desencadenante conocido. Los episodios que involucran el tracto intestinal causan dolor abdominal intenso, náuseas y vómitos. La inflamación de las vías respiratorias puede restringir la respiración y provocar una obstrucción de las vías respiratorias que ponga en peligro la vida o asfixia. Los síntomas del HAE suelen comenzar en la infancia y empeoran durante la pubertad. En promedio, las personas que no reciben tratamiento tienen un ataque cada 1 o 2 semanas, y la mayoría de los episodios duran entre 3 y 4 días. Hay tres tipos de angioedema hereditario, denominados tipos I, II y III, y los diferentes tipos tienen signos y síntomas similares.

[004] El angioedema hereditario se deriva del exceso de bradiquinina en la sangre que promueve la permeabilidad vascular y los episodios de hinchazón. La mayoría de los pacientes con HAE tienen una deficiencia de proteína inhibidora de C1 (también llamada inhibidor de C1 esterasa o C1-INH). En ausencia de C1-INH, los niveles de bradiquinina pueden aumentar, iniciar una fuga vascular y causar ataques de hinchazón. Su producción se controla a través de la vía (contacto) de calicreína-cinina,

que es inhibida endógenamente por C1-INH. El péptido de bradiquinina se forma cuando la calicreína plasmática (pKal), una forma activada de la proteína precalicreína, escinde el cininógeno de alto peso molecular (HMWK). La precalicreína está codificada por *KLKB1* y también se denomina proteína KLKB1. La proteína KLKB1 se produce en el hígado y se secreta en el plasma, donde puede ser activada por el factor XIIa. Una vez que se activa KLKB1, pKal puede aumentar los niveles de bradiquinina. Un exceso de bradiquinina en la sangre provoca la fuga de líquido a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia los tejidos corporales. La acumulación excesiva de líquidos en los tejidos corporales provoca los episodios de hinchazón que se observan en las personas con HAE.

[005] Se han desarrollado diversos medicamentos dirigidos a la vía de la calicreína-cinina, incluidos los inhibidores de la esterasa C1 (Berinert®, Cinryze®) el tratamiento de reemplazo de C1-INH recombinante (rhC1INH; conestat alfa (Rhucin®, Ruconest®)) y el antagonista del receptor de bradiquinina (Icatibant, Firazyr®). También se han desarrollado enfoques que utilizan inhibidores de calicreína o precalicreína (KLKB1) (ecallantide, Kalbitor®; lanadelumab, Takhzyro™).

[006] La presente invención proporciona composiciones y métodos que usan el sistema CRISPR/Cas para inactivar el gen *KLKB1*, lo que reduce la producción de precalicreína (KLKB1), reduce la producción de calicreína y reduce la producción de bradiquinina en sujetos con HAE.

[007] En consecuencia, se proporcionan las siguientes formas de realización. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona composiciones y métodos que usan un ARN guía con un agente de fijación a ADN guiado por ARN, tal como el sistema CRISPR/Cas, para reducir o inactivar sustancialmente la expresión del gen *KLKB1*, lo que reduce sustancialmente o elimina la producción de bradiquinina. La reducción sustancial o eliminación de la producción de bradiquinina mediante la alteración del gen *KLKB1* puede ser un tratamiento a largo plazo o permanente.

[008] Se proporcionan las siguientes formas de realización en la presente.

[009] La forma de realización A1 es un ARN guía que comprende:

- a. una secuencia guía que comprende al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 15, 8 y 41;
- b. una secuencia guía que comprende al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 15, 8 y 41; o

c. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 15, 8 y 41.

[0010] La forma de realización A2 es el ARN guía de acuerdo con la forma de realización A1, que comprende además la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 202.

[0011] La forma de realización A3 es el ARN guía de acuerdo con la forma de realización A1, en donde el ARN guía comprende además una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 170, 171, 172 y 173, en donde la secuencia de SEQ ID NO: 170, 171, 172, o 173 es 3' de la secuencia guía.

[0012] La forma de realización A4 es el ARN guía de acuerdo con una de las formas de realización A1-A3, en donde el ARN guía comprende además una cola 3'.

[0013] La forma de realización A5 es el ARN guía de acuerdo con una de las formas de realización A1-A4, en donde el ARN guía comprende al menos una modificación.

[0014] La forma de realización A6 es el ARN guía de acuerdo con la forma de realización A5, en donde la modificación comprende una modificación en el extremo 5'.

[0015] La forma de realización A7 es el ARN guía de acuerdo con la forma de realización A5 o A6, en donde la modificación comprende una modificación en el extremo 3'.

[0016] La forma de realización A8 es el ARN guía de acuerdo con una de las formas de realización A1-A7, en donde el ARN guía comprende una modificación en una región de horquilla.

[0017] La forma de realización A9 es el ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A8, en donde la modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-O-Me).

[0018] La forma de realización A10 es el ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A9, en donde la modificación comprende un enlace de fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

[0019] La forma de realización A11 es el ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A10, en donde la modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-fluor (2'F).

[0020] La forma de realización A12 es el ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1 o A3-A11, que comprende además la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 171.

[0021] La forma de realización A13 es el ARN guía de acuerdo con la forma de realización A12, modificada de acuerdo con el patrón de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 405.

[0022] La forma de realización A14 es el ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1 o A3-A11, que comprende además la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 173.

[0023] La forma de realización A15 es el ARN guía de acuerdo con la forma de realización A14, modificada de acuerdo con el patrón SEQ ID NO: 248-255 o 450.

[0024] La forma de realización A16 es el ARN guía de cualquiera de acuerdo con las formas de realización A12-A15, en donde la secuencia guía es SEQ ID NO: 15.

[0025] La forma de realización A17 es el ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A12-A15, en donde la secuencia guía es SEQ ID NO: 8.

[0026] La forma de realización A18 es el ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A12-A15, en donde la secuencia guía es SEQ ID NO: 41.

[0027] La forma de realización A19 es el ARN guía de acuerdo con la forma de realización A1 o A4-A11, en donde el ARN guía está modificado de acuerdo con el patrón de SEQ ID NO: 300, en donde las N son colectivamente la secuencia guía de acuerdo con la forma de realización A1.

[0028] La forma de realización A20 es el ARN guía de acuerdo con la forma de realización A16, en donde cada N en SEQ ID NO: 300 es cualquier nucleótido natural o no natural.

[0029] La forma de realización A21 es el ARN guía de acuerdo con la forma de realización A19, en donde la secuencia guía es SEQ ID NO: 15 y el ARN guía está modificado de acuerdo con mG*mG*mA* UUGCGUAUGGGACACAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 603), en donde "mA," "mC," "mU," o "mG" denota un nucleótido que ha sido modificado con 2'-O-Me, un * denota un enlace de fosforotioato, y una N es un nucleótido natural.

[0030] La forma de realización A22 es el ARN guía de acuerdo con la forma de realización A19, en donde la secuencia guía es SEQ ID NO: 8 y el ARN guía está modificado de acuerdo con mU*mA*mC*CCGGGAGUUGACUUUGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*Mu (SEQ ID NO: 604), en donde "mA," "mC," "mU," o "mG" denota un nucleótido que ha sido modificado con 2'-O-Me, un * denota un enlace de fosforotioato, y una N es un nucleótido natural.

[0031] La forma de realización A23 es el ARN guía de acuerdo con la forma de realización A19, en donde la secuencia guía es SEQ ID NO: 41 y el ARN guía está modificado de acuerdo con mU*mU*mU*ACUCCCAGAAGACUGUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 605), en donde “mA,” “mC,” “mU,” o “mG” denota un nucleótido que ha sido modificado con 2'-O-Me, un * denota un enlace de fosforotioato, y una N es un nucleótido natural.

[0032] La forma de realización A24 es una composición que comprende un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A23.

[0033] La forma de realización A25 es la composición de acuerdo con la forma de realización A24, que comprende además un agente de fijación a ADN guiado por ARN o un ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN.

[0034] La forma de realización A26 es la composición de acuerdo con la forma de realización A25, en donde el ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN comprende un mRNA que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN.

[0035] La forma de realización A27 es la composición de acuerdo con la forma de realización A25 o A26, en donde el agente de fijación a ADN guiado por ARN es Cas9.

[0036] La forma de realización A28 es la composición de acuerdo con la forma de realización A27, en donde la Cas9 es Cas9 de *S. pyogenes*.

[0037] La forma de realización A29 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A26-A28, en donde ORF es un ORF modificado.

[0038] La forma de realización A30 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A24-A29, que comprende además un excipiente farmacéutico.

[0039] La forma de realización A31 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A24-A30, en donde el ARN guía está asociado con una nanopartícula lipídica (LNP).

[0040] La forma de realización A32 es la composición de acuerdo con la forma de realización A31, en donde LNP comprende un lípido catiónico.

[0041] La forma de realización A33 es la composición de acuerdo con la forma de realización A32, en donde el lípido catiónico 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)propilo (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato.

[0042] La forma de realización A34 es la composición de acuerdo con la forma de realización A31-A33, en donde el LNP comprende (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)propilo (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato, DSPC, colesterol, y PEG2k-DMG.

[0043] La forma de realización A35 es una composición farmacéutica que comprende un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A23 o una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A24-A34.

[0044] La forma de realización A36 es una composición farmacéutica que comprende o usa un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A23 o una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A24-A34 para inducir una ruptura bicatenaria o una ruptura monocatenaria dentro de un gen KLKB1 en una célula o reducir la expresión de KLKB1 en una célula.

[0045] La forma de realización A37 es la composición farmacéutica o el uso de la forma de realización A36, para reducir la expresión del gen KLKB1 en una célula o sujeto.

[0046] La forma de realización A38 es una composición farmacéutica que comprende o usa un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A23 o una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A24-A34 para tratar un sujeto que tiene angioedema hereditario (HAE).

[0047] La forma de realización A39 es la composición farmacéutica o el uso de la forma de realización A38, que comprende reducir la frecuencia y/o la gravedad de los ataques de HAE.

[0048] La forma de realización A40 es una composición farmacéutica que comprende o usa un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A23 o una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A24-A34 para tratar o prevenir el angioedema asociado con HAE, producción y acumulación de bradiquinina, hinchazón inducida por bradiquinina, obstrucción por angioedema de las vías respiratorias o asfixia.

[0049] La forma de realización A41 es una composición farmacéutica o uso de un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A23 o una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A24-A34 para

reducir la actividad total de calicreína en plasma o reducir los niveles de precalicreína y/o calicreína en un sujeto.

[0050] La forma de realización A42 es la composición farmacéutica o el uso de acuerdo con la forma de realización A41, en donde la actividad total de la calicreína en plasma se reduce en más de 60 %.

[0051] La forma de realización A43 es un método para inducir una ruptura bicatenaria o una ruptura monocatenaria dentro de un gen KLKB1 en una célula o reducir la expresión de KLKB1 en una célula que comprende poner en contacto una célula con un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A23 o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A24-A34.

[0052] La forma de realización A44 es un método de acuerdo con la forma de realización A43, en donde la célula está en un sujeto.

[0053] La forma de realización A45 es un método para tratar a un sujeto que tiene angioedema hereditario (HAE) que comprende administrar un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A23 o una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A24-34 para de este modo tratar al sujeto.

[0054] La forma de realización A46 es un método de acuerdo con la forma de realización A45, en donde tratar al sujeto comprende reducir la frecuencia y/o gravedad de los ataques de HAE.

[0055] La forma de realización A47 es un método para tratar o prevenir el angioedema asociado con HAE, la producción y acumulación de bradiquinina, la hinchazón inducida por bradiquinina, la obstrucción de las vías respiratorias por angioedema o la asfixia que comprende administrar al sujeto un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A23 o una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A24-A34, al tratar o prevenir de este modo el angioedema asociado con HAE, la producción y acumulación de bradiquinina, la hinchazón inducida por bradiquinina, la obstrucción de las vías respiratorias por angioedema o la asfixia en el sujeto.

[0056] La forma de realización A48 es un método para reducir la actividad de calicreína plasmática total en un sujeto que comprende administrar un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A23 o una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A24-A34, lo que reduce la actividad de calicreína plasmática total en un sujeto.

[0057] La forma de realización A49 es el método de acuerdo con la forma de realización A48, en donde la actividad total de la calicreína en plasma se reduce en

más de 60 % en el sujeto.

[0058] La forma de realización A50 es el uso de un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A1-A23 o una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización A24-A34 en la preparación de un medicamento para practicar cualquiera de los métodos de acuerdo con las formas de realización A43-A49.

[0059] Se proporcionan formas de realización adicionales en la presente.

[0060] La forma de realización 1 es un método para inducir una rotura bicatenaria (DSB) o una rotura monocatenaria (SSB) dentro del gen KLKB1, que comprende administrar una composición a una célula, en donde la composición comprende:

- a. un ARN guía que comprende
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
 - v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
 - vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
 - vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o
 - viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (vi); y opcionalmente
- b. un agente de fijación a ADN guiado por ARN o un ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN.

[0061] La forma de realización 2 es un método para reducir la expresión del gen KLKB1, que comprende administrar una composición a una célula, en donde la composición comprende:

- a. un ARN guía que comprende
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o

- iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
- iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
- v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
- vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
- vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o
- viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (vi); y opcionalmente
- b. un agente de fijación a ADN guiado por ARN o un ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN.

[0062] La forma de realización 3 es un método para tratar o prevenir el angioedema hereditario (HAE), que comprende administrar una composición a un sujeto que lo necesite, en donde la composición comprende:

- a. un ARN guía que comprende
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
 - v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
 - vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
 - vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o
 - viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (vi); y opcionalmente
- b. un agente de fijación a ADN guiado por ARN o ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN, que trata o

previene de este modo el HAE.

[0063] La forma de realización 4 es un método para tratar o prevenir el angioedema causado o asociado por HAE, que comprende administrar una composición a un sujeto que lo necesite, en donde la composición comprende:

- a. un ARN guía que comprende
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
 - v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
 - vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
 - vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o
 - viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (vi); y opcionalmente
- b. un agente de fijación a ADN guiado por ARN o ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN, que trata o previene de este modo el angioedema causado o asociado con HAE.

[0064] La forma de realización 5 es un método para tratar o prevenir cualquiera de la producción y acumulación de bradiquinina, hinchazón inducida por bradiquinina, obstrucción de las vías respiratorias por angioedema o asfixia, que comprende administrar una composición a un sujeto que lo necesita, en donde la composición comprende:

- a. un ARN guía que comprende
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o

- iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
- v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
- vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
- vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o
- viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (vi); y opcionalmente
- b. un agente de fijación a ADN guiado por ARN o ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN, que trata o previene de este modo cualquiera de la producción y acumulación de bradiquinina, hinchazón inducida por bradiquinina, obstrucción de las vías respiratorias por angioedema o asfixia.

[0065] La forma de realización 6 es un método para reducir la frecuencia y/o gravedad de los ataques de HAE, que comprende administrar una composición a un sujeto que lo necesite, en donde la composición comprende:

- a. un ARN guía que comprende
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
 - v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
 - vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
 - vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o
 - viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica

a una secuencia seleccionada de (vi); y opcionalmente

- b. un agente de fijación a ADN guiado por ARN o ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN, que reduce de este modo la frecuencia y/o gravedad de los ataques de HAE.

[0066] La forma de realización 7 es un método para reducir la frecuencia y/o gravedad de los ataques de angioedema en un sujeto, que comprende administrar una composición a un sujeto que lo necesite, en donde la composición comprende:

- a. un ARN guía que comprende
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
 - v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
 - vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
 - vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o
 - viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (vi); y opcionalmente
- b. un agente de fijación a ADN guiado por ARN o ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN, que reduce de este modo la frecuencia y/o gravedad de los ataques de angioedema o lograr la remisión de los ataques de angioedema en un sujeto.

[0067] La forma de realización 8 es un método para reducir la actividad total de la calicreína plasmática, que comprende administrar una composición a un sujeto que lo necesite, en donde la composición comprende:

- a. un ARN guía que comprende
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 %

- idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
 - v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
 - vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
 - vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o
 - viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (vi); y opcionalmente
 - b. un agente de fijación a ADN guiado por ARN o ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN, que logra de este modo la remisión de los ataques de angioedema o lograr la remisión de los ataques de angioedema en un sujeto, en donde se reduce la actividad total de la calicreína plasmática.

[0068] La forma de realización 9 es el método de acuerdo con la forma de realización 8, que comprende además una etapa de activación para convertir la precalicreína en su forma activa, pKal.

[0069] La forma de realización 10 es el método de acuerdo con la forma de realización 8, en donde la actividad total de la calicreína en plasma se reduce en más de 60 %, más de 85 %, o más de 60-80 %.

[0070] La forma de realización 11 es un método para reducir los niveles totales de la calicreína plasmática, que comprende administrar una composición a un sujeto que lo necesite, en donde la composición comprende:

- a. un ARN guía que comprende
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
 - v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o

- vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
- vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o
- viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (vi); y opcionalmente
- b. un agente de fijación a ADN guiado por ARN o ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN, que reduce de este modo los niveles totales de calicreína en plasma.

[0071] La forma de realización 12 es un método para reducir los niveles de precalicreína y/o calicreína, que comprende administrar una composición a un sujeto que lo necesite, en donde la composición comprende:

- a. un ARN guía que comprende
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
 - v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
 - vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
 - vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o
 - viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (vi); y opcionalmente
- b. un agente de fijación a ADN guiado por ARN o ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN, que reduce de este modo la precalicreína y/o calicreína.

[0072] La forma de realización 13 es el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde existe un aumento dependiente de la dosis en el porcentaje de edición.

[0073] La forma de realización 14 es el método de acuerdo con cualquiera de la forma

de realización 13, en donde existe una reducción dependiente de la dosis en los niveles totales de calicreína en plasma.

[0074] La forma de realización 15 es el método de acuerdo con cualquiera de la forma de realización 13 o 14, en donde existe una reducción dependiente de la dosis en la actividad de calicreína en plasma.

[0075] La forma de realización 16 es el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores en donde el efecto es duradero durante al menos 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más después de la administración.

[0076] La forma de realización 17 es el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores en donde el efecto es duradero durante al menos 6 mes.

[0077] La forma de realización 18 es el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores en donde el efecto es duradero durante al menos 1 año.

[0078] La forma de realización 19 es el método de acuerdo con la forma de realización 6, en donde se reduce la frecuencia de los ataques de HAE.

[0079] La forma de realización 20 es el método de acuerdo con la forma de realización 19, en donde la frecuencia se reduce en al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 60-80 %, o al menos 40-90 %.

[0080] La forma de realización 21 es el método de acuerdo con la forma de realización 20, en donde se reduce la frecuencia en al menos 60-80 %.

[0081] La forma de realización 22 es el método de acuerdo con la forma de realización 20, en donde se reduce la frecuencia en al menos 40-90 %.

[0082] La forma de realización 23 es el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores en donde el efecto es duradero durante al menos 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más después de la administración.

[0083] La forma de realización 24 es el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores en donde el efecto es duradero durante al menos 6 mes después de la administración.

[0084] La forma de realización 25 es el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores en donde el efecto es duradero durante al menos 1 año después de la administración.

[0085] La forma de realización 26 es el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores en donde el efecto se compara con un nivel basal.

[0086] La forma de realización 27 es el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores en donde el efecto se compara con un nivel basal de un sujeto.

[0087] La forma de realización 28 es el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde se administra un agente de fijación a ADN guiado por ARN o un ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN.

[0088] La forma de realización 29 es una composición que comprende:

- a. un ARN guía que comprende
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
 - v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
 - vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
 - vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o
 - viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (vi); y opcionalmente
- b. un agente de fijación a ADN guiado por ARN o ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN.

[0089] La forma de realización 30 es una composición que comprende un ARN guía simple corto (sgARN corto), que comprende:

- a. una secuencia guía que comprende:
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 %

- idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
 - v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
 - vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
 - vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o
 - viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (vi); y
 - b. una porción conservada de un sgARN que comprende una región de horquilla, en donde la región de horquilla carece de al menos 5-10 nucleótidos y opcionalmente en donde el sgARN corto comprende una o más de una modificación en el extremo 5' y una modificación en el extremo 3'.

[0090] Forma de realización 31. La composición de acuerdo con la forma de realización 29, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 202.

[0091] La forma de realización 32 es la composición de acuerdo con la forma de realización 29 o la forma de realización 30, que comprende una modificación en el extremo 5'.

[0092] La forma de realización 33 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-32, en donde el sgARN corto comprende una modificación en el extremo 3'.

[0093] La forma de realización 34 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-33, en donde el sgARN corto comprende una modificación en el extremo 5' y una modificación en el extremo 3'.

[0094] La forma de realización 35 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-34, en donde el sgARN corto comprende además una cola 3'.

[0095] La forma de realización 36 es la composición de acuerdo con la forma de realización 35, en donde la cola 3' comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos.

[0096] La forma de realización 37 es la composición de acuerdo con la forma de realización 35, en donde la cola 3' comprende alrededor de 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-7, 1-10, al menos 1-2, al menos 1-3, al menos 1-4, al menos 1-5, al menos 1-7 o al menos 1-10 nucleótidos.

[0097] La forma de realización 38 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-37, en donde el sgARN corto no comprende una cola 3'.

[0098] La forma de realización 39 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-38, que comprende una modificación en la región de horquilla.

[0099] La forma de realización 40 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-39, que comprende una modificación en el extremo 3' y una modificación en la región de horquilla.

[00100] La forma de realización 41 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-40, que comprende una modificación en el extremo 3' y una modificación en la región de horquilla y una modificación en el extremo 5'.

[00101] La forma de realización 42 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-41, que comprende una modificación en el extremo 5' y una modificación en la región de horquilla.

[00102] La forma de realización 43 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-42, en donde la región de horquilla carece de al menos 5 nucleótidos consecutivos.

[00103] La forma de realización 44 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-43, en donde al menos 5-10 nucleótidos que faltan:

- a. están dentro de la horquilla 1;
- b. están dentro de la horquilla 1 y la "N" entre la horquilla 1 y la horquilla 2;
- c. están dentro de la horquilla 1 y los dos nucleótidos inmediatamente 3' de la horquilla 1;
- d. incluyen al menos una porción de la horquilla 1;
- e. están dentro de la horquilla 2;
- f. incluyen al menos una porción de la horquilla 2;
- g. están dentro de la horquilla 1 y la horquilla 2;
- h. incluyen al menos una porción de la horquilla 1 e incluyen la "N" entre la horquilla 1 y la horquilla 2;
- i. incluyen al menos una porción de la horquilla 2 e incluyen la "N" entre la horquilla 1 y la horquilla 2;
- j. incluyen al menos una porción de la horquilla 1, incluyen la "N" entre la horquilla 1 y la horquilla 2, e incluyen al menos una porción de la horquilla 2;
- k. están dentro de la horquilla 1 o la horquilla 2, e incluyen opcionalmente

la "N" entre la horquilla 1 y la horquilla 2;

- l. son consecutivos;
- m. son consecutivos e incluyen la "N" entre la horquilla 1 y la horquilla 2;
- n. son consecutivos y abarcan al menos una porción de la horquilla 1 y una porción de la horquilla 2;
- o. son consecutivos y abarcan al menos una porción de la horquilla 1 y la "N" entre la horquilla 1 y la horquilla 2;
- p. son consecutivos y abarcan al menos una porción de la horquilla 1 y dos nucleótidos inmediatamente 3' de la horquilla 1;
- q. consisten en 5-10 nucleótidos;
- r. consisten en 6-10 nucleótidos;
- s. consisten en 5-10 nucleótidos consecutivos;
- t. consisten en 6-10 nucleótidos consecutivos; o
- u. consisten en los nucleótidos 54-58 de SEQ ID NO: 400.

[00104]La forma de realización 45 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-44, que comprende una porción conservada de un sgARN que comprende una región de conexión, en donde la región de conexión carece de al menos un nucleótido.

[00105]La forma de realización 46 es la composición de acuerdo con la forma de realización 45, en donde los nucleótidos carentes en la región de conexión comprenden cualquiera de uno o más de:

- a. al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos en la región de conexión;
- b. al menos o exactamente 1-2 nucleótidos, 1-3 nucleótidos, 1-4 nucleótidos, 1-5 nucleótidos, 1-6 nucleótidos, 1-10 nucleótidos o 1-15 nucleótidos en la región de conexión; y
- c. cada nucleótido en la región de conexión.

[00106]La forma de realización 47 es una composición que comprende un ARN guía simple (sgARN) modificado, que comprende

- a. una secuencia guía que comprende:
 - i. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - ii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149; o
 - iv. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO:

1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o

v. una secuencia guía que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o

vi. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o

vii. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (vi); o

viii. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (vi); y

que comprende además

b. una o más modificaciones seleccionadas de:

1. una modificación YA en uno o más sitios YA de región guía;

2. una modificación YA en uno o más sitios YA de región conservada;

3. una modificación YA en uno o más sitios YA de región guía y en uno o más sitios YA de región conservada;

4. i) una modificación YA en dos o más sitios YA de región guía;

ii) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 2, 3, 4 y 10; y

iii) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 1 y 8; o

5. i) una modificación YA en uno o más sitios YA de región guía, en donde el sitio YA de región guía está en o después del nucleótido 8 del extremo 5' del terminal 5';

ii) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 2, 3, 4 y 10; y opcionalmente;

iii) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 1 y 8; o

6. i) una modificación YA en uno o más sitios YA de región guía, en donde el sitio YA de región guía está dentro de 13 nucleótidos del nucleótido del terminal 3' de la región guía;

ii) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 2, 3, 4 y 10; y

iii) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 1 y 8; o

7.
 - i) una modificación en el extremo 5' y una modificación en el extremo 3';
 - ii) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 2, 3, 4 y 10; y
 - iii) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 1 y 8; o
8.
 - i) una modificación YA en un sitio YA de región guía, en donde la modificación del sitio YA de región guía comprende una modificación que al menos un nucleótido ubicado 5' del sitio YA de región guía no comprende;
 - ii) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 2, 3, 4 y 10; y
 - iii) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 1 y 8; o
9.
 - i) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 2, 3, 4 y 10; y
 - ii) una modificación YA en los sitios YA de región conservada 1 y 8; o
10.
 - i) una modificación YA en uno o más sitios YA de región guía, en donde el sitio YA está en o después del nucleótido 8 del terminal 5';
 - ii) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 2, 3, 4 y 10; y
 - iii) una modificación en uno o más de los sitios H1-1 y H2-1; o
11.
 - i) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 2, 3, 4 y 10; ii) una modificación YA en uno o más de los sitios YA de región conservada 1, 5, 6, 7, 8 y 9; y iii) una modificación en uno o más de los sitios H1-1 y H2-1; o
12.
 - i) una modificación, tal como una modificación YA, en uno o más nucleótidos ubicados en o después del nucleótido 6 del terminal 5';
 - ii) una modificación YA en uno o más sitios YA de secuencia guía;
 - iii) una modificación en uno o más de los sitios B3, B4 y B5, en donde B6 no comprende una modificación 2'-OMe o comprende

una modificación distinta de 2'-OMe;

iv) una modificación en LS10, en donde LS10 comprende una modificación distinta de 2'-fluoro; y/o

v) una modificación en N2, N3, N4, N5, N6, N7, N10 o N11; y en donde ocurre al menos uno de los siguientes:

- i. una modificación YA en uno o más sitios YA de región guía;
- ii. una modificación YA en uno o más sitios YA de región conservada;
- iii. una modificación YA en uno o más sitios YA de región guía y en uno o más sitios YA de región conservada;
- iv. al menos uno de los nucleótidos 8-11, 13, 14, 17 o 18 del extremo 5' del terminal 5' no comprende una modificación 2'-fluoro;
- v. al menos uno de los nucleótidos 6-10 del extremo 5' del terminal 5' no comprende un enlace fosforotioato.
- vi. al menos uno de B2, B3, B4 o B5 no comprende una modificación 2'-OMe;
- vii. al menos uno de LS1, LS8 o LS10 no comprende una modificación 2'-OMe;
- viii. al menos uno de N2, N3, N4, N5, N6, N7, N10, N11, N16 o N17 no comprende una modificación 2'-OMe;
- ix. H1-1 comprende una modificación;
- x. H2-1 comprende una modificación; o
- xi. al menos uno de H1-2, H1-3, H1-4, H1-5, H1-6, H1-7, H1-8, H1-9, H1-10, H2-1, H2-2, H2-3, H2-4, H2-5, H2-6, H2-7, H2-8, H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 o H2-15 no comprende un enlace fosforotioato.

[00107]La forma de realización 48 es la composición de acuerdo con la forma de realización 47, que comprende SEQ ID NO: 450.

[00108]La forma de realización 49 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-48, para su uso en la inducción de una rotura bicatenaria (DSB) o una rotura monocatenaria dentro del gen KLKB1 en una célula o un sujeto.

[00109]La forma de realización 50 es la composición de acuerdo con cualquiera de las

formas de realización 29-48, para su uso en la reducción de la expresión del gen KLKB1 en una célula o un sujeto.

[00110]La forma de realización 51 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-48, para su uso en el tratamiento o prevención del HAE en un sujeto.

[00111]La forma de realización 52 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-48, para su uso en la reducción de la concentración de bradiquinina en suero y/o plasma en un sujeto.

[00112]La forma de realización 53 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-48, para uso en la reducción de la concentración de vasodilatación mediada por bradiquinina en un sujeto.

[00113]La forma de realización 54 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-48, para uso en el tratamiento o prevención de la producción y acumulación de bradiquinina, vasodilatación, hinchazón o angioedema mediada por bradiquinina, obstrucción de las vías respiratorias o asfixia.

[00114]La forma de realización 55 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-48, para su uso en el tratamiento o prevención del angioedema causado o asociado con HAE.

[00115]La forma de realización 56 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-48, para uso en la reducción de la frecuencia de los ataques de angioedema.

[00116]La forma de realización 57 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-48, para uso en la reducción de la gravedad de los ataques de angioedema.

[00117]La forma de realización 58 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-48, para uso en la reducción de la frecuencia y/o gravedad de los ataques.

[00118]La forma de realización 59 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-48, para uso en el logro de la remisión de los ataques de angioedema.

[00119]La forma de realización 60 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-48, para uso en la reducción de la frecuencia y/o gravedad de los ataques de HAE.

[00120]La forma de realización 61 es la composición de acuerdo con la forma de realización 60, para su uso en la reducción de la frecuencia de los ataques de HAE.

[00121]La forma de realización 62 es la composición de acuerdo con la forma de realización 61, en donde la frecuencia se reduce en al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 60-80 %, o al menos 40-90 %.

[00122]La forma de realización 63 es el método de acuerdo con la forma de realización 61, en donde se reduce la frecuencia en al menos 60-80 %.

[00123]La forma de realización 64 es el método de acuerdo con la forma de realización 61, en donde se reduce la frecuencia en al menos 40-90 %.

[00124]La forma de realización 65 es la composición de acuerdo con la forma de realización 60, para su uso en la reducción de la actividad total de calicreína en plasma.

[00125]La forma de realización 66 es la composición de acuerdo con la forma de realización 60, para su uso en la reducción de los niveles totales de calicreína en plasma.

[00126]La forma de realización 67 es la composición de acuerdo con la forma de realización 60, para su uso en la reducción de los niveles totales de precalicreína y/o calicreína.

[00127]La forma de realización 68 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 65-67, en donde existe un aumento dependiente de la dosis en el porcentaje de edición.

[00128]La forma de realización 69 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 65-68, en donde existe una reducción dependiente de la dosis en los niveles totales de calicreína en plasma

[00129]La forma de realización 70 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 65-69, en donde existe una reducción dependiente de la dosis en la actividad de calicreína en plasma

[00130]La forma de realización 71 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-70, en donde el efecto es duradero durante al menos 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más después de la administración.

[00131]La forma de realización 72 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-71, en donde el efecto es duradero durante al menos 6 mes.

[00132]La forma de realización 73 es la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 29-72, en donde el efecto es duradero durante al menos 1 año.

[00133]La forma de realización 74 es el método de acuerdo con cualquiera de las

formas de realización 1-28, que comprende además:

- a. inducir una rotura bicatenaria (DSB) dentro del gen *KLKB1* en una célula o un sujeto;
- b. reducir la expresión del gen *KLKB1* en una célula o un sujeto;
- c. tratar o prevenir el HAE en un sujeto;
- d. reducir la concentración de bradiquinina en suero y/o plasma en un sujeto;
- e. reducir la producción de bradiquinina;
- f. reducir la vasodilatación mediada por bradiquinina;
- g. tratar o prevenir la hinchazón mediada por bradiquinina o angioedema; y/o
- h. tratar o prevenir la obstrucción de las vías respiratorias o asfixia causada por la hinchazón.

[00134]La forma de realización 75 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición disminuye la producción de mRNA de *KLKB1*.

[00135]La forma de realización 76 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición disminuye los niveles de proteína precalicreína en plasma o suero.

[00136]La forma de realización 77 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición disminuye los niveles de proteína de calicreína total (precalicreína y pKal) en plasma o suero.

[00137]La forma de realización 78 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición disminuye la proporción de HMWK escindida circulante (cHMWK) en comparación con el total de HMWK en suero citratado o plasma citratado.

[00138]La forma de realización 79 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición reduce la proporción de cHMWK de un sujeto en plasma citratado por debajo del 30 % del total de HMWK.

[00139]La forma de realización 80 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición disminuye la actividad pKal espontánea en suero o plasma.

[00140]La forma de realización 81 es el método, composición o composición para su

uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición disminuye la actividad de la calicreína.

[00141]La forma de realización 82 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la actividad de la calicreína comprende la actividad de la calicreína total, la actividad de la precalicreína y/o la actividad de pKal.

[00142]La forma de realización 83 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición reduce la actividad pKal de un sujeto en al menos alrededor de 40 % antes del método o uso de la composición.

[00143]La forma de realización 84 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición reduce la actividad pKal de un sujeto en al menos alrededor de 50 % antes del método o uso de la composición.

[00144]La forma de realización 85 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición reduce la actividad pKal de un sujeto en al menos alrededor de 60 % antes del método o uso de la composición.

[00145]La forma de realización 86 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición reduce la actividad pKal de un sujeto a menos de alrededor de 40 % de los niveles basales.

[00146]La forma de realización 87 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición reduce la actividad pKal de un sujeto a alrededor de 40-50 % de los niveles basales.

[00147]La forma de realización 88 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición reduce la actividad pKal de un sujeto a alrededor de 20-40 % o 20-50 % de los niveles basales.

[00148]La forma de realización 89 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición aumenta los niveles de bradiquinina en suero y/o plasma.

[00149]La forma de realización 90 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la

composición genera la edición del gen KLKB1.

[00150]La forma de realización 91 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con la forma de realización 90, en donde la edición se calcula como un porcentaje de la población que se edita (porcentaje de edición).

[00151]La forma de realización 92 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con la forma de realización 91, en donde el porcentaje de edición es de entre 30 y 99 % de la población.

[00152]La forma de realización 93 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con la forma de realización 91, en donde el porcentaje de edición es de 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.

[00153]La forma de realización 94 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición reduce la concentración de bradiquinina en suero y/o plasma.

[00154]La forma de realización 95 es el método, composición o composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición reduce la concentración de bradiquinina en suero y/o plasma, y en donde una reducción de la bradiquinina sérica y/o plasmática genera una disminución de la hinchazón en los tejidos de los órganos, incluidas las extremidades, la cara, el tracto gastrointestinal o las vías respiratorias.

[00155]La forma de realización 96 es el método, composición para su uso o composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la secuencia guía se selecciona de

- a. SEQ ID NO: 1-149; o
- b. SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
- c. cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
- d. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
- e. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (d); o
- f. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (d).

[00156]La forma de realización 97 el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en

donde la composición comprende un sgARN que comprende:

- a. SEQ ID NO: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; o
- b. cualquiera de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69; o
- c. una secuencia que comprende 15 nucleótidos consecutivos $\pm$ 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en la Tabla 1; o
- d. al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia de (c);
o
- e. una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de (c).

[00157]La forma de realización 98 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la secuencia diana está en el exón 1, exón 3, exón 4, exón 5, exón 6 o exón 8, exón 9, exón 10, exón 11, exón 12, exón 13, exón 14 o exón 15 del gen KLKB1 humano.

[00158]La forma de realización 99 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 1 del gen KLKB1 humano.

[00159]La forma de realización 100 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 3 del gen KLKB1 humano.

[00160]La forma de realización 101 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 4 del gen KLKB1 humano.

[00161]La forma de realización 102 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 5 del gen KLKB1 humano.

[00162]La forma de realización 103 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 6 del gen KLKB1 humano.

[00163]La forma de realización 104 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 8 del gen KLKB1 humano.

[00164]La forma de realización 105 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 9 del gen KLKB1 humano.

[00165]La forma de realización 106 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 10 del gen KLKB1 humano.

[00166]La forma de realización 107 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 11 del gen KLKB1 humana.

[00167]La forma de realización 108 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 12 del gen KLKB1 humano.

[00168]La forma de realización 109 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 13 del gen KLKB1 humano.

[00169]La forma de realización 110 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 14 del gen KLKB1 humano.

[00170]La forma de realización 111 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 98, en donde la secuencia diana está en el exón 15 del gen KLKB1 humano.

[00171]La forma de realización 112 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la secuencia guía es complementaria a una secuencia diana en la cadena positiva de KLKB1.

[00172]La forma de realización 113 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la secuencia guía es complementaria a una secuencia diana en la cadena negativa de KLKB1.

[00173]La forma de realización 114 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la primera secuencia guía es complementaria a una primera secuencia diana en la cadena positiva del gen KLKB1, y en donde la composición comprende además una segunda secuencia guía que es complementaria a una segunda secuencia diana en la cadena negativa del gen KLKB1.

[00174]La forma de realización 115 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el ARN guía comprende una secuencia guía seleccionada de cualquiera de

SEQ ID NO: 1-149 y comprende además una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 170, en donde los nucleótidos de SEQ ID NO: 170 siguen la secuencia guía en su extremo 3'.

[00175]La forma de realización 116 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el ARN guía comprende una secuencia guía seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 1-149 y comprende además una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, o cualquiera de SEQ ID NO: 400-450, en donde los nucleótidos de SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, o cualquiera de las porciones conservadas de sgARN de la Tabla 4, siga la secuencia guía en su extremo 3'.

[00176]La forma de realización 117 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el ARN guía es una ARN guía simple (sgARN).

[00177]La forma de realización 118 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 117, en donde el sgARN comprende una secuencia guía que comprende cualquiera de las SEQ ID No: 8, 15, 41, 51, 69.

[00178]La forma de realización 119 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el ARN guía se modifica de acuerdo con el patrón de SEQ ID NO: 300, en donde las N son colectivamente cualquiera de las secuencias guía de la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1-149).

[00179]La forma de realización 120 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 119, en donde cada N en SEQ ID NO: 300 es cualquier nucleótido natural o no natural, en donde las N forman la secuencia guía, y la secuencia guía dirige Cas9 al gen KLKB1.

[00180]La forma de realización 121 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el sgARN comprende cualquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149 y los nucleótidos de SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, o cualquiera de las porciones conservadas de sgARN de la Tabla 4, en donde los nucleótidos de SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, o cualquiera de las porciones conservadas de sgARN de la Tabla 4, siga la secuencia guía en su extremo 3'.

[00181]La forma de realización 122 es el método, la composición para su uso o la

composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el sgARN comprende una secuencia guía que es al menos 95 %, 90 % u 85 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149.

[00182]La forma de realización 123 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 122, en donde el sgARN comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 8, 15, 41, 51, 69.

[00183]La forma de realización 124 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde el ARN guía comprende al menos una modificación.

[00184]La forma de realización 125 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 124, en donde la al menos una modificación incluye un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-O-Me).

[00185]La forma de realización 126 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 124-125, que comprende un enlace fosforotioato (PS) entre los nucleótidos.

[00186]La forma de realización 127 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 124-126, que comprende un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F).

[00187]La forma de realización 128 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 124-127, que comprende una modificación en uno o más de los primeros cinco nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

[00188]La forma de realización 129 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 124-128, que comprende una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

[00189]La forma de realización 130 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 124-129, que comprende un enlace PS entre los primeros cuatro nucleótidos del ARN guía.

[00190]La forma de realización 131 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 124-130, que comprende un enlace PS entre los últimos cuatro nucleótidos del ARN guía.

[00191]La forma de realización 132 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 124-131, que comprende un nucleótido modificado con 2'-O-Me en los primeros tres nucleótidos en

el extremo 5' del ARN guía.

[00192]La forma de realización 133 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 124-132, que comprende un nucleótido modificado con 2'-O-Me en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

[00193]La forma de realización 134 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 124-133, en donde el ARN guía comprende los nucleótidos modificados de SEQ ID NO: 300.

[00194]La forma de realización 135 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición es una formulación farmacéutica y comprende además un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[00195]La forma de realización 136 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ARN guía está asociado con una nanopartícula lipídica (LNP).

[00196]La forma de realización 137 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 136, en donde la LNP comprende un lípido catiónico.

[00197]La forma de realización 138 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 137, en donde el lípido catiónico es
(9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato, también denominado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato.

[00198]La forma de realización 139 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 136-138, en donde la LNP comprende un lípido neutro.

[00199]La forma de realización 140 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 139, en donde el lípido neutral es DSPC.

[00200]La forma de realización 141 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 136-140, en donde la LNP comprende un lípido auxiliar.

[00201]La forma de realización 142 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 141, en donde el lípido auxiliar es

colesterol.

[00202]La forma de realización 143 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 136-142, en donde la LNP comprende un lípido sigiloso.

[00203]La forma de realización 144 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 143, en donde el lípido sigiloso es PEG2k-DMG.

[00204]La forma de realización 145 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición comprende además un agente de fijación a ADN guiado por ARN.

[00205]La forma de realización 146 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición comprende además un mRNA que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN.

[00206]La forma de realización 147 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con la forma de realización 145 o 146, en donde el agente de fijación a ADN guiado por ARN es Cas9.

[00207]La forma de realización 148 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición es una formulación farmacéutica y comprende además un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[00208]La forma de realización 149 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 1.

[00209]La forma de realización 150 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 2.

[00210]La forma de realización 151 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 3.

[00211]La forma de realización 152 es el método, la composición para su uso o la

composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 4.

[00212]La forma de realización 153 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-89, en donde la secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 5.

[00213]La forma de realización 154 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-89, en donde la secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 6.

[00214]La forma de realización 155 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-89, en donde la secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 7.

[00215]La forma de realización 156 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 8.

[00216]La forma de realización 157 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 9.

[00217]La forma de realización 158 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 10.

[00218]La forma de realización 159 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 11.

[00219]La forma de realización 160 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 12.

[00220]La forma de realización 161 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-

149 es SEQ ID NO: 13.

[00221]La forma de realización 162 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 14.

[00222]La forma de realización 163 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 15.

[00223]La forma de realización 164 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 16.

[00224]La forma de realización 165 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 17.

[00225]La forma de realización 166 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 18.

[00226]La forma de realización 167 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 19.

[00227]La forma de realización 168 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 20.

[00228]La forma de realización 169 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 21.

[00229]La forma de realización 170 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en

donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 22.

[00230]La forma de realización 171 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 23.

[00231]La forma de realización 172 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 24.

[00232]La forma de realización 173 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 25.

[00233]La forma de realización 174 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 26.

[00234]La forma de realización 175 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 27.

[00235]La forma de realización 176 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 28.

[00236]La forma de realización 177 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 29.

[00237]La forma de realización 178 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 30.

[00238]La forma de realización 179 es el método, la composición para su uso o la

composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 31.

[00239]La forma de realización 180 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 32.

[00240]La forma de realización 181 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 33.

[00241]La forma de realización 182 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 34.

[00242]La forma de realización 183 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 35.

[00243]La forma de realización 184 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 36.

[00244]La forma de realización 185 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 37.

[00245]La forma de realización 186 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 38.

[00246]La forma de realización 187 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 39.

[00247]La forma de realización 188 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 40.

[00248]La forma de realización 189 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 41.

[00249]La forma de realización 190 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 42.

[00250]La forma de realización 191 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 43.

[00251]La forma de realización 192 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 44.

[00252]La forma de realización 193 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 45.

[00253]La forma de realización 194 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 46.

[00254]La forma de realización 195 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 47.

[00255]La forma de realización 196 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-

149 es SEQ ID NO: 48.

[00256]La forma de realización 197 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 49.

[00257]La forma de realización 198 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 50.

[00258]La forma de realización 199 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 51.

[00259]La forma de realización 200 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 52.

[00260]La forma de realización 201 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 53.

[00261]La forma de realización 202 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 54.

[00262]La forma de realización 203 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 55.

[00263]La forma de realización 204 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 56.

[00264]La forma de realización 205 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en

donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 57.

[00265]La forma de realización 206 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 58.

[00266]La forma de realización 207 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 59.

[00267]La forma de realización 208 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 60.

[00268]La forma de realización 209 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 61.

[00269]La forma de realización 210 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 62.

[00270]La forma de realización 211 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 63.

[00271]La forma de realización 212 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 64.

[00272]La forma de realización 213 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 65.

[00273]La forma de realización 214 es el método, la composición para su uso o la

composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 66.

[00274]La forma de realización 215 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 67.

[00275]La forma de realización 216 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 68.

[00276]La forma de realización 217 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 69.

[00277]La forma de realización 218 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 70.

[00278]La forma de realización 219 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 71.

[00279]La forma de realización 220 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 72.

[00280]La forma de realización 221 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 73.

[00281]La forma de realización 222 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 74.

[00282]La forma de realización 223 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 75.

[00283]La forma de realización 224 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 76.

[00284]La forma de realización 225 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 77.

[00285]La forma de realización 226 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 78.

[00286]La forma de realización 227 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 79.

[00287]La forma de realización 228 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 80.

[00288]La forma de realización 229 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 81.

[00289]La forma de realización 230 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 82.

[00290]La forma de realización 231 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-

149 es SEQ ID NO: 83.

[00291]La forma de realización 232 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 84.

[00292]La forma de realización 233 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 85.

[00293]La forma de realización 234 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 86.

[00294]La forma de realización 235 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 87.

[00295]La forma de realización 236 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 88.

[00296]La forma de realización 237 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 89.

[00297]La forma de realización 238 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-89, en donde la secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 90.

[00298]La forma de realización 239 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-89, en donde la secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 91.

[00299]La forma de realización 240 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-89, en donde la secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 92.

[00300]La forma de realización 241 es el método, la composición para su uso o la

composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 93.

[00301]La forma de realización 242 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 94.

[00302]La forma de realización 243 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 95.

[00303]La forma de realización 244 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 96.

[00304]La forma de realización 245 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 97.

[00305]La forma de realización 246 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 98.

[00306]La forma de realización 247 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 99.

[00307]La forma de realización 248 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 100.

[00308]La forma de realización 249 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 101.

[00309]La forma de realización 250 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 102.

[00310]La forma de realización 251 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 103.

[00311]La forma de realización 252 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 104.

[00312]La forma de realización 253 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 105.

[00313]La forma de realización 254 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 106.

[00314]La forma de realización 255 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 107.

[00315]La forma de realización 256 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 108.

[00316]La forma de realización 257 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 109.

[00317]La forma de realización 258 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-

149 es SEQ ID NO: 110.

[00318]La forma de realización 259 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 111.

[00319]La forma de realización 260 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 112.

[00320]La forma de realización 261 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 113.

[00321]La forma de realización 262 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 114.

[00322]La forma de realización 263 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 115.

[00323]La forma de realización 264 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 116.

[00324]La forma de realización 265 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 117.

[00325]La forma de realización 266 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 118.

[00326]La forma de realización 267 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en

donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 119.

[00327]La forma de realización 268 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 120.

[00328]La forma de realización 269 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 121.

[00329]La forma de realización 270 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 122.

[00330]La forma de realización 271 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 123.

[00331]La forma de realización 272 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 124.

[00332]La forma de realización 273 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 125.

[00333]La forma de realización 274 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 126.

[00334]La forma de realización 275 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 127.

[00335]La forma de realización 276 es el método, la composición para su uso o la

composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 128.

[00336]La forma de realización 277 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 129.

[00337]La forma de realización 278 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 130.

[00338]La forma de realización 279 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 131.

[00339]La forma de realización 280 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 132.

[00340]La forma de realización 281 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 133.

[00341]La forma de realización 282 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 134.

[00342]La forma de realización 283 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 135.

[00343]La forma de realización 284 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 136.

[00344]La forma de realización 285 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 137.

[00345]La forma de realización 286 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 138.

[00346]La forma de realización 287 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 139.

[00347]La forma de realización 288 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 140.

[00348]La forma de realización 289 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 141.

[00349]La forma de realización 290 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 142.

[00350]La forma de realización 291 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 143.

[00351]La forma de realización 292 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 144.

[00352]La forma de realización 293 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-

149 es SEQ ID NO: 145.

[00353]La forma de realización 294 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 146.

[00354]La forma de realización 295 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 147.

[00355]La forma de realización 296 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 148.

[00356]La forma de realización 297 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la composición que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149 es SEQ ID NO: 149.

[00357]La forma de realización 298 es el método, composición para su uso o composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la secuencia guía se selecciona de SEQ ID NO: 310-386.

[00358]La forma de realización 299 es el método, composición para su uso o composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la secuencia guía se selecciona de SEQ ID NO: 310-311, 313-326, 329-337, 339-342, 344-346, 348, 350, 352-356, 361, 362, 364, 365, 366, 367, 369-374, 376-380, y 382-386.

[00359]La forma de realización 300 es el método, composición para su uso o composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la secuencia guía se selecciona de SEQ ID NO: 310-386 es SEQ ID NO: 310.

[00360]La forma de realización 301 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende un sgARN que comprende la secuencia guía de cualquiera de SEQ ID NO: 1-149 y cualquiera de la porción conservada de sgARN de la Tabla 4, que tiene opcionalmente el patrón de modificación de SEQ ID NO: 450, o cualquiera de los patrones de modificación descritos en la Tabla 4, opcionalmente en donde el sgARN comprende una modificación en el extremo 5' y 3'.

[00361]La forma de realización 302 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-301, en donde la composición se administra como una única dosis.

[00362]La forma de realización 303 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-301, en donde la composición se administra una única vez.

[00363]La forma de realización 304 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 302 o 303, en donde la única dosis o administración única hace:

- a. inducir una rotura bicatenaria (DSB) dentro del gen *KLKB1* en una célula o un sujeto; y/o
- b. reducir la expresión del gen *KLKB1* en una célula o un sujeto; y/o
- c. tratar o prevenir el HAE en un sujeto; y/o
- d. tratar o prevenir el angioedema causado por o asociado con el HAE en un sujeto; y/o
- e. reducir la concentración de bradiquinina en suero y/o plasma en un sujeto;
- f. reducir la vasodilatación mediada por bradiquinina;
- g. tratar o prevenir la hinchazón mediada por bradiquinina o angioedema; y/o
- h. tratar o prevenir la obstrucción de las vías respiratorias o asfixia causada por la hinchazón.

[00364]La forma de realización 305 es el método o la composición de acuerdo con la forma de realización 304, en donde la única dosis o administración única logra uno o más de a) – h) por 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 semanas.

[00365]La forma de realización 306 es el método o la composición de acuerdo con la forma de realización 304, en donde la dosis única o la administración única logra un efecto duradero.

[00366]La forma de realización 307 es el método, la composición o la composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-306, que comprende además lograr un efecto duradero.

[00367]La forma de realización 308 es el método, la composición o la composición para su uso de acuerdo con la forma de realización 307, en donde el efecto duradero dura al menos 1 mes, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos un año o al menos 5 años.

[00368]La forma de realización 309 es el método, la composición para su uso o la composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-308, en donde la administración de la composición genera una reducción terapéuticamente relevante de la actividad de la calicreína, los niveles plasmáticos totales de calicreína, los niveles de precalicreína y/o calicreína, o bradiquinina en suero y/o plasma.

[00369]La forma de realización 310 es el método, la composición la composición para su uso o de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-309, en donde la administración de la composición genera niveles de bradiquinina en suero y/o plasma dentro de un rango terapéutico

[00370]La forma de realización 311 es el método, la composición la composición para su uso o de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la administración de la composición genera niveles de bradiquinina en suero y/o plasma dentro del 100, 120 o 150 % del rango normal.

[00371]La forma de realización 312 es el uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores para la preparación de un medicamento para tratar a un sujeto humano que tiene HAE.

[00372]La forma de realización 313 es el uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir la producción y acumulación de bradiquinina, hinchazón inducida por bradiquinina, obstrucción de las vías respiratorias por angioedema, o asfixia.

[00373]La forma de realización 314 es el uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir el angioedema causado por o asociado con HAE.

[00374]La forma de realización 315 es el uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores para la preparación de un medicamento para reducir la frecuencia de los ataques de angioedema.

[00375]La forma de realización 316 es el uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores para la preparación de un medicamento para reducir la gravedad de los ataques de angioedema.

[00376]La forma de realización 317 es el uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores para la preparación de un medicamento para reducir la frecuencia y/o gravedad de los ataques de HAE.

[00377]La forma de realización 318 es el uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores para la preparación de un

medicamento para la remisión de los ataques de angioedema.

[00378]La forma de realización 319 es el uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores para la preparación de un medicamento para lograr una remisión duradera, por ejemplo, para mantenerla durante al menos 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[00379]Las Figuras 1A-1D muestran el porcentaje de edición (frecuencia de indel) detectada en varios sitios dentro del locus *KLKB1* mediante el uso de ARN guía en hepatocitos primarios humanos (PHH) (Figuras 1A-1B) y hepatocitos primarios de *Macaca fascicularis* (PCH) (Figuras 1C-1D).

[00380]Las Figuras 2A-2D muestran el porcentaje de edición (frecuencia de indel) de sgARN de *KLKB1* en PHH (Figuras 2A-2B) y PCH (Figuras 2C-2D).

[00381]Las Figuras 3A-3E muestran el porcentaje de edición (frecuencia de indel) (Figura 3A), niveles de proteína *KLKB1* secretada (Figura 3B) y gráficos de correlación (Figuras 3C-E), después de la transfección de PHH con ARN guía dirigidos a *KLKB1* en tres lotes de PHH diferentes (HU8300, HU8284, y HU8296).

[00382]Las Figuras 4A-4D muestran el porcentaje de edición de las guías *KLKB1* en hepatocitos primarios humanos (PHH) (Figuras 4A-4B), y el porcentaje de edición de las guías *KLKB1* en hepatocitos de *Macaca fascicularis* primarios (PCH) (Figuras 4C-4D).

[00383]Las Figuras 5A-5J muestran datos de respuesta a la dosis para el porcentaje de edición y calicreína secretada para ciertas secuencias guía en PHH (Figuras 5A-5D) y PCH (Figuras 5E-5H), y gráficos de correlación del porcentaje de edición y de la proteína secretada en PHH y PCH (Figuras 5I-5J).

[00384]Las Figuras 6A-6D proporcionan datos de la curva de respuesta a la dosis para la frecuencia de indel para ciertas secuencias guía en PHH (Figuras 6A-6B) y PCH (Figuras 6C-6D).

[00385]Las Figuras 7A-7E muestran datos de la curva de respuesta a la dosis para la frecuencia de indel (Figuras 7A y 7B) y la secreción de *KLKB1* (Figuras 7C y 7D) para ciertas secuencias guía en PHH (Figuras 7A y 7C) y PCH (Figuras 7B y 7D) y análisis de transferencia Western para medir la proteína secretada (Figura 7E).

[00386]La Figura 8A muestra el % de edición de *KLKB1* para diversos sgARN modificados *in vivo* en ratones Hu *KLKB1*.

[00387]Las Figuras 8B y 8C muestran los niveles de la proteína *KLKB1* medidos a

través de ELISA y la matriz basada en electroquimioluminiscencia respectivamente en ratones Hu KLKB1 (Ejemplo 6).

[00388]La Figura 8D muestra la relación de cambio de los niveles de mRNA de KLKB1 para cada secuencia en ratones Hu KLKB1.

[00389]Las Figuras 9A-9D muestran los niveles de edición de *KLKB1* (Figura 9A), proteína KLKB1 en suero (precalicreína y calicreína) (Figura 9B), porcentaje de TSS (Figura 9C) en ratones tratados, y la correlación del porcentaje de edición del hígado con el porcentaje de proteína KLKB1 (Figura 9D).

[00390]La Figura 10 muestra los niveles dependientes de la dosis de la edición del gen KLKB1, el porcentaje de inactivación de mRNA de KLKB1, y la calicreína en plasma en el modelo de ratón Hu KLKB1.

[00391]La Figura 11A muestra niveles de edición de gen KLKB1 y calicreína en plasma en un ensayo de respuestas a la dosis luego de un tratamiento con las dosis indicadas de sgARN en el modelo de ratón Hu KLKB1.

[00392]La Figura 11B muestra niveles de absorbancia en 600 nm de luz para detectar el tinte azul de Evans (EB) de las muestras de colon en un ensayo de permeabilidad vascular en respuesta a la dosis en respuesta a un tratamiento con agentes permeabilizantes luego de un tratamiento con las dosis indicadas de sgARN en el modelo de ratón Hu KLKB1.

[00393]Las Figuras 12A-12B muestran reducciones dependientes de la dosis *in vivo* de la actividad de calicreína total circulante (Figura 12A) y los niveles de proteína (Figura 12B), respectivamente, luego de una administración de dosis única de componentes de CRISPR/Cas9 a 1,5 mg/kg, 3 mg/kg, o 6 mg/kg con G013901 en *Macaca fascicularis*.

[00394]Las Figuras 13A-13B muestran las reducciones *in vivo* de la actividad de calicreína total circulante (Figura 13A) y los niveles de proteína (Figura 13B), respectivamente, luego de una administración de dosis única de los componentes de CRISPR/Cas9 en las dosis indicadas con G012267 en *Macaca fascicularis*.

[00395]La Figura 14 etiqueta los 10 sitios YA de región conservada en una secuencia de sgARN de ejemplo (SEQ ID NO: 201) de 1 a 10. Los números 25, 45, 50, 56, 64, 67 y 83 indican la posición de la pirimidina de los sitios YA 1, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 en un sgARN con una región guía indicada como (N)x, por ejemplo, en donde x es opcionalmente 20.

[00396]La Figura 15 muestra un sgARN de ejemplo (SEQ ID NO: 401; no se muestran todas las modificaciones) en una posible estructura secundaria con etiquetas que

designan nucleótidos individuales de la región conservada del sgARN, incluso las regiones de tallo inferior, protuberancia, tallo superior, nexa (cuyos nucleótidos se pueden denominar N1 a N18, respectivamente, en la dirección 5' a 3'), regiones de horquilla 1 y horquilla 2. Un nucleótido entre la horquilla 1 y la horquilla 2 está etiquetado como n. Una región guía puede estar presente en un sgARN y se indica en esta figura como "(N)x" anterior a la región conservada del sgARN.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[00397]A continuación se hará referencia en detalle a ciertas formas de realización de la invención, ejemplos de las cuales se ilustran en los dibujos adjuntos. Si bien la invención se describe junto con las formas de realización ilustradas, se entenderá que no se pretende que limiten la invención a aquellas formas de realización. Por el contrario, la invención pretende abarcar todas las alternativas, modificaciones y equivalentes, que pueden estar incluidos en la invención como se define mediante las reivindicaciones adjuntas y formas de realización incluidas.

[00398]Antes de describir las presentes enseñanzas en detalle, se debe entender que la divulgación no está limitada a composiciones o etapas del proceso específicas, ya que pueden variar. Se debe observar que, como se usan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, 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.

[00399]Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. Se entiende que los valores medidos y medibles son aproximaciones, ya que hay que tomar en cuenta 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 limitativo. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solo con fines ejemplificativos y explicativos y no restringen las enseñanzas.

[00400]A menos que se indique específicamente en la memoria descriptiva, las formas de realización en la memoria descriptiva que indican "que comprende" diversos componentes también contemplan "que consiste en" o "que consiste esencialmente en" los componentes; las formas de realización en la memoria descriptiva que indican "que consiste en" diversos componentes también contemplan "que comprende" o "que consiste esencialmente en" los componentes; y las formas de realización en la

memoria descriptiva que indican "que consiste esencialmente en" diversos componentes también contemplan "que consiste en" o "que comprende" los componentes (esta intercambiabilidad no aplica al uso de estas expresiones en las reivindicaciones).

[00401]El término "o" se usa en sentido inclusivo, es decir, equivalente a "y/o", a menos que el contexto indica claramente lo contrario.

[00402]Los encabezados de sección utilizados en la presente son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitativos del objeto deseado de manera alguna. En caso de que cualquier material incorporado por referencia contradiga cualquier término definido en esta memoria descriptiva o cualquier otro contenido expreso de esta memoria descriptiva, prevalecerá esta memoria descriptiva. Si bien las presentes enseñanzas se describen junto con diversas formas de realización, no se pretende que las presentes enseñanzas se limiten a tales formas de realización. Por el contrario, las presentes enseñanzas abarcan diversas alternativas, modificaciones y equivalentes, como apreciarán las personas del oficio de nivel medio.

I. Definiciones

[00403]A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases como se usan en la presente pretenden tener los siguientes significados:

[00404]"Polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan en la presente para referirse a un compuesto multimérico que comprende nucleósidos o análogos de nucleósidos que tienen bases o análogos de bases heterocíclicas nitrogenadas ligadas juntas a lo largo de una cadena principal, que incluye ARN convencional, ADN, ARN-ADN mixtos y polímeros que son análogos de estos. Una "cadena principal" de ácido nucleico puede estar conformada por una variedad de enlaces, que incluyen uno o más de enlaces de azúcar-fosfodiéster, enlaces de péptido-ácido nucleico ("ácidos nucleicos peptídicos" o PNA; PCT N.º WO 95/32305), enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato o combinaciones de estos. Las porciones azúcar de un ácido nucleico pueden ser ribosa, desoxirribosa o compuestos similares con sustituciones, por ejemplo, sustituciones de 2' metoxi o 2' haluro. Las bases nitrogenadas pueden ser bases convencionales (A, G, C, T, U), análogos de estas (por ejemplo, uridinas modificadas tales como 5-metoxiuridina, pseudouridina, N1-metilpseudouridina u otras); inosina; derivados de purinas o pirimidinas (por ejemplo, N⁴-metil desoxiguanosina, deaza o aza-purinas, deaza o aza-pirimidinas, bases 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, O⁶-metilguanina, 4-tio-pirimidinas,

4-amino-pirimidinas, 4-dimetilhidrazin-pirimidinas y O⁴-alquil-pirimidinas; patente estadounidense N.º 5.378.825 y PCT N.º WO 93/13121). Para obtener un análisis general, ver *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams *et al.*, ed., 11.^a ed., 1992). Los ácidos nucleicos pueden incluir uno o más residuos "abásicos" donde la cadena principal no incluye ninguna base nitrogenada para las posiciones del polímero (patente estadounidense N.º 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 de 2' metoxi, o polímeros que contienen bases convencionales y uno o más análogos de bases). Ácido nucleico incluye "ácido nucleico bloqueado" (LNA), un análogo que contiene uno o más monómeros de nucleótido de LNA con una unidad de furanosa bicíclica bloqueada en una conformación de azúcar que imita al ARN, que mejora la afinidad de hibridación con secuencias de ARN y ADN complementarias (Vester y Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41). El ARN y ADN tienen diferentes porciones azúcar y pueden diferir por la presencia de uracilo o análogos de este en ARN y timina o análogos de esta en ADN.

[00405]"ARN guía", "gARN" y simplemente "guía" se usan en la presente de manera indistinta para referirse a la guía que dirige un agente de fijación a ADN guiado por ARN a un ADN diana y puede ser un crARN (también conocido como ARN de CRISPR) o la combinación de un crARN y un trARN (también conocida como tracrARN). El crARN y trARN pueden estar asociados como una única molécula de ARN (ARN guía único, sgARN) o en dos moléculas de ARN distintas (ARN guía dual, dgARN). "ARN guía" o "gARN" se refiere a cada tipo. El trARN puede ser una secuencia natural o una secuencia de trARN con modificaciones o variaciones en comparación con secuencias naturales.

[00406]Como se usa en la presente, una "secuencia guía" se refiere a una secuencia dentro de un ARN guía que es complementaria a una secuencia diana y funciona para dirigir un ARN guía a una secuencia diana para la fijación o modificación (por ejemplo, escisión) por parte de un agente de fijación a ADN guiado por ARN. Una "secuencia guía" también se puede denominar "secuencia de direccionamiento" o "secuencia espaciadora". Una secuencia guía puede tener 20 pares de bases de longitud, por ejemplo, en el caso de *Streptococcus pyogenes* (es decir, Spy Cas9) y homólogos/ortólogos de Cas9 relacionados. También se pueden usar secuencias más cortas o más largas como guías, por ejemplo, de 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la secuencia

guía comprende al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-149. En algunas formas de realización, la secuencia diana está en un gen o en un cromosoma, por ejemplo, y es complementaria a la secuencia guía. En algunas formas de realización, el grado de complementariedad o identidad entre una secuencia guía y su secuencia diana correspondiente puede ser de alrededor de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la secuencia guía comprende una secuencia con alrededor de 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 seleccionada de SEQ ID NO: 1-149. En algunas formas de realización, la secuencia guía y la región diana pueden ser 100 % complementarias o idénticas. En otras formas de realización, la secuencia guía y la región diana pueden contener al menos un error de apareamiento. Por ejemplo, la secuencia guía y la secuencia diana pueden contener 1, 2, 3 o 4 errores de apareamiento, cuando la longitud total de la secuencia diana es de al menos 17, 18, 19 20 o más pares de bases. En algunas formas de realización, la secuencia guía y la región diana pueden contener 1-4 errores de apareamiento, cuando la secuencia guía comprende al menos 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos. En algunas formas de realización, la secuencia guía y la región diana pueden contener 1, 2, 3 o 4 errores de apareamiento, cuando la secuencia guía comprende 20 nucleótidos.

[00407]Las secuencias dianas para agentes de fijación a ADN guiados por ARN incluyen cadenas tanto positivas como negativas de ADN genómico (es decir, la secuencia dada y el complemento inverso de la secuencia), ya que un sustrato de ácido nucleico para un agente de fijación a ADN guiado por ARN es un ácido nucleico bicatenario. En consecuencia, cuando se afirma que una secuencia guía es "complementaria a una secuencia diana", debe entenderse que la secuencia guía puede dirigir un ARN guía para que se fije al complemento inverso de una secuencia diana. Por lo tanto, en algunas formas de realización, cuando la secuencia guía se fija al complemento inverso de una secuencia diana, la secuencia guía es idéntica a ciertos nucleótidos de la secuencia diana (por ejemplo, la secuencia diana que no incluye PAM), excepto por la sustitución de U por T en la secuencia guía.

[00408]Como se usa en la presente, un "agente de fijación a ADN guiado por ARN" significa un polipéptido o complejo de polipéptidos que tiene actividad de fijación a ARN y ADN, o una subunidad de fijación a ADN de tal complejo, en donde la actividad de fijación a ADN es específica de la secuencia y depende de la secuencia del ARN.

Los agentes de fijación a ADN guiados por ARN de ejemplo incluyen escindasas/nickasas Cas y formas inactivadas de estas ("agentes de fijación a ADN de dCas"). Como se usa en la presente, "nucleasa Cas", también denominada "proteína Cas", abarca escindasas Cas, nickasas Cas y agentes de fijación a ADN de dCas. Las escindasas/nickasas Cas y agentes de fijación a ADN de dCas incluyen un complejo Csm o Cmr de un sistema CRISPR de tipo III o la subunidad Cas10, Csm1 o Cmr2 de este; un complejo de cascada de un sistema CRISPR de tipo I, la subunidad Cas3 de este y nucleasas Cas de clase 2. Como se usa en la presente, una "nucleasa Cas de clase 2" es un polipéptido monocatenario con actividad de fijación a ADN guiada por ARN. Las nucleasas Cas de clase 2 incluyen escindasas/nickasas Cas de clase 2 (por ejemplo, variantes de H840A, D10A o N863A), que tienen además actividad de escindasa o nickasa de ADN guiada por ARN, y agentes de fijación a ADN de dCas de clase 2, en los que la actividad de escindasa/nickasa está inactivada. Las nucleasas Cas de clase 2 incluyen, por ejemplo, las proteínas Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (por ejemplo, variantes N497A, R661A, Q695A, Q926A), HypaCas9 (por ejemplo, variantes N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1.0) (por ejemplo, las variantes K810A, K1003A, R1060A) y eSPCas9(1.1) (por ejemplo, las variantes K848A, K1003A, R1060A) y modificaciones estas. La proteína Cpf1, Zetsche *et al.*, *Cell*, 163: 1-13 (2015), es homóloga a Cas9 y contiene un dominio de nucleasa similar a RuvC. Las secuencias de Cpf1 de Zetsche se incorporan por referencia en su totalidad. Ver, por ejemplo, Zetsche, Tablas S1 y S3. Ver, por ejemplo, Makarova *et al.*, *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov *et al.*, *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015).

[00409] Como se usa en la presente, "ribonucleoproteína" (RNP) o "complejo de RNP" se refiere a un ARN guía junto con un agente de fijación a ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas, por ejemplo, una escindasa Cas, una nickasa Cas o un agente de fijación a ADN de dCas (por ejemplo, Cas9). En algunas formas de realización, el ARN guía dirige el agente de fijación a ADN guiado por ARN tal como Cas9 a una secuencia diana, y el ARN guía se hibrida con, y el agente se fija a, la secuencia diana; cuando el agente es una escindasa o nickasa, la fijación puede estar seguida por escisión o corte (*nicking*).

[00410] Como se usa en la presente, 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 100 % de identidad con la secuencia AAG ya que la alineación proporcionaría 100 % de identidad puesto que hay coincidencias en las tres posiciones de la segunda secuencia. Las diferencias entre ARN y ADN (generalmente el intercambio de uridina por timidina o viceversa) y la presencia de análogos de nucleósidos tales como uridinas modificadas no contribuyen a diferencias en la identidad o complementariedad entre los polinucleótidos siempre que los nucleótidos pertinentes (tales como timidina, uridina o uridina modificada) tengan el mismo complemento (por ejemplo, adenosina para todas de timidina, uridina o uridina modificada; otro ejemplo es citosina y 5-metilcitosina, que tienen guanosina o guanosina modificada como un complemento). Por lo tanto, por ejemplo, la secuencia 5'-AXG donde X es cualquier uridina modificada, tal 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). Los algoritmos de alineación de ejemplo son los algoritmos Smith-Waterman y Needleman-Wunsch, que se conocen en la técnica. Una persona del oficio de nivel medio entenderá cuál opción de algoritmo y configuraciones de parámetros son adecuados para alinear un par de secuencias determinadas; para secuencias de longitud generalmente similar e identidad prevista >50 % para aminoácidos o >75 % para nucleótidos, por lo general, es adecuado el algoritmo Needleman-Wunsch con configuraciones predeterminadas de la interfaz del algoritmo Needleman-Wunsch proporcionado por EBI en el servidor www.ebi.ac.uk web.

[00411]"mARN" se usa en la presente para referirse a un polinucleótido y comprende un marco de lectura abierto que se puede traducir en un polipéptido (es decir, puede servir como un sustrato para la traducción mediante un ribosoma y tARN acilados con amino). mARN 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 formas de realización, los azúcares de una cadena principal de fosfato-azúcar de mARN pueden consistir esencialmente en residuos de ribosa, residuos de 2'-metoxi ribosa o una combinación de estos.

[00412]Las secuencias guía útiles en las composiciones y los métodos de ARN guía descritos en la presente se muestran en la Tabla 1 o Tabla 2 y a lo largo de la solicitud.

[00413]Como se usa en la presente, "indeles" se refiere a mutaciones de inserción/eliminación que consisten en una cantidad de nucleótidos que se insertan o

elimina en el sitio de roturas bicatenarias (DSB) en un ácido nucleico diana.

[00414] Como se usa en la presente, "inhibición" se refiere a una disminución de la expresión de un producto génico particular (por ejemplo, proteína, mRNA o ambos). La inactivación de una proteína se puede medir al detectar la cantidad celular total de la proteína de una muestra, tal como tejido, fluido o una población celular de interés. También se puede medir al medir un sustituto, marcador, o actividad de la proteína. Se conocen métodos para medir la inactivación de mRNA e incluyen la secuenciación de mRNA aislado de una muestra de interés. En algunas formas de realización, "inactivación" puede referirse a algo de pérdida de la expresión de un producto génico particular, por ejemplo, una disminución de la cantidad de mRNA transcrito o una disminución de la cantidad de proteína expresada por una población de células (que incluyen poblaciones *in vivo*, tales como las que se encuentran en tejidos).

[00415] Como se usa en la presente, "inactivación" se refiere a una pérdida de expresión de un gen particular o de una proteína particular en una célula. La inactivación se puede medir al detectar la cantidad celular total de una proteína en una célula, un tejido o una población de células. En algunas formas de realización, los métodos de la invención "inactivan" *KLKB1* en una o más muestras, por ejemplo, suero, plasma, tejido o células (por ejemplo, en una población de células que incluyen poblaciones *in vivo*, tales como las que se encuentran en tejidos). En algunas formas de realización, una inactivación no es la formación de proteína *KLKB1* mutante, por ejemplo, creada mediante indeles, sino la pérdida completa de expresión de proteína *KLKB1* en una célula. Como se usa en la presente, "*KLKB1*" generalmente se refiere a precalicreína, que es el producto génico de un gen *KLKB1*. La precalicreína se procesa en calicreína en plasma (pKal) y los anticuerpos pueden detectar pKal, precalicreína o ambas. La secuencia de *KLKB1* humano de tipo silvestre está disponible en NCBI Gen ID: 3818; Ensembl: ENSG00000164344. "PKK", "PPK", "KLK3" y "PKKD" son sinónimos de genes. El transcrito de *KLKB1* humana está disponible en Ensembl: ENST00000264690, y la secuencia de *KLKB1* de tipo silvestre de *Macaca fascicularis* está disponible en Ensembl: ENSMFAT00000002355.

[00416] El "angioedema hereditario" (HAE) es un trastorno inflamatorio caracterizado por episodios recurrentes de hinchazón grave (angioedema), debido a mutaciones inactivadoras del gen *SERPINC1*, que codifica la proteína inhibidora de la esterasa C1 (C1-INH). C1-INH bloquea la actividad de ciertas proteínas que promueven la inflamación (por ejemplo, en el sistema Kinin). Los niveles deficientes de C1-INH provocan el descontrol del Factor XII (FXII) y un alto nivel de activación de la calicreína

(pKal, procesada a partir de la proteína KLKB1 (precalicreína)). La calicreína escinde el cininógeno de alto peso molecular (HMWK) para liberar bradiquinina, un péptido que afecta a la permeabilidad vascular. Una cantidad excesiva de bradiquinina en la sangre provoca la fuga de líquido a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia los tejidos corporales, lo que provoca la hinchazón que se observa en las personas con HAE. Por lo tanto, en algunas formas de realización, se proporcionan métodos para disminuir la actividad de KLKB1, en donde una vez reducida, se disminuye la producción de bradiquinina y se reducen los ataques de hinchazón. Los niveles de proteína de precalicreína/calicreína, HMWK y sus productos de escisión, y sustratos etiquetados sustitutos de HMWK se pueden medir para evaluar la eficacia de la inactivación de KLKB1.

[00417]Como se usa en la presente, una "secuencia diana" se refiere a una secuencia de ácido nucleico en un gen diana que es complementaria a la secuencia guía del gARN. La interacción de la secuencia diana y la secuencia guía dirige un agente de fijación a ADN guiado por ARN para fijarse, y potencialmente cortar o escindir (según la actividad del agente), dentro de la secuencia diana.

[00418]Como se usa en la presente, un "sitio YA" se refiere a un 5'-pirimidin-adenin-3' dinucleótido. Un "sitio YA de región conservada" está presente en la región conservada de un sgARN. Un "sitio YA de región guía" está presente en la región guía de un sgARN. Un sitio YA no modificado en un sgARN puede ser susceptible de escisión por endonucleasas similares a RNasa-A, por ejemplo, RNasa A. En algunas formas de realización, un sgARN comprende alrededor de 10 sitios YA en su región conservada. En algunas formas de realización, un sgARN comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sitios YA en su región conservada. Se indican sitios YA de región conservada de ejemplo en la Figura 14 (SEQ ID NO: 201), en relación con una estructura de sgARN (Figura 15). Los sitios YA de región guía de ejemplo no se muestran en la Figura 14, ya que la región guía puede ser cualquier secuencia, incluso cualquier cantidad de sitios YA. En algunas formas de realización, un sgARN comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los sitios YA indicados en la Figura 14. En algunas formas de realización, un sgARN comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sitios YA en las siguientes posiciones o un subconjunto de estas: LS5-LS6; US3-US4; US9-US10; US12-B3; LS7-LS8; LS12-N1; N6-N7; N14-N15; N17-N18; y H2-2 a H2-3. En algunas formas de realización, un sitio YA comprende una modificación, lo que significa que al menos un nucleótido del sitio YA está modificado. En algunas formas de realización, la pirimidina (también denominada posición de pirimidina) del sitio YA

comprende una modificación (que incluye una modificación que altera el enlace internucleósido inmediatamente en la dirección 3' del azúcar de la pirimidina). En algunas formas de realización, la adenina (también denominada posición de adenina) del sitio YA comprende una modificación (que incluye una modificación que altera el enlace internucleósido inmediatamente en la dirección 3' del azúcar de la adenina). En algunas formas de realización, la posición de pirimidina y la posición de adenina del sitio YA comprenden modificaciones.

[00419] Como se usa en la presente, "tratamiento" se refiere a cualquier administración o aplicación de un agente terapéutico contra una enfermedad o un 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 recidiva de uno o más síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento contra el HAE puede comprender aliviar los síntomas del HAE.

[00420] La expresión "reducción terapéuticamente relevante de la actividad de KLKB1" puede significar una reducción de la actividad de KLKB1 en el plasma mayor de alrededor de 60 %, en comparación con los valores iniciales. Ver, Banerji *et al.*, N Engl J Med, 2017, 376:717-728; Ferrone *et al.*, Nucleic Acid Therapeutics, 2019, 82-917. La actividad de KLKB1 se suele medir como actividad de calicreína total, en la que la precalicreína se convierte en calicreína en una muestra y se mide la actividad de calicreína total de la muestra. En algunos casos, un rango de reducción de la actividad de KLKB1 puede significar alrededor de 60-80 % de reducción de la actividad de KLKB1 en plasma en comparación con los valores iniciales. Para calcular la reducción de un analito en un sujeto, se puede obtener un valor inicial al recolectar una muestra de pretratamiento del sujeto. En algunos casos, la muestra es una muestra de suero. En ciertos aspectos, la reducción de la actividad de KLKB1 diana es de alrededor de 60 % de reducción de la actividad de calicreína total (precalicreína y calicreína en plasma) en comparación con los valores iniciales. Por ejemplo, alcanzar los niveles de actividad de KLKB1 dentro de un rango terapéutico puede significar la reducción de la calicreína total en alrededor de >60 % a partir de los valores iniciales. En algunas formas de realización, se reduce un "nivel normal de calicreína" o un "rango normal de calicreína". En algunas formas de realización, una reducción terapéuticamente relevante de la actividad de calicreína alcanza niveles de alrededor de 0-60 %, 0-50 %, 0-40 %, 0-30 %, 0-25 %, 0-20 %, 0-15 %, 0-10 % de un valor inicial para el sujeto, o 10-60 %, 10-50 %, 10-40 %, 10-30 %, 10-20 %, o 20-60 %, 20-50 %, 20-40 %, o 20-30 %, del nivel normal de actividad de calicreína. La actividad de KLKB1 se puede

medir a través de ensayos conocidos en el campo, que incluyen los ensayos descritos en la presente.

[00421]La expresión "reducción de la proteína KLKB1 diana", tal y como se utiliza en la presente, significa el nivel diana de pKal en comparación con los valores iniciales. Los niveles de la proteína KLKB1 se pueden medir a través de ensayos conocidos en el campo, tales como ensayos ELISA o de transferencia Western, como se describe en la presente. La proteína KLKB1 total se puede medir con un anticuerpo que detecte la precalicreína y la calicreína y/o después de convertir la precalicreína en calicreína en una muestra. En algunos casos, la muestra es una muestra de suero. En ciertos aspectos, la reducción de la proteína KLKB1 diana es alrededor de 60 % de reducción de la calicreína total (precalicreína y calicreína en plasma) en comparación con los valores iniciales. En algunas formas de realización, una reducción terapéuticamente relevante de la proteína calicreína total alcanza niveles de alrededor de 0-60 %, 0-50 %, 0-40 %, 0-30 %, 0-25 %, 0-20 %, 0-15 %, 0-10 % de un valor inicial para el sujeto, o 10-60 %, 10-50 %, 10-40 %, 10-30 %, 10-20 %, o 20-60 %, 20-50 %, 20-40 %, o 20-30 %, del nivel normal de actividad de calicreína total.

[00422]Los niveles de cHMWK en plasma en circulación por debajo de alrededor de 30 % HMWK total se asociaron con disminuciones en los ataques de HAE en pacientes tratados con lanadelumab (ver Banerji, *et al.*, 2017). En este mismo estudio, los controles sanos tuvieron niveles plasmáticos de cHMWK de alrededor de 8,3 % HMWK total. En otro estudio, Suffritti *et al.* encontraron niveles plasmáticos de cHMWK de un promedio de alrededor de 34,8 % en controles normales, alrededor de 41,4 % en pacientes con HAE en remisión y alrededor de 58,1 % en pacientes con HAE durante un ataque (Suffritti, *et al.* Clin Exp Allergy 2014;44:1503-14). El tratamiento terapéutico puede dirigirse a una relación de cHMWK en plasma en circulación con respecto a HMWK total de menos de alrededor de 60 %. En algunas formas de realización la relación de cHMWK con respecto a HMWK es menor de alrededor de 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 50 % o más.

[00423]La expresión "alrededor de" o "aproximadamente" significa un error aceptable para un valor particular determinado por una persona del oficio de nivel medio, que depende en parte de cómo se mide o determina el valor.

II. Composiciones

A. Composiciones que comprenden ARN guía (gARN)

[00424]En la presente se proporcionan composiciones útiles para inducir una rotura bicatenaria (DSB), rotura monocatenaria, y/o de fijación específica al sitio que dan

como resultado las modificaciones de ácido nucleico dentro del gen *KLKB1*, por ejemplo, mediante el uso de un ARN guía con un agente de fijación a ADN guiado por ARN (por ejemplo, un sistema CRISPR/Cas). Las composiciones se pueden administrar a sujetos que tienen o que se cree que tienen HAE. Las composiciones se pueden administrar a sujetos que tengan un aumento de la concentración de bradiquinina en suero y/o plasma, según lo medido, por ejemplo, mediante una disminución de los niveles de proteína de precalicreína en plasma o en suero, mediante una disminución de los niveles de proteína de calicreína total (precalicreína y pKal) en plasma o en suero, mediante una disminución de la proporción de HMWK escindida en circulación (cHMWK), o por una disminución de la proporción de cHMWK en el plasma citratado. Las composiciones se pueden administrar a sujetos que tengan un aumento de la concentración de precalicreína y/o calicreína en suero y/o plasma. Las composiciones se pueden administrar a sujetos que tengan un aumento de la concentración de calicreína total en suero y/o plasma. Las composiciones se pueden administrar a sujetos que tengan una actividad de calicreína en suero y/o plasma aumentada. Las secuencias guía que se dirigen al gen *KLKB1* se muestran en la Tabla 1 en SEQ ID NO: 1-149.

[00425]Cada una de las secuencias guía mostradas en la Tabla 1 en SEQ ID NO: 1-149 pueden comprender además nucleótidos adicionales para formar un crARN, por ejemplo, con la siguiente secuencia de nucleótidos de ejemplo tras la secuencia guía en su extremo 3': GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 167) en la orientación de 5' a 3'. En el caso de sgARN, las secuencias guía anteriores pueden comprender además nucleótidos adicionales para formar un sgARN, por ejemplo, con la siguiente secuencia de nucleótidos de ejemplo tras el extremo 3' de la secuencia guía:

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA
AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 171) o
GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA
AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 172, que es SEQ ID NO: 171 sin los
cuatro U terminales) en la orientación de 5' a 3'. En algunas formas de realización, los
cuatro U terminales de SEQ ID NO: 171 no están presentes. En algunas formas de
realización, solo 1, 2 o 3 de los cuatro U terminales de SEQ ID NO: 171 están
presentes.

[00426]En algunas formas de realización, el sgARN comprende cualquiera de las
secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149 y nucleótidos adicionales para formar un

crARN, por ejemplo, con la siguiente secuencia de nucleótidos de ejemplo tras la secuencia guía en su extremo 3':
 GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGG
 CACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 170) o
 GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGG
 CACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 173) en la orientación 5' a 3'. SEQ ID NO: 173 carece de 8 nucleótidos con referencia a una secuencia conservada de ARN guía de tipo silvestre:
 GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA
 AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 172)

[00427]En algunas formas de realización, se proporcionan ARN guía simples cortos de *KLKB1* (sgARN cortos de *KLKB1*) que comprenden una secuencia guía como se describe en la presente y una "porción conservada de un sgARN" que comprende una región de horquilla, en donde la región de horquilla carece de al menos 5-10 nucleótidos o 6-10 nucleótidos. En ciertas formas de realización, una región de horquilla de los ARN guía simples cortos de *KLKB1* carece de 5-10 nucleótidos con referencia a la porción conservada de un sgARN, por ejemplo, los nucleótidos H1-1 a H2-15 en la Tabla 3B y la Figura 15. En ciertas formas de realización, una región de horquilla 1 de los ARN guía simples cortos de *KLKB1* carece de 5-10 nucleótidos con referencia a la porción conservada de un sgARN, por ejemplo, los nucleótidos H1-1 a H1-12 en la Tabla 3B y la Figura 15. Ver, por ejemplo, WO2019/237069, cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia en su totalidad, por ejemplo, en las reivindicaciones 1-15.

[00428]Una "porción conservada de un sgARN" de ejemplo se muestra en la Tabla 3A (ver también la Figura 15), que muestra una "región conservada" de un sgARN de Cas9 de *S. pyogenes* ("spyCas9" (también denominada "spCas9")). La primera fila muestra la numeración de los nucleótidos, la segunda fila muestra la secuencia (SEQ ID NO: 500); y la tercera fila muestra los "dominios". *Briner AE et al., Molecular Cell* 56:333–339 (2014) describe dominios funcionales de sgARN, denominados en la presente "dominios", que incluyen el dominio "espaciador" que se encarga del direccionamiento y los dominios de "tallo inferior", "protuberancia", "tallo superior" (que puede incluir un tetrabucle), "nexo", "horquilla 1" y "horquilla 2". Ver Briner *et al.* en la página 334, Figura 1A.

[00429]La Tabla 3B proporciona un esquema de los dominios de un sgARN como se usa en la presente. En la Tabla 3B, la "n" entre las regiones representa una cantidad

variable de nucleótidos, por ejemplo, de 0 a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más. En algunas formas de realización, n es igual a 0. En algunas formas de realización, n es igual a 1.

[00430]En algunas formas de realización, el sgARN de *KLKB1* es de Cas9 de *S. pyogenes* ("spyCas9") o un equivalente de spyCas9. En algunas formas de realización, el sgARN no es de *S. pyogenes* ("no spyCas9"). En algunas formas de realización, los 5-10 nucleótidos o 6-10 nucleótidos son consecutivos.

[00431]En algunas formas de realización, un sgARN corto de *KLKB1* carece de al menos los nucleótidos 54-58 (AAAAA) de la porción conservada de un sgARN de Cas9 de *S. pyogenes* ("spyCas9"), como se muestra en la Tabla 3A. En algunas formas de realización, un sgARN corto de *KLKB1* es un sgARN no de spyCas9 que carece de al menos los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 54-58 (AAAAA) de la porción conservada de una spyCas9 según lo determinado, por ejemplo, mediante alineación por pares o estructural. En algunas formas de realización, el sgARN no de spyCas9 es sgARN de Cas9 de *Staphylococcus aureus* ("saCas9").

[00432]En algunas formas de realización, un sgARN corto de *KLKB1* carece de al menos los nucleótidos 54-61 (AAAAAGUG) de la porción conservada de un sgARN de spyCas9. En algunas formas de realización, un sgARN corto de *KLKB1* carece de al menos los nucleótidos 53-60 (GAAAAAGU) de la porción conservada de un sgARN de spyCas9. En algunas formas de realización, un sgARN corto de *KLKB1* carece de 4, 5, 6, 7 o 8 nucleótidos de los nucleótidos 53-60 (GAAAAAGU) o los nucleótidos 54-61 (AAAAAGUG) de la porción conservada de un sgARN de spyCas9, o los correspondientes nucleótidos de la porción conservada de un sgARN no de spyCas9 según lo determinado, por ejemplo, mediante alineación por pares o estructural.

Tabla 1: Secuencia guía dirigida a *KLKB1* humana, coordenadas cromosómicas, y ARN guía simple y ARN guía dual humanos, y guías simples sustitutas de *Macaca fascicularis* (cyano)

SEQ ID NO: (humana)	Coordenadas genómicas de ejemplo (hg38)	secuencia guía humana	sgARN humano	dgARN humano	sgARN de <i>Macaca fascicularis</i>	SEQ ID NO: de guía de <i>Macaca fascicularis</i>
1	chr4:186228230-186228252	ACAGGAAACU GUAGCAAACA	G01225 3	CR0059 16	NA	NA
2	chr4:186228248-186228270	AUAGAUAAUU CACUUACCAC	G01225 4	CR0059 17	NA	NA
3	chr4:186232154-186232176	UACAUCCCCA CCUCUGAAGA	G01225 5	CR0059 18	NA	NA
4	chr4:186251256-186251278	UCUUGAGGAG UAGAGGAACU	G01225 6	CR0059 22	NA	NA
5	chr4:186251308-186251330	ACCAGGUAAA GUUCUUUUGC	G01225 7	CR0059 24	NA	NA
6	chr4:186251489-186251511	GGGUAAUUUU UAGAAUGGCA	G01225 8	CR0059 25	NA	NA
7	chr4:186251504-186251526	AUUUACCCGG GAGUUGACUU	G01225 9	CR0059 28	NA	NA
8	chr4:186251507-186251529	UACCCGGGAG UUGACUUUGG	G01226 0	CR0059 29	NA	NA
9	chr4:186251828-186251850	UCUUUGAGAU UGUGUAACAC	G01226 1	CR0059 31	NA	NA
10	chr4:186251829-186251851	CUUUGAGAUU GUGUAACACU	G01226 2	CR0059 32	NA	NA
11	chr4:186251830-186251852	UUUGAGAUUG UGUAACACUG	G01226 3	CR0059 33	NA	NA
12	chr4:186254748-186254770	UACAUACCAG UGAAUUCAA	G01226 4	CR0059 43	NA	NA
13	chr4:186251784-186251806	CUCCAACUAG GAUUGCGUUA	G01226 5	CR0059 49	G013933	373
14	chr4:186251792-186251814	AGGAUUGCGU AUGGGACACA	G01226 6	CR0059 51	G013904	344
15	chr4:186251793-186251815	GGAUUGCGUA UGGGACACAA	G01226 7	CR0059 52	G013901	341
16	chr4:186238297-186238319	GUUACUCAGC ACCUUUUAUAG	G01226 8	CR0059 56	G013945	385
17	chr4:186238263-186238285	UGCCUAUUA AGUACAGUCC	G01226 9	CR0059 59	NA	NA
18	chr4:186251772-186251794	CUAUGGAUGG UUCUCCAACU	G01227 0	CR0059 60	G013922	362
19	chr4:186254601-186254623	GAUGUUUGGC GCAUCUAUAG	G01227 1	CR0059 63	G013921	361
20	chr4:186254592-186254614	AUGCGCCAAA CAUCCUGCAG	G01227 2	CR0059 70	G013885	325
21	chr4:186236785-186236807	CUCCUUUAUG AAUGUCUAGA	G01227 3	CR0059 79	G013905	345
22	chr4:186236863-186236885	UGUUACUGGU GCACCUUUUU	G01227 4	CR0059 82	NA	NA
23	chr4:186254593-186254615	GAUGCGCCAA ACAUCCUGCA	G01227 5	CR0059 83	G013876	316
24	chr4:186232192-186232214	AUCUGGCAGU AUUGGGCAUU	G01227 6	CR0059 92	G013915	355
25	chr4:186236893-186236915	GCGUGGCAUA UGAAAAAAAC	G01227 7	CR0059 94	NA	NA
26	chr4:186236798-186236820	UAUAAAGGAG UUGAUUAGAG	G01227 8	CR0059 95	G013913	353
27	chr4:186236938-186236960	ACACCUUGAA UUGUACUCAC	G01227 9	CR0059 98	NA	NA
28	chr4:186232214-186232236	UGAGGUGCAC AUUCCACCCA	G01228 0	NA	NA	NA
29	chr4:186232190-186232212	CUGGCAGUAU UGGGCAUUUG	G01228 1	NA	NA	NA
30	chr4:186232148-186232170	AAAACGCCUU CUUCAGAGGU	G01228 2	NA	NA	NA
31	chr4:186232227-	UGAAUAGCAA	G01228	NA	NA	NA

SEQ ID NO: (humana)	Coordenadas genómicas de ejemplo (hg38)	secuencia guía humana	sgARN humano	dgARN humano	sgARN de <i>Macaca fascicularis</i>	SEQ ID NO: de guía de <i>Macaca fascicularis</i>
	186232249	ACACCUUGGG	3			
32	chr4:186236821- 186236843	AGUCAUUUU AAUGUGUCUA	G01228 4	NA	NA	NA
33	chr4:186236850- 186236872	GUGUUGAAGA AUGCCAAAA	G01228 5	NA	NA	NA
34	chr4:186236910- 186236932	UGCCUUGUGA AAUGUUUGCG	G01228 6	NA	NA	NA
35	chr4:186250265- 186250287	GCAUCUUGCG UUCUCAGAUG	G01228 7	NA	G013927	367
36	chr4:186250276- 186250298	UCUCAGAUGU GGAUGUUGCC	G01228 8	NA	NA	NA
37	chr4:186250306- 186250328	CUCCAGAUGC UUUUGUGUGU	G01228 9	NA	NA	NA
38	chr4:186251325- 186251347	UAUUAUCAA UCACAUUACC	G01229 0	NA	NA	NA
39	chr4:186251271- 186251293	CCAGAUUAGG UGUUUUUCUUG	G01229 1	NA	NA	NA
40	chr4:186251300- 186251322	AAGUUCUUUU GCAGGUUAAA	G01229 2	NA	NA	NA
41	chr4:186251620- 186251642	UUUACUCCCA GAAGACUGUA	G01229 3	NA	NA	NA
42	chr4:186251492- 186251514	UGCCAUUCUA AAAUUUACCC	G01229 4	NA	NA	NA
43	chr4:186251572- 186251594	UCAUCUUUGU GCAAGUCUCU	G01229 5	NA	NA	NA
44	chr4:186251510- 186251532	UCUCCUCCAA AGUCAACUCC	G01229 6	NA	NA	NA
45	chr4:186252049- 186252071	GGAGGAACAA ACUCUUCUUG	G01229 7	NA	NA	NA
46	chr4:186252098- 186252120	AGGUGAAGCU GACAGCUCAG	G01229 8	NA	NA	NA
47	chr4:186256046- 186256068	CCAUCCGGUU ACCCAACAGU	G01229 9	NA	G013931	371
48	chr4:186256042- 186256064	UAUACCAACU GUUGGGU AAC	G01230 0	NA	G012300	NA
49	chr4:186256034- 186256056	GCACAAUUUA UACCAACUGU	G01230 1	NA	NA	NA
50	chr4:186256059- 186256081	AACCGGAUGG GGCUUCUCGA	G01230 2	NA	G013932	372
51	chr4:186256047- 186256069	CAACUGUUGG GUAACCGGAU	G01230 3	NA	G013882	322
52	chr4:186256035- 186256057	CACAAUUUAU ACCAACUGUU	G01230 4	NA	G012304	NA
53	chr4:186256046- 186256068	CCAACUGUUG GGUAACCGGA	G01230 5	NA	G013924	364
54	chr4:186256061- 186256083	CUCCUUCGAG AAGCCCAUC	G01230 6	NA	NA	NA
55	chr4:186256048- 186256070	AACUGUUGGG UAACCGGAUG	G01230 7	NA	G013914	354
56	chr4:186256003- 186256025	CCAUAUAGCC UACCUUCCAA	G01230 8	NA	NA	NA
57	chr4:186256015- 186256037	GUGCUUGUGU CACCUUUGGA	G01230 9	NA	G013900	340
58	chr4:186256011- 186256033	UUGUGUACCC UUUGGAAGGU	G01231 0	NA	NA	NA
59	chr4:186256019- 186256041	AAUUGUGCUU GUGUACCUU	G01231 1	NA	NA	NA
60	chr4:186255996- 186256018	AAGGUAGGCA UAUUGGUUUU	G01231 2	NA	NA	NA
61	chr4:186257312- 186257334	ACCCAACGGA UGGUCUGUC	G01231 3	NA	NA	NA
62	chr4:186257314- 186257336	AGCCAGCACA GACCAUCCGU	G01231 4	NA	NA	NA
63	chr4:186257302- 186257324	UUUAUAAUA ACCCAACGGA	G01231 5	NA	G012315	NA
64	chr4:186257326- 186257348	CUGUGCUGGC UAUAAAGAAG	G01231 6	NA	NA	NA

SEQ ID NO: (humana)	Coordenadas genómicas de ejemplo (hg38)	secuencia guía humana	sgARN humano	dgARN humano	sgARN de <i>Macaca fascicularis</i>	SEQ ID NO: de guía de <i>Macaca fascicularis</i>
65	chr4:186257261-186257283	CAUUCUUCAU UUGUUACCAA	G01231 7	NA	NA	NA
66	chr4:186257284-186257306	UAUAAUCUUG AUAUCUUUUC	G01231 8	NA	NA	NA
67	chr4:186257313-186257335	GCCAGCACAG ACCAUCCGUU	G01231 9	NA	NA	NA
68	chr4:186257324-186257346	GUCUGUGCUG GCUAUAAGA	G01232 0	NA	G012320	NA
69	chr4:186257325-186257347	UCUGUGCUGG CUAUAAGAA	G01232 1	NA	NA	NA
70	chr4:186258130-186258152	GUCCAUGUAC UCAGCGACUU	G01232 2	NA	G012322	NA
71	chr4:186258128-186258150	CACCAAAGUC GCUGAGUACA	G01232 3	NA	G012323	NA
72	chr4:186258050-186258072	ACACAAUGGA AUGUGCGUU	G01232 4	NA	G012324	NA
73	chr4:186258068-186258090	UUUGGUGGGC AUCACCAGCU	G01232 5	NA	G012325	NA
74	chr4:186258204-186258226	CUCUGGACUG CUUCUCAUGC	G01232 6	NA	NA	NA
75	chr4:186258133-186258155	AAGUCGCUGA GUACAUGGAC	G01232 7	NA	G012327	NA
76	chr4:186258089-186258111	GGGUGAAGGC UGUGCCC GCA	G01232 8	NA	G013895	335
77	chr4:186258054-186258076	AAUGGAAUGU GGCGUUUGGU	G01232 9	NA	G012329	NA
78	chr4:186258037-186258059	UCCAUUGUGU UUGCAAACUA	G01233 0	NA	G013942	382
79	chr4:186258067-186258089	GUUUGGUGG GCAUCACCAG C	G01233 1	NA	NA	NA
80	chr4:186258043-186258065	UUUGCAAACA CAAUGGAAUG	G01233 2	NA	G013916	356
81	chr4:186258103-186258125	GACACCAGGU UGCUCUCCUGC	G01233 3	NA	NA	NA
82	chr4:186258009-186258031	ACUGUGACUC AGGGAGAUUC	G01233 4	NA	G013943	383
83	chr4:186258099-186258121	UGUGCCC GCA GGGAGCAACC	G01233 5	NA	NA	NA
84	chr4:186258036-186258058	CCAUUGUGUU UGCAAACUAA	G01233 6	NA	G013929	369
85	chr4:186258088-186258110	GGGUGAAGG CUGUGCCCGC	G01233 7	NA	NA	NA
86	chr4:186258117-186258139	GCGACUUUGG UGUAGACACC	G01233 8	NA	NA	NA
87	chr4:186258036-186258058	CCCUUAGUUU GCAAACACAA	G01233 9	NA	NA	NA
88	chr4:186258053-186258075	CAAUGGAAUG UGGCGUUUGG	G01234 0	NA	G012340	NA
89	chr4:186232230-186232252	AACUGAAUAG CAAACACCUU	NA	CR0059 19	NA	NA
90	chr4:186238351-186238373	ACAAUUACCA AUUUCUGAAA	NA	CR0059 20	NA	NA
91	chr4:186238352-186238374	UACAAUUACC AAUUCUGAA	NA	CR0059 21	NA	NA
92	chr4:186251263-186251285	GGUGUUUUUCU UGAGGAGUAG	NA	CR0059 23	NA	NA
93	chr4:186251490-186251512	CGGGUAAUUU UUAGAAUGGC	NA	CR0059 26	G013884	324
94	chr4:186251494-186251516	CUCCCCGGGUA AAUUUUAGAA	NA	CR0059 27	G013925	365
95	chr4:186251801-186251823	UAUGGGACAC AAGGGAGCUC	NA	CR0059 30	NA	NA
96	chr4:186252047-186252069	UUGGAGGAAC AAACUCUUCU	NA	CR0059 34	G013912	352
97	chr4:186252048-186252070	UGGAGGAACA AACUCUUCUU	NA	CR0059 35	NA	NA

SEQ ID NO: (humana)	Coordenadas genómicas de ejemplo (hg38)	secuencia guía humana	sgARN humano	dgARN humano	sgARN de <i>Macaca fascicularis</i>	SEQ ID NO: de guía de <i>Macaca fascicularis</i>
98	chr4:186252056- 186252078	CAAACUCUUC UUGGGGAGAG	NA	CR0059 36	NA	NA
99	chr4:186252123- 186252145	CUAUGAGUGA CCCUCACAC	NA	CR0059 37	G013886	326
100	chr4:186252124- 186252146	CUGUGUGGAG GGUCACUCAU	NA	CR0059 38	G013938	378
101	chr4:186252134- 186252156	GGUCACUCAU AGGACACCAG	NA	CR0059 39	G013946	386
102	chr4:186252135- 186252157	GUCACUCAUA GGACACCAGU	NA	CR0059 40	G013896	336
103	chr4:186252163- 186252185	ACUGCUGCCC ACUGC UUUGA	NA	CR0059 41	NA	NA
104	chr4:186252171- 186252193	ACACUUACCC AUCAAAGCAG	NA	CR0059 42	G013902	342
105	chr4:186238286- 186238308	AGGAACACCU ACCGCUAUA	NA	CR0059 44	G013871	311
106	chr4:186238265- 186238287	CUCCGGGACU GUACUUUAU	NA	CR0059 45	G013889	329
107	chr4:186251786- 186251808	GUCCCAUACG CAAUCCUAGU	NA	CR0059 46	G013890	330
108	chr4:186238293- 186238315	CUCAGCACCU UUUAUAGCGGU	NA	CR0059 47	G013892	332
109	chr4:186238282- 186238304	UAUAGCGGUA GGUGUUCUC	NA	CR0059 48	G013874	314
110	chr4:186238266- 186238288	CUAUUAAGU ACAGUCCGG	NA	CR0059 50	G013875	315
111	chr4:186238308- 186238330	GUGCUGAGUA ACGUGGAAUC	NA	CR0059 53	G013883	323
112	chr4:186238301- 186238323	UAUAAAGGUG CUGAGUAACG	NA	CR0059 54	G013878	318
113	chr4:186251783- 186251805	UCUCCAACUA GGAUUGCGUA	NA	CR0059 55	G013908	348
114	chr4:186238281- 186238303	AUAGCGGUAG GUGUUCUCC	NA	CR0059 57	G013873	313
115	chr4:186233989- 186234011	CUGCCAAAAG UACAUCGAAC	NA	CR0059 58	G013877	317
116	chr4:186238345- 186238367	ACCAUUUUCU GAAAGGGCAC	NA	CR0059 61	NA	NA
117	chr4:186251755- 186251777	GUGUUUCUUA AGAUUAUCUA	NA	CR0059 62	NA	NA
118	chr4:186238344- 186238366	CCA AUUUCUG AAAGGGCACA	NA	CR0059 64	NA	NA
119	chr4:186251759- 186251781	UUCUUAAGAU UAUCUAUGGA	NA	CR0059 65	G013940	380
120	chr4:186233988- 186234010	CUGUUCGAUG UACUUUUGGC	NA	CR0059 66	NA	NA
121	chr4:186233987- 186234009	UGUUCGAUG ACUUUUGGCA	NA	CR0059 67	G013880	320
122	chr4:186232209- 186232231	GGUGGAAUGU GCACCUCAUC	NA	CR0059 68	G013939	379
123	chr4:186250308- 186250330	GUCCGACACA AAAAGCAUC	NA	CR0059 69	G013894	334
124	chr4:186236877- 186236899	AAACUGGCAG CGAAUGUUAC	NA	CR0059 71	G013930	370
125	chr4:186236908- 186236930	UGCCACGCAA ACAUUUCACA	NA	CR0059 72	NA	NA
126	chr4:186233992- 186234014	GCACCUUUC GAUGUACUUU	NA	CR0059 73	G013870	310
127	chr4:186254594- 186254616	AGAUGCGCCA AACAUCCUGC	NA	CR0059 74	NA	NA
128	chr4:186232199- 186232221	GCACCUCAUC UGGCAGAUU	NA	CR0059 75	NA	NA
129	chr4:186250262- 186250284	CAUCUGAGAA CGCAAGAUGC	NA	CR0059 76	G013934	374
130	chr4:186232196- 186232218	AUGCCCAUA CUGCCAGAUG	NA	CR0059 77	NA	NA
131	chr4:186232200-	UGCACCUCAU	NA	CR0059	G013944	384

SEQ ID NO: (humana)	Coordenadas genómicas de ejemplo (hg38)	secuencia guía humana	sgARN humano	dgARN humano	sgARN de <i>Macaca fascicularis</i>	SEQ ID NO: de guía de <i>Macaca fascicularis</i>
	186232222	CUGGCAGUAAU		78		
132	chr4:186232258-186232280	AUGUCAUUGA UUGAACUUGC	NA	CR0059 80	G013936	376
133	chr4:186252031-186252053	ACAAGCACAC GCAUUGUUGG	NA	CR0059 81	G013893	333
134	chr4:186254723-186254745	UAUCGCCUUG AUAAAACUCC	NA	CR0059 84	G013926	366
135	chr4:186251271-186251293	CCUCAAGAAA ACACCAUAUC	NA	CR0059 85	G013906	346
136	chr4:186232149-186232171	AAACGCCUUC UUCAGAGGUG	NA	CR0059 86	NA	NA
137	chr4:186252028-186252050	AAAACAAGCA CACGCAUUGU	NA	CR0059 87	G013891	331
138	chr4:186234001-186234023	CAUCGAACAG GUGCAGUUUC	NA	CR0059 88	G013879	319
139	chr4:186254587-186254609	GGCUUCCCCU GCAGGAUGUU	NA	CR0059 89	G013881	321
140	chr4:186234029-186234051	UUGAUGACCA CAUUGCUUCA	NA	CR0059 90	G013937	377
141	chr4:186254728-186254750	AGGAGCCUGG AGUUUUUAUCA	NA	CR0059 91	NA	NA
142	chr4:186236783-186236805	UGCCAUCGAG ACAUUUUAUAA	NA	CR0059 93	G013899	339
143	chr4:186232260-186232282	AGCAAGUUCA AUCAAUGACA	NA	CR0059 96	G013897	337
144	chr4:186234022-186234044	GGACAUUCCU UGAAGCAUUG	NA	CR0059 97	NA	NA
145	chr4:186250330-186250352	GUUGGGGUGA UAGGUGCAGA	NA	CR0059 99	NA	NA
146	chr4:186232147-186232169	GAAAACGCCU UCUUCAGAGG	NA	CR0060 00	NA	NA
147	chr4:186232144-186232166	UAUGAAAACG CCUUCUUCAG	NA	CR0060 01	NA	NA
148	chr4:186250277-186250299	CUCAGAUGUG GAUGUUGCCA	NA	CR0060 02	NA	NA
149	chr4:186254579-186254601	CUCUCCUAGG CUUCCCCUGC	NA	CR0060 03	NA	NA

Tabla 2. Secuencias guía únicas dirigidas a KLKB1 de *Macaca fascicularis*, coordenadas cromosómicas y homología de la secuencia guía con la humana

sgARN de <i>Macaca fascicularis</i>	SEQ ID NO de <i>Macaca fascicularis</i>	Coordenadas genómicas de ejemplo (mf5)	secuencia guía de <i>Macaca fascicularis</i>	Porcentaje de homología con la guía humana
G013870	310	chr5:185648888-185648908	GCACCUGCUCGACGUACUUU	90
G013871	311	chr5:185652966-185652986	AGGAACGCCUACCACUAUAA	90
G013872	312	chr5:185688465-185688485	UGAUGGAAACGCUCGGAUUC	NA
G013873	313	chr5:185652964-185652984	AUAGUGGUAGGCGUCCUCC	90
G013874	314	chr5:185652965-185652985	UAUAGUGGUAGGCGUCCUUC	90
G013875	315	chr5:185652946-185652966	CUCUUAAGCACAGUCCCGG	90
G013876	316	chr5:185684512-185684532	AAUGCGCCAAACAUCGCGUA	100
G013877	317	chr5:185648882-185648902	UUGCCAAAAGUACGUCGAGC	85
G013878	318	chr5:185652981-185653001	UAUAAAGGUGCUGAAUACG	95
G013879	319	chr5:185648894-185648914	CGUCGAGCAGGUGCAUUUC	85
G013880	320	chr5:185648883-185648903	UGCUCGACGUACUUUUGGCA	90
G013881	321	chr5:185684503-185684523	GGCUUCCCUUACCGGAUGUU	85
G013882	322	chr4:186256046-186256066	CAACUGUUGGGUAACUGGAU	100
G013883	323	chr5:185652988-185653008	GUGCUGAAUACGUGGAAUC	95
G013884	324	chr5:185680852-185680872	CGGGUAAUUUUAGAAUGGC	100
G013885	325	chr5:185684511-185684531	AUGCGCCAAACAUCGCGUAA	100
G013886	326	chr5:185681472-185681492	CUAUGAGUGACCCUCCACAC	100

sgARN de <i>Macaca fascicularis</i>	SEQ ID NO de <i>Macaca fascicularis</i>	Coordenadas genómicas de ejemplo (mf5)	secuencia guía de <i>Macaca fascicularis</i>	Porcentaje de homología con la guía humana
G013887	327	chr5:185679339-185679359	GGCAACAUCCACAUCCGAGA	NA
G013888	328	chr5:185679426-185679446	UUACGUUCUAUACGAAUGCA	85
G013889	329	chr5:185652948-185652968	CUCCGGGACUGUGCUUUAAAG	90
G013890	330	chr5:185681135-185681155	GUCCCAUAUGUAAUCCUAGU	90
G013891	331	chr5:185681374-185681394	AAAACAAGCUCACGCAUUGU	95
G013892	332	chr5:185652976-185652996	UUCAGCACCUUUUAUGUGGU	90
G013893	333	chr5:185681377-185681397	ACAAGCUCACGCAUUGUUGG	95
G013894	334	chr5:185679374-185679394	GUUCGACACACAAAAGCAUC	95
G013895	335	chr4:186258088-186258108	GGGCGAAGGCUGUGCCCGCA	100
G013896	336	chr5:185681481-185681501	GUCACUCAUAGGACACAGU	100
G013897	337	chr5:185647160-185647180	AGCAAGUCCAUCUAUGACA	95
G013898	338	chr5:185679413-185679433	AACGUAAAAGAGAGGCAGCU	100
G013899	339	chr5:185651465-185651485	UGCCACCGAGACAUUUUAA	95
G013900	340	chr4:186256017-186256037	GUGUUUGUGUCACCUUUGGA	100
G013901	341	chr4:186251792-186251812	GGAUUACAUUUGGGACACAA	100
G013902	342	chr5:185681520-185681540	ACACUUACCCAUCAAAGCAG	100
G013903	343	chr5:185684660-185684680	CAGUGUAAUUCAAAGGAGCC	100
G013904	344	chr5:185681138-185681158	AGGAUUACAUUUGGGACACA	100
G013905	345	chr5:185651470-185651490	UUCUUUUUAAAUGUCUCGG	100
G013906	346	chr5:185680632-185680652	CCUCAAGAAAACACCACAUC	95
G013907	347	chr5:185688458-185688478	AGAGCAGUGAUGGAAACGCU	NA
G013908	348	chr5:185681129-185681149	UCUCCAACUAGGAUUACAUA	90
G013909	349	chr5:185680982-185681002	ACUCCCAGAAAGACUGUAAGG	NA
G013910	350	chr5:185679360-185679380	AGCAUCUGGGGCGAGAACUC	100
G013911	351	chr5:185679372-185679392	UCGACACACAAAAGCAUCUG	NA
G013912	352	chr5:185681393-185681413	UUGGAGGAACAAACUCUUCU	100
G013913	353	chr4:186236797-186236817	UAUAAAGGAAUUGAUUGAG	100
G013914	354	chr4:186256047-186256067	AACUGUUGGGUAAACUGGAUG	100
G013915	355	chr5:185647095-185647115	AUCUGGCAGUGCUGGGCGUU	100
G013916	356	chr4:186258042-186258062	CUUGCAAAACAAUUGGAUG	100
G013917	357	chr4:186251628-186251648	UCUCCUCCUUACAGUCUUCU	
G013918	358	chr5:185688296-185688316	CUGUGACUCAGGGAGAUUCA	NA
G013918	358	chr5:185688296-185688316	CUGUGACUCAGGGAGAUUCA	100
G013919	359	chr4:186258084-186258104	GGCACAGCCUUCGCCCCAGC	100
G013920	360	chr5:185647084-185647104	CUGGGCGUUCGGGGUGUACA	100
G013921	361	chr4:186254600-186254620	GAUGUUUGGCGCAUUUUAAG	100
G013922	362	chr4:186251771-186251791	CUUCGGAUGGUUCUCCAACU	
G013923	363	chr5:185684517-185684537	CUAUAAAUGCGCCAAACAUC	NA
G013923	363	chr5:185684517-185684537	CUAUAAAUGCGCCAAACAUC	100
G013924	364	chr4:186256045-186256065	CCAACUGUUGGUUACUGGA	
G013925	365	chr5:185680856-185680876	CUCCCGGGUAAUUUUAAGAA	100
G013926	366	chr5:185684639-185684659	UAUCGCCUUAAUAAAACUCC	95
G013926	366	chr4:186254722-186254742	UAUCGCCUUAAUAAAACUCC	100
G013927	367	chr4:186250264-186250284	GCAUCUUGCCUUCUCGGAUG	
G013928	368	chr5:185679421-185679441	UCGUUAAGAACGUAAAGAAG	90
G013929	369	chr4:186258038-186258058	CCAUUGUGUUUGCAAGCUAA	100
G013930	370	chr5:185651562-185651582	AAAUUGGCAGCGAAUGUUAU	90
G013930	370	chr4:186236879-186236899	AAAUUGGCAGCGAAUGUUAU	100
G013931	371	chr4:186256048-186256068	CCAUCCAGUUACCCAACAGU	100
G013932	372	chr4:186256058-186256078	AACUGGAUGGGGUUCUCGA	100
G013933	373	chr5:185681130-185681150	CUCCAACUAGGAUUAUUAU	100
G013934	374	chr5:185679328-185679348	CAUCCGAGAAGGCAAGAUGC	90
G013935	375	chr4:186251536-186251556	UUGAAUGUGACUUUCGUUAA	100
G013936	376	chr5:185647161-185647181	AUGUCAUUGAUGGAACUUGC	95
G013937	377	chr5:185648925-185648945	UUGAUGACCACACUGCUUUA	90
G013938	378	chr5:185681470-185681490	CUGUGUGGAGGGUACUCAU	100
G013939	379	chr5:185647112-185647132	GGUGGAUUGUGCACAUCUAC	95
G013940	380	chr5:185681105-185681125	UUCUUAAAGAUUAUCUUCGGA	90
G013941	381	chr5:185685921-185685941	CCUUUGGAAGGUAGGCAUUA	100
G013942	382	chr4:186258039-186258059	UCCAUGUGUUUGCAAGCUA	100
G013943	383	chr4:186258008-186258028	CCUGUGACUCAGGGAGAUUC	100
G013944	384	chr5:185647103-185647123	UGCACAUCAUCUGGCAUGGC	85
G013945	385	chr4:186238299-186238319	GUUAUUCAGCACCUUUUAUG	100

en la Tabla 1. El gARN puede comprender un crARN que comprende 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia guía mostrada en la Tabla 1. En algunas formas de realización, el gARN comprende un crARN que comprende una secuencia alrededor de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia guía mostrada en la Tabla 1. En algunas formas de realización, el gARN comprende un crARN que comprende una secuencia alrededor de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia guía mostrada en la Tabla 1. El gARN puede comprender además un trARN. En cada forma de realización de composición y método descrita en la presente, el crARN y el trARN pueden estar asociados como un solo ARN (sgARN) o pueden estar en ARN distintos (dgARN). En el contexto de sgARN, los componentes crARN y trARN pueden estar ligados de manera covalente, por ejemplo, mediante un enlace fosfodiéster u otro enlace covalente.

[00435]En cada una de las formas de realización de composición, uso y método descritas en la presente, el ARN guía puede comprender dos moléculas de ARN como un "ARN guía dual" o "dgARN". El dgARN comprende una primera molécula de ARN que comprende un crARN que comprende, por ejemplo, una secuencia guía mostrada en la Tabla 1, y una segunda molécula de ARN que comprende un trARN. La primera y segunda moléculas de ARN pueden no estar ligadas de manera covalente, pero pueden formar un dúplex de ARN a través del emparejamiento de bases entre las porciones del crARN y el trARN.

[00436]En cada una de las formas de realización de composición, uso y método descritas en la presente, el ARN guía puede comprender una sola molécula de ARN como un "ARN guía simple" o "sgARN". El sgARN puede comprender un crARN (o una porción de este) que comprende una secuencia guía mostrada en la Tabla 1 ligada de manera covalente a un trARN. El sgARN puede comprender 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia guía mostrada en la Tabla 1. En algunas formas de realización, el crARN y el trARN están ligados de manera covalente mediante un ligador. En algunas formas de realización, el sgARN forma una estructura de tallo-bucle mediante el emparejamiento de bases entre porciones del crARN y el trARN. En algunas formas de realización, el crARN y el trARN están ligados de manera covalente mediante uno o más enlaces que no son enlaces fosfodiéster.

[00437]En algunas formas de realización, el trARN puede comprender la totalidad o una porción de una secuencia de trARN derivada de un sistema CRISPR/Cas natural. En algunas formas de realización, el trARN comprende un trARN de tipo silvestre

truncado o modificado. La longitud del trARN depende del sistema CRISPR/Cas usado. En algunas formas de realización, el trARN 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 formas de realización, el trARN puede comprender ciertas estructuras secundarias, tales como, por ejemplo, una o más estructuras de horquilla o tallo-bucle, o una o más estructuras sobresalientes.

[00438]En algunas formas de realización, se proporciona una composición que comprende uno o más ARN guía que comprenden una secuencia guía de cualquiera de SEQ ID NO: 1-149. En algunas formas de realización, se proporciona una composición que comprende uno o más ARN guía que comprenden una secuencia guía de cualquiera de SEQ ID NO: 1-149 y cualquier porción conservada de un sgARN mostrado en la Tabla 4, que opcionalmente tiene un patrón de modificación de cualquiera de los sgARN mostrados en la Tabla 4, opcionalmente en donde el sgARN comprende una modificación del extremo 5' y 3' (si no se muestra ya en la construcción de la Tabla 4). En algunas formas de realización, se proporciona una composición que comprende uno o más ARN guía que comprenden una secuencia guía de cualquiera de SEQ ID NO: 1-149, en donde los nucleótidos de SEQ ID NO: 170, 171, 172 o 173 siguen la secuencia guía en su extremo 3'. En algunas formas de realización, el uno o más ARN guía que comprenden una secuencia guía de cualquiera de SEQ ID NO: 1-149, en donde los nucleótidos de SEQ ID NO: 170, 171, 172 o 173 que siguen la secuencia guía en su extremo 3', se modifican de acuerdo con el patrón de modificación de SEQ ID NO: 300.

[00439]En algunas formas de realización, se proporciona una composición que comprende uno o más ARN guía que comprenden una secuencia guía de cualquiera de SEQ ID NO: 1-149. En un aspecto, se proporciona una composición que comprende uno o más gARN, que comprende una secuencia guía que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1-149.

[00440]En otras formas de realización, se proporciona una composición que comprende al menos un, por ejemplo, al menos dos, gARN que comprenden secuencias guía seleccionadas de dos o más cualesquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149. En algunas formas de realización, la composición comprende al menos dos gARN, en donde cada uno comprende una secuencia guía al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1-149.

[00441]Las composiciones de ARN guía de la presente invención están diseñadas para reconocer (por ejemplo, hibridarse con) una secuencia diana en el gen *KLKB1*. Por ejemplo, la secuencia diana de *KLKB1* puede ser reconocida y escindida por una escindasa Cas proporcionada que comprende un ARN guía. En algunas formas de realización, un ARN guía puede dirigir un agente de fijación a ADN guiado por ARN, tal como una escindasa Cas, a una secuencia diana del gen *KLKB1*, donde la secuencia guía del ARN guía se hibrida con la secuencia diana y el agente de fijación a ADN guiado por ARN, tal como una escindasa Cas, escinde la secuencia diana.

[00442]En algunas formas de realización, la selección del uno o más ARN guía se determina en función de las secuencias diana dentro del gen *KLKB1*. En algunas formas de realización, las composiciones que comprenden una o más secuencias guía comprenden una secuencia guía que es complementaria a la región genómica correspondiente que se muestra en la Tabla 1 a continuación, según las coordenadas del genoma humano de referencia hg38. Las secuencias guía de otras formas de realización pueden ser complementarias a las secuencias en las cercanías de la coordenada genómica listada en cualquiera de las Tablas proporcionadas en la presente. Por ejemplo, las secuencias guía de otras formas de realización pueden ser complementarias a las secuencias que comprenden 15 nucleótidos consecutivos ± 10 nucleótidos de una coordenada genómica listada en cualquiera de las Tablas divulgadas en la presente.

[00443]Sin limitarse a ninguna teoría en particular, las mutaciones (por ejemplo, mutaciones de desplazamiento de marco que resultan de indeles que se producen como resultado de una DSB mediada por nucleasa) en ciertas regiones del gen pueden ser menos tolerables que las mutaciones en otras regiones del gen, por lo que la ubicación de una DSB es un factor importante en la cantidad o tipo de inactivación de proteína que puede producirse. En algunas formas de realización, se usa un gARN complementario o que tiene complementariedad con una secuencia diana dentro de *KLKB1* para dirigir el agente de fijación a ADN guiado por ARN a una ubicación particular en el gen *KLKB1*. En algunas formas de realización, los gARN están diseñados para tener secuencias guía que son complementarias o tienen complementariedad con secuencias diana en el exón 1, exón 3, exón 4, exón 5, exón 6, exón 8, exón 9, exón 10, exón 11, exón 12, exón 13, exón 14 o exón 15 de *KLKB1*.

[00444]En algunas formas de realización, la secuencia guía es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % idéntica a una secuencia diana presente en el gen *KLKB1* humano. En algunas formas de realización, la secuencia

diana puede ser complementaria a la secuencia guía del ARN guía. En algunas formas de realización, el grado de complementariedad o identidad entre una secuencia guía de un ARN guía y su secuencia diana correspondiente puede ser de al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas formas de realización, la secuencia diana y la secuencia guía del gARN pueden ser 100 % complementarias o idénticas. En otras formas de realización, la secuencia diana y la secuencia guía del gARN pueden contener al menos un error de apareamiento. Por ejemplo, la secuencia diana y la secuencia guía del gARN pueden contener 1, 2, 3 o 4 errores de apareamiento, cuando la longitud total de la secuencia guía es 20. En algunas formas de realización, la secuencia diana y la secuencia guía del gARN pueden contener 1-4 errores de apareamiento cuando la secuencia guía es de 20 nucleótidos.

[00445]En algunas formas de realización, una composición o formulación divulgada en la presente comprende un mARN que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas descrita en la presente. En algunas formas de realización, se proporciona, usa o administra un mARN que comprende un ORF que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas.

B. gARN y mARN modificados

[00446]En algunas formas de realización, el gARN está modificado químicamente. Un gARN que comprende uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados se denomina gARN "modificado" o gARN "modificado químicamente" para describir la presencia de uno o más componentes o configuraciones no naturales y/o naturales que se usan en lugar o además de los residuos A, G, C y U canónicos. En algunas formas de realización, un gARN modificado sintetizado con un nucleósido o nucleótido no canónico se denomina "modificado" en la presente. 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 no ligadores y/o de uno o más de los oxígenos de fosfato ligadores en el enlace de cadena principal de fosfodiéster (una modificación de cadena principal de ejemplo); (ii) alteración, por ejemplo, reemplazo, de un constituyente del azúcar ribosa, por ejemplo, del hidroxilo 2' en el azúcar ribosa (una modificación de azúcar de ejemplo); (iii) reemplazo total de la porción fosfato con ligadores "desfosfo" (una modificación de cadena principal de ejemplo); (iv) modificación o reemplazo de una nucleobase natural, incluso con una nucleobase no canónica (una modificación de base de ejemplo); (v) reemplazo o modificación de la

cadena principal de ribosa-fosfato (una modificación de cadena principal de ejemplo); (vi) modificación del extremo 3' o 5' del oligonucleótido, por ejemplo, eliminación, modificación o reemplazo de un grupo fosfato terminal o conjugación de una porción, terminación (*cap*) o enlace (tales modificaciones de terminación 3' o 5' pueden comprender una modificación de azúcar y/o cadena principal); y (vii) modificación o reemplazo del azúcar (una modificación de azúcar de ejemplo).

[00447]Las modificaciones químicas tales como las enumeradas anteriormente pueden combinarse para proporcionar gARN y/o mARN 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 formas de realización, cada base de un gARN está modificada, por ejemplo, todas las bases tienen un grupo fosfato modificado, tal como un grupo fosforotioato. En ciertas formas de realización, todos o sustancialmente todos los grupos fosfato de una molécula de gARN están reemplazados con grupos fosforotioato. En algunas formas de realización, los gARN modificados comprenden al menos un residuo modificado en, o cerca de, el extremo 5' del ARN. En algunas formas de realización, los gARN modificados comprenden al menos un residuo modificado en, o cerca de, el extremo 3' del ARN.

[00448]En algunas formas de realización, el gARN comprende uno, dos, tres o más residuos modificados. En algunas formas de realización, 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 gARN modificado son nucleósidos o nucleótidos modificados.

[00449]Los ácidos nucleicos no modificados pueden ser propensos a la degradación por, por ejemplo, nucleasas intracelulares o las encontradas en suero. Por ejemplo, las nucleasas pueden hidrolizar enlaces fosfodiéster de ácido nucleico. En consecuencia, en un aspecto, los gARN descritos en la presente pueden contener uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados, por ejemplo, para introducir estabilidad hacia las nucleasas intracelulares o a base de suero. En algunas formas de realización, las moléculas de gARN modificado descritas en la presente pueden exhibir una respuesta inmunitaria innata reducida cuando se introducen en una población de células, tanto *in vivo* como *ex vivo*. La expresión "respuesta inmunitaria innata" incluye una respuesta

celular a ácidos nucleicos exógenos, incluso ácidos nucleicos monocatenarios, que implica la inducción de expresión y liberación de citocinas, particularmente los interferones, y la muerte celular.

[00450]En algunas formas de realización de una modificación de cadena principal, el grupo fosfato de un residuo modificado puede modificarse al reemplazar 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 una porción fosfato no modificada con un grupo fosfato modificado como se describe en la presente. En algunas formas de realización, la modificación de cadena principal de la cadena principal de fosfato puede incluir alteraciones que dan como resultado ya sea un ligador sin carga o un ligador cargado con una distribución de carga asimétrica.

[00451]Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen fosfortioato, fosforoselenatos, fosfatos de borano, ésteres de fosfato de borano, fosfonatos de hidrógeno, fosfoamidatos, 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 no puente con uno de los átomos o grupos de átomos anteriores puede volver quiral el átomo de fósforo. El átomo de fósforo estereogénico puede poseer la configuración "R" (en la presente, Rp) o la configuración "S" (en la presente, Sp). La cadena principal también se puede modificar mediante el reemplazo de un oxígeno puente (es decir, el oxígeno que une el fosfato al nucleósido), con nitrógeno (fosforoamidatos puenteados), azufre (fosfortioatos puenteados) y carbono (metilfosfonatos puenteados). El reemplazo puede ocurrir en el oxígeno de enlace o en los dos oxígenos de enlace.

[00452]El grupo fosfato puede ser reemplazado por conectores que no contienen fósforo en ciertas modificaciones de cadena principal. En algunas formas de realización, el grupo fosfato cargado puede reemplazarse por una porción neutra. Los ejemplos de porciones que pueden reemplazar el grupo fosfato pueden incluir, entre otros, por ejemplo, metilfosfonato, hidroxilamino, siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, ligador de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilenmetilimino, metilenhidrazo, metilendimetilhidrazo y metilenoximetilimino.

[00453]También se pueden construir soportes que pueden imitar a ácidos nucleicos, en donde el ligador de fosfato y el azúcar ribosa se reemplazan con sustitutos de

nucleósido o nucleótido resistentes a nucleasa. Tales modificaciones pueden comprender modificaciones de cadena principal y de azúcar. En algunas formas de realización, las nucleobases pueden ser ancladas por una cadena principal sustituta. Los ejemplos pueden incluir, entre otros, los sustitutos de nucleósido de ácido nucleico peptídico (PNA), morfolino, ciclobutilo y pirrolidina.

[00454] Los nucleósidos modificados y los nucleótidos modificados pueden incluir una o más modificaciones al grupo de azúcar, es decir, una modificación de azúcar. Por ejemplo, el grupo hidroxilo 2' (OH) puede modificarse, por ejemplo, reemplazarse con varios sustituyentes "oxi" o "desoxi" diferentes. En algunas formas de realización, las modificaciones al grupo hidroxilo 2' pueden mejorar la estabilidad del ácido nucleico ya que el hidroxilo ya no se puede desprotonar para formar un ion 2'-alcóxido.

[00455] Los ejemplos de modificaciones del grupo hidroxilo 2' pueden incluir alcoxi o ariloxi (OR, en donde "R" puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o un azúcar); polietilenglicoles (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$, 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 formas de realización, la modificación del grupo hidroxilo 2' puede ser 2'-O-Me. En algunas formas de realización, la modificación del grupo hidroxilo 2' puede ser una modificación 2'-fluoro, que reemplaza el grupo hidroxilo 2' con un fluoruro. En algunas formas de realización, la modificación del grupo hidroxilo 2' puede incluir ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) en los que el hidroxilo 2' puede estar conectado, por ejemplo, mediante un puente C_{1-6} alquilenos o C_{1-6} heteroalquilenos, al carbono 4' del mismo azúcar ribosa, en donde los puentes de ejemplo pueden incluir puentes de metileno, propileno, éter o amino; O-amino (en donde 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 amino puede ser, por ejemplo, NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina o poliamino). En algunas formas de realización, la modificación del grupo hidroxilo 2' puede incluir ácidos nucleicos "desbloqueados" (UNA) en los que el anillo de ribosa carece del enlace C2'-C3'. En algunas formas de realización, la modificación del grupo hidroxilo 2' puede incluir el grupo metoxietilo (MOE), $(OCH_2CH_2OCH_3)$, por ejemplo, un derivado de PEG).

[00456]Las modificaciones "desoxi" 2' pueden incluir hidrógeno (es decir, azúcares desoxirribosas, por ejemplo, en las porciones sobresalientes de dsARN en parte); halo (por ejemplo, bromo, cloro, flúor o yodo); amino (en donde amino puede ser, por ejemplo, NH_2 , alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ amino (en donde amino puede ser, por ejemplo, como se describe en la presente), $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ (en donde R puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquilo; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alquenilo y alquinilo, que pueden estar opcionalmente sustituidos con, por ejemplo, un amino como se describe en la presente.

[00457]La modificación de 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 ribosa. Por lo tanto, un ácido nucleico modificado puede incluir nucleótidos que contienen, por ejemplo, arabinosa, como el azúcar. Los ácidos nucleicos modificados también pueden incluir azúcares abásicos. Estos azúcares abásicos también se pueden modificar 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 de L, por ejemplo, L-nucleósidos.

[00458]Los nucleósidos modificados y nucleótidos modificados descritos en la presente, que pueden incorporarse en un ácido nucleico modificado, pueden incluir una base modificada, también denominada nucleobase. Los ejemplos de nucleobases incluyen, entre otros, adenina (A), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U). Estas nucleobases pueden modificarse o reemplazarse completamente para proporcionar residuos modificados que pueden incorporarse en ácidos nucleicos modificados. La nucleobase del nucleótido se puede seleccionar independientemente de una purina, una pirimidina, un análogo de purina o un análogo de pirimidina. En algunas formas de realización, la nucleobase puede incluir, por ejemplo, derivados naturales y sintéticos de una base.

[00459]En formas de realización que emplean un ARN guía dual, cada uno del crARN y el tracrARN puede contener modificaciones. Dichas modificaciones pueden estar en uno o ambos extremos del crARN y/o tracrARN. En formas de realización que comprenden un sgARN, uno o más residuos en uno o ambos extremos del sgARN pueden estar modificados químicamente, y/o los nucleósidos internos pueden estar modificados, y/o todo el sgARN puede estar modificado químicamente. Ciertas formas

de realización comprenden una modificación en el extremo 5'. Ciertas formas de realización comprenden una modificación en el extremo 3'.

[00460]En algunas formas de realización, los ARN guía divulgados en la presente comprenden una de los patrones de modificación divulgados en WO2018/107028 y/o WO2019/237069, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. Por ejemplo, los ARN guía divulgados en la presente pueden comprender la estructura de guía corta descrita en las reivindicaciones 1-15 y/o los patrones de modificación descritos en las reivindicaciones 16-462 de WO2019/237069. En algunas formas de realización, los ARN guía divulgados en la presente comprenden una de las estructuras/patrones de modificación divulgados en WO 2015/200555, cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. En algunas formas de realización, los ARN guía divulgados en la presente comprenden una de las estructuras/patrones de modificación divulgados en WO2017/136794, cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

C. Modificaciones YA

[00461]Una modificación en un sitio YA (también denominada en la presente "modificación YA") puede ser una modificación del enlace internucleósido, una modificación de la base (pirimidina o adenina), por ejemplo, mediante sustitución o modificación química, o de otra manera, y/o una modificación del azúcar (por ejemplo, en la posición 2', tal como 2'-O-alquilo, 2'-F, 2'-moe, 2'-F arabinosa, 2'-H (desoxirribosa), y similares). En algunas formas de realización, una "modificación YA" es cualquier modificación que altera la estructura del motivo de dinucleótido para reducir la actividad de endonucleasa de ARN, por ejemplo, al interferir con el reconocimiento o la escisión de un sitio YA por parte de una RNasa y/o al estabilizar una estructura de ARN (por ejemplo, una estructura secundaria) que disminuye la accesibilidad de un sitio de escisión a una RNasa. Ver Peacock *et al.*, *J Org Chem.* 76: 7295–7300 (2011); Behlke, *Oligonucleotides* 18:305-320 (2008); Ku *et al.*, *Adv. Drug Delivery Reviews* 104: 16-28 (2016); Ghidini *et al.*, *Chem. Commun.*, 2013, 49, 9036. Peacock *et al.*, Behlke, Ku y Ghidini proporcionan modificaciones de ejemplo adecuadas como modificaciones YA. Están abarcadas las modificaciones conocidas por las personas del oficio de nivel medio para reducir la degradación endonucleolítica. Las modificaciones de ribosa 2' de ejemplo que afectan el grupo hidroxilo 2' implicado en la escisión de RNasa son 2'-H y 2'-O-alquilo, incluso 2'-O-Me. Las modificaciones tales como análogos de ribosa bicíclicos, UNA y enlaces internucleósidos modificados de los residuos en el sitio YA pueden ser modificaciones YA. Las modificaciones de

base de ejemplo que pueden estabilizar las estructuras de ARN son pseudouridina y 5-metilcitosina. En algunas formas de realización, al menos un nucleótido del sitio YA está modificado. En algunas formas de realización, la pirimidina (también denominada "posición de pirimidina") del sitio YA comprende una modificación (que incluye una modificación que altera el enlace internucleósido inmediatamente en la dirección 3' del azúcar de la pirimidina, una modificación de la base de pirimidina y una modificación de la ribosa, por ejemplo, en su posición 2'). En algunas formas de realización, la adenina (también denominada "posición de adenina") del sitio YA comprende una modificación (que incluye una modificación que altera el enlace internucleósido inmediatamente en la dirección 3' del azúcar de la pirimidina, una modificación de la base de pirimidina y una modificación de la ribosa, por ejemplo, en su posición 2'). En algunas formas de realización, la pirimidina y la adenina del sitio YA comprenden modificaciones. En algunas formas de realización, la modificación YA reduce la actividad de endonucleasa de ARN.

[00462]En algunas formas de realización, un sgARN comprende modificaciones en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o más sitios YA. En algunas formas de realización, la pirimidina del sitio YA comprende una modificación (que incluye una modificación que altera el enlace internucleósido inmediatamente en la dirección 3' del azúcar de la pirimidina). En algunas formas de realización, la adenina del sitio YA comprende una modificación (que incluye una modificación que altera el enlace internucleósido que se ubica inmediatamente en la dirección 3' del azúcar de la adenina). En algunas formas de realización, la pirimidina y la adenina del sitio YA comprenden modificaciones, tales como modificaciones de azúcar, base o enlace internucleósido. Las modificaciones YA pueden ser de cualquiera de los tipos de modificaciones establecidos en la presente. En algunas formas de realización, las modificaciones YA comprenden uno o más de fosforotioato, 2'-OMe o 2'-fluoro. En algunas formas de realización, las modificaciones YA comprenden modificaciones de pirimidina que comprenden uno o más de fosforotioato, 2'-OMe o 2'-fluoro. En algunas formas de realización, la modificación YA comprende un análogo bicíclico de ribosa (por ejemplo, un LNA, BNA o ENA) dentro de una región de dúplex de ARN que contiene uno o más sitios YA. En algunas formas de realización, la modificación YA comprende un análogo bicíclico de ribosa (por ejemplo, un LNA, BNA o ENA) dentro de una región de dúplex de ARN que contiene un sitio YA, en donde la modificación YA es distal al sitio YA.

[00463]En algunas formas de realización, el sgARN comprende una modificación del

sitio YA de región guía. En algunas formas de realización, la región guía comprende 1, 2, 3, 4, 5 o más sitios YA ("sitios YA de región guía") que pueden comprender modificaciones YA. En algunas formas de realización, uno o más sitios YA ubicados en el 5-extremo, 6-extremo, 7-extremo, 8-extremo, 9-extremo o 10-extremo desde el extremo 5' del terminal 5' (donde "5-extremo", etc., se refiere a la posición 5 con respecto al extremo 3' de la región guía, es decir, el nucleótido más 3' en la región guía) comprenden modificaciones YA. En algunas formas de realización, dos o más sitios YA ubicados en el 5-extremo, 6-extremo, 7-extremo, 8-extremo, 9-extremo o 10-extremo desde el extremo 5' del terminal 5' comprenden modificaciones YA. En algunas formas de realización, tres o más sitios YA ubicados en el 5-extremo, 6-extremo, 7-extremo, 8-extremo, 9-extremo o 10-extremo desde el extremo 5' del terminal 5' comprenden modificaciones YA. En algunas formas de realización, cuatro o más sitios YA ubicados en el 5-extremo, 6-extremo, 7-extremo, 8-extremo, 9-extremo o 10-extremo desde el extremo 5' del terminal 5' comprenden modificaciones YA. En algunas formas de realización, cinco o más sitios YA ubicados en el 5-extremo, 6-extremo, 7-extremo, 8-extremo, 9-extremo o 10-extremo desde el extremo 5' del terminal 5' comprenden modificaciones YA. Un sitio YA de región guía modificada comprende una modificación YA.

[00464]En algunas formas de realización, un sitio YA de región guía modificada está a 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 o 9 nucleótidos de distancia o menos del nucleótido del terminal 3' de la región guía. Por ejemplo, si un sitio YA de región guía modificada está a 10 nucleótidos de distancia o menos del nucleótido de terminal 3' de la región guía y la región guía tiene una longitud de 20 nucleótidos, el nucleótido modificado del sitio YA de región guía modificada está ubicado en cualquiera de las posiciones 11-20. En algunas formas de realización, una modificación YA está ubicada dentro de un sitio YA a 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido de distancia del nucleótido del terminal 3' de la región guía. En algunas formas de realización, una modificación YA está ubicada a 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido de distancia del nucleótido del terminal 3' de la región guía.

[00465]En algunas formas de realización, un sitio YA de región guía modificada está en o después del nucleótido 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 desde el extremo 5' del terminal 5'.

[00466]En algunas formas de realización, un sitio YA de región guía modificado es distinto de una modificación en el extremo 5'. Por ejemplo, un sgARN puede comprender una modificación en el extremo 5' descrita en la presente y comprender

además un sitio YA de región guía modificado. De manera alternativa, un sgARN puede comprender un extremo 5' no modificado y un sitio YA de región guía modificado. De manera alternativa, un sgARN puede comprender un extremo 5' modificado y un sitio YA de región guía no modificado.

[00467]En algunas formas de realización, un sitio YA de región guía modificado comprende una modificación que al menos un nucleótido ubicado en la dirección 5' del sitio YA de región guía no comprende. Por ejemplo, si los nucleótidos 1-3 comprenden fosforotioatos, el nucleótido 4 comprende solo una modificación de 2'-OMe y el nucleótido 5 es la pirimidina de un sitio YA y comprende un fosforotioato, el sitio YA de región guía modificada comprende una modificación (fosforotioato) que al menos un nucleótido ubicado en la dirección 5' del sitio YA de región guía (nucleótido 4) no comprende. En otro ejemplo, si los nucleótidos 1-3 comprenden fosforotioatos y el nucleótido 4 es la pirimidina de un sitio YA y comprende un 2'-OMe, el sitio YA de región guía modificada comprende una modificación (2'-OMe) que al menos un nucleótido ubicado en la dirección 5' del sitio YA de región guía (cualquiera de los nucleótidos 1-3) no comprende. Esta condición también se cumple siempre si un nucleótido no modificado está ubicado en la dirección 5' del sitio YA de región guía modificada.

[00468]En algunas formas de realización, los sitios YA de región guía modificados comprenden modificaciones como las descritas para otros sitios YA anteriormente.

[00469]Se establecen formas de realización adicionales de modificaciones de sitio YA de región guía en la síntesis anterior. Cualquier forma de realización establecida en otra parte de la presente divulgación puede combinarse en un grado viable con cualquiera de las formas de realización anteriores.

[00470]En algunas formas de realización, el sgARN comprende una modificación del sitio YA de región conservada. Los sitios YA de región conservada 1-10 se ilustran en la Figura 14. En algunas formas de realización, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sitios YA de región conservada comprenden modificaciones.

[00471]En algunas formas de realización, los sitios YA de región conservada 1, 8 o 1 y 8 comprenden modificaciones YA. En algunas formas de realización, los sitios YA de región conservada 1, 2, 3, 4 y 10 comprenden modificaciones YA. En algunas formas de realización, los sitios YA 2, 3, 4, 8 y 10 comprenden modificaciones YA. En algunas formas de realización, los sitios YA de región conservada 1, 2, 3 y 10 comprenden modificaciones YA. En algunas formas de realización, los sitios YA 2, 3, 8 y 10 comprenden modificaciones YA. En algunas formas de realización, los sitios YA 1, 2,

3, 4, 8 y 10 comprenden modificaciones YA. En algunas formas de realización, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sitios YA de región conservada adicionales comprenden modificaciones YA.

[00472]En algunas formas de realización, 1, 2, 3 o 4 de los sitios YA de región conservada 2, 3, 4 y 10 comprenden modificaciones YA. En algunas formas de realización, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sitios YA de región conservada adicionales comprenden modificaciones YA.

[00473]En algunas formas de realización, los sitios YA de región conservada modificados comprenden modificaciones como las descritas para los sitios YA anteriores.

[00474]En la breve descripción anterior se establecen formas de realización adicionales de modificaciones de sitio YA de región conservada. Cualquier forma de realización establecida en otra parte de la presente divulgación puede combinarse en un grado viable con cualquiera de las formas de realización anteriores.

[00475]En algunas formas de realización, se proporciona un sgARN que comprende la secuencias guía de cualquiera de SEQ ID NO: 1-149 y cualquier porción conservada de un sgARN mostrado en la Tabla 4, que opcionalmente tiene un patrón de modificación de cualquiera de los sgARN mostrados en la Tabla 4, opcionalmente en donde el sgARN comprende una modificación del extremo 5' y 3' (si no se muestra ya en la construcción de la Tabla 4).

[00476]En algunas formas de realización, el sgARN comprende cualquiera de los patrones de modificación mostrados más adelante en la Tabla 4, donde N es cualquier nucleótido natural o no natural, y en donde la totalidad de las N comprenden una secuencia guía de *KLKB1* como se describe en la presente en la Tabla 1. La Tabla 4 no muestra la porción de secuencia guía del sgARN. Las modificaciones siguen siendo como se muestran en la Tabla 4 a pesar de la sustitución de las N por los nucleótidos de una guía. Es decir, si bien los nucleótidos de la guía reemplazan las "N", los nucleótidos están modificados como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Patrones de modificación de sgARN y porciones conservadas de un sgARN. La secuencia guía no se muestra y se adjuntará a la secuencia mostrada en su extremo 5'.

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
171	Porción conservada de ejemplo	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
172	Porción conservada de ejemplo	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGC

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
173	Porción conservada de ejemplo	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC
170	Porción conservada de ejemplo	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
168	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
169	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
400	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAGUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
401	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
402	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAmGmAmAmAUAGCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
403	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAGAAmUmAmGmCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
404	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
405	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
406	De ejemplo – solo modificación	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
407	De ejemplo – solo modificación	fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
408	De ejemplo – solo modificación	mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
409	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmUmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
410	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
411	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
412	De ejemplo – solo modificación	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmUmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
413	De ejemplo – solo modificación	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
414	De ejemplo – solo modificación	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
415	De ejemplo – solo modificación	fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmUmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
416	De ejemplo – solo modificación	fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
417	De ejemplo – solo modificación	fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
418	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
419	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
420	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
421	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
422	De ejemplo – solo modificación	fGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUmAfAfAm AmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
423	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmUmUmUmU
424	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
425	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGfUfCf GfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
426	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfG mCfU*mU*fU*mU
427	De ejemplo – solo modificación	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
428	De ejemplo – solo modificación	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
429	De ejemplo – solo modificación	mGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
430	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
431	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
432	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
433	De ejemplo – solo modificación	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
434	De ejemplo – solo modificación	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
435	De ejemplo – solo modificación	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
436	De ejemplo – solo modificación	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
437	De ejemplo – solo modificación	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
438	De ejemplo – solo modificación	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
439	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
440	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
441	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
442	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
443	De ejemplo – solo modificación	fGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUmAfAfAm AmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
444	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmUmUmUmU
445	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
446	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGfUfCf GfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
447	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfG mCfU*mU*fU*mU
448	De ejemplo – solo modificación de la región guía	mN*mN*mN*mNNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNNfNfNNN
449	De ejemplo – solo modificación de la región guía	mN*mN*mN*mNNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNN*fNfNNN
450	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
174	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUAAGCA CCGAGUCGG*mU*mG*mC
175	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUCAGCA CCGAGUCGG*mU*mG*mC
176	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCCACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
177	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUACGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
178	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAGAGCUG GCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
179	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAGAAUGG CACCGAGUCGG*mU*mG*mC
180	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGG GCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
181	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
182	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAGUGG CACCGAGUCGG*mU*mG*mC
183	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACAGUGG CACCGAGUCGG*mU*mG*mC
184	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACAAGGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
185	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCA CCGAGUCGG*mU*mG*mC
186	De ejemplo – solo	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAGGCACC GAGUCGG*mU*mG*mC

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
	modificación	
187	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAGGGCAC CGAGUCGG*mU*mG*mC
188	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAGGCACCG AGUCGG*mU*mG*mC
189	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCA CCGAGUCGG*mU*mG*mC
190	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGCAAAGCGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCA CCGAGUCGG*mU*mG*mC
191	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCA CCGAGUCGG*mU*mG*mC
192	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGGAAACGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCAC CGAGUCGGU*mG*mC*mU
193	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGGAAACGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCAC CGAGUCGG*mU*mG*mC
194	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCCGAAAGGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCAC CGAGUCGG*mU*mG*mC
195	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUGAAAAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCAC CGAGUCGG*mU*mG*mC
196	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCG AGUCGG*mU*mG*mC
197	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGAAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGA GUCGG*mU*mG*mC
198	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCAAAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGA GUCGG*mU*mG*mC
199	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGGAAACAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAG UCGG*mU*mG*mC
202	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCAAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAG UCGG*mU*mG*mC
203	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAG UCGG*mU*mG*mC
204	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUC GG*mU*mG*mC
205	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGAACAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUC GG*mU*mG*mC
206	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGACAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCG G*mU*mG*mC
207	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG *mU*mG*mC
208	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAAAAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG* mU*mG*mC
209	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAAAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG* mU*mG*mC
210	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCG*mG*mU*mG
211	De ejemplo – solo	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUC*mG*mG*mU

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
	modificación	
212	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGU*mC*mG*mG
213	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAG*mU*mC*mG
214	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGA*mG*mU*mC
215	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCG*mA*mG*mU
216	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACUGGCACCGAG UCGG*mU*mG*mC
217	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAGGCACCGAGUC GG*mU*mG*mC
218	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGAAAAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUC GG*mU*mG*mC
219	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGGAAACAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAUUGGCACCGAGUC GG*mU*mG*mC
220	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGAAAAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAUUGGCACCGAGUCGG* mU*mG*mC
221	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGGAAACAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACUGGCACCGAGUC GG*mU*mG*mC
222	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGAAAAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAGGCACCGAGUCGG*m U*mG*mC
223	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAGCUAUGGCAC CGAGUCGG*mU*mG*mC
224	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCAGUCCGUUAUCAACUUGGCA CCGAGUCGG*mU*mG*mC
225	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUGUCCGUUAUCAACUUGGCA CCGAGUCGG*mU*mG*mC
226	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCGUCCGUUAUCAACUUGGCAC CGAGUCGG*mU*mG*mC
227	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGUUCCGUUAUCAACUUGGCACC GAGUCGG*mU*mG*mC
228	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGUUCCGUUAUCAACUUGGCACC GAGUCGG*mU*mG*mC
229	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGAUCCGUUAUCAACUUGGCACC GAGUCGG*mU*mG*mC
230	De ejemplo – solo modificación	GUUUUCGAGCUAGAAUAGCAAGUGAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
231	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
232	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
233	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCGAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
234	De ejemplo – solo	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCCGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
	modificación	
235	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
236	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
237	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
238	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
239	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUGUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
240	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUCUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
241	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUUUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
242	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUGAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
243	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGG ACCGAGUCGG*mU*mC*mC
244	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGAA CCGAGUCGG*mU*mU*mC
245	De ejemplo – solo modificación	GUUUUCGAGCGAGAAUUCGCGAGUGAAAAUAGAGGCUUGUCCGUUGUGAACUUGG AACCGAGUCGG*mU*mU*mC
246	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGAGAAUUCGCAAGUAAAAUAGAGGCUUGUCCGUUCUGAACUUGGA ACCGAGUCGG*mU*mU*mC
247	De ejemplo – solo modificación	GUUUCGGAGCCGAAACGGCGAGUCGAAUAGAGGCUUGUCCGUUGUCGGCUCGG AACCGAGUCGG*mU*mU*mC
248	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
249	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
250	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
251	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
252	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
253	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
254	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
255	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
256	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCC GUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
257	De ejemplo – solo	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUAAAAUAGAGGCUAGUCC GUUAUCAAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
	modificación	
258	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCACAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
259	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
260	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCA CCGAGUCGG*mU*mG*mC
261	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCUGAAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACC GAGUCGG*mU*mG*mC
262	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCG AGUCGG*mU*mG*mC
263	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAGCAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGA GUCGG*mU*mG*mC
264	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmGmAmAmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC UUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
265	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmGmAmAmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAG AAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
266	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmCmGmAmAmAmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
267	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmAmAmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
268	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCACmGmAmAmAmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
269	De ejemplo – solo modificación	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAAmAmAmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC

[00477]En algunas formas de realización, el sgARN modificado comprende la siguiente secuencia:

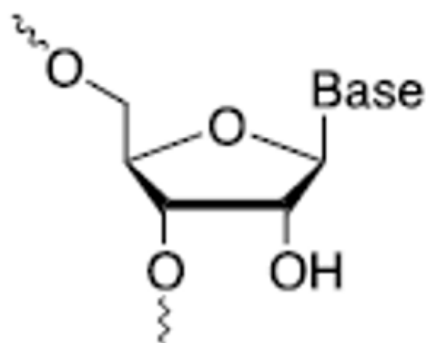
mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

(SEQ ID NO: 300), donde "N" puede ser cualquier nucleótido natural o no natural, y en donde la totalidad de N comprende una secuencia guía de *KLKB1* como se describe en la Tabla 1. Por ejemplo, en la presente está abarcada SEQ ID NO: 300, donde las N se reemplazan con cualquiera de las secuencias guía divulgadas en la presente en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1-149). Además, en la presente está abarcados ARN guías que combinan cualquiera de las secuencias guía de la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1-149) combinadas con una porción conservada de un sgARN, por ejemplo, una secuencia de la Tabla 4.

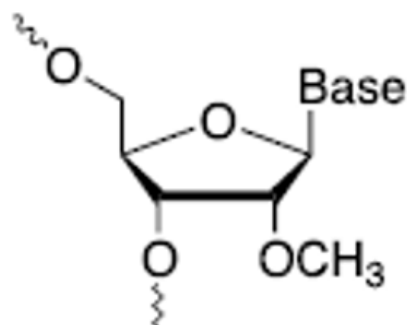
[00478]Cualquiera de las modificaciones descritas a continuación puede estar presente en los gARN y mARN descritos en la presente.

[00479]Se pueden usar los términos "mA", "mC", mU" o "mG" para indicar un nucleótido que se ha modificado con 2'-O-Me.

[00480]La modificación de 2'-O-metilo puede ilustrarse de la siguiente manera:



ARN

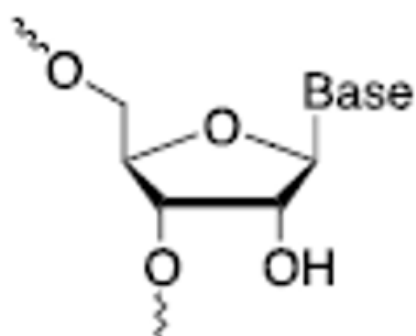


2'-O-Me

[00481]Otra modificación química que influye, según lo demostrado, sobre los anillos de azúcar de nucleótido es la sustitución de halógeno. Por ejemplo, la sustitución de 2'-fluoro (2'-F) en los anillos de azúcar de nucleótido puede aumentar la afinidad de fijación a oligonucleótido y la estabilidad de nucleasa.

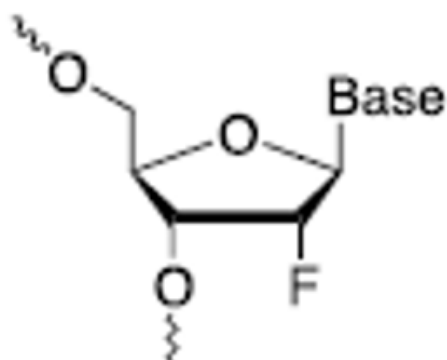
[00482]En esta solicitud, se pueden usar los términos "fA", "fC", "fU" o "fG" para indicar un nucleótido que se ha sustituido con 2'-F.

[00483]La sustitución de 2'-F se puede representar de la siguiente manera:



ARN

Composición natural de ARN



2'F-ARN

Sustitución de 2'F

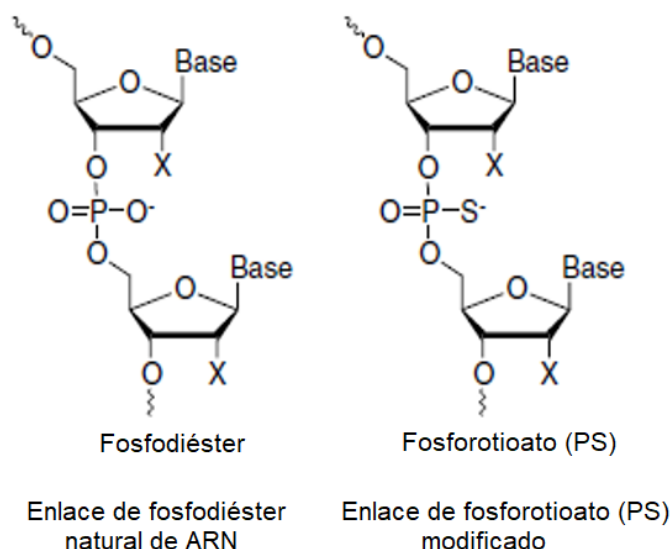
[00484]Enlace fosforotioato (PS) se refiere a un enlace en el que un azufre está sustituido por un oxígeno de fosfato no puente en un enlace fosfodiéster, por ejemplo,

en los enlaces entre bases de nucleótidos. Cuando se usan fosforotioatos para generar oligonucleótidos, los oligonucleótidos modificados también pueden denominarse S-oligos.

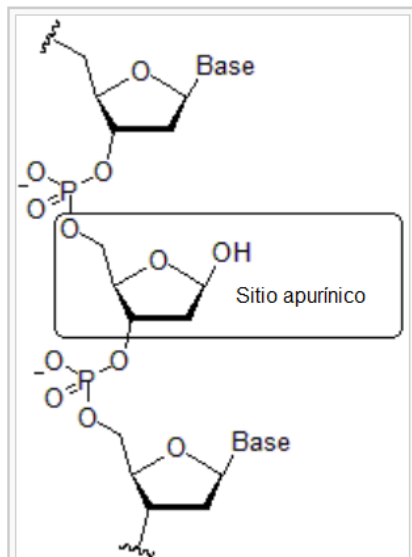
[00485]Se puede usar un "*" para indicar una modificación de PS. En esta solicitud, se pueden usar los términos A*, C*, U* o G* para indicar un nucleótido que está ligado al nucleótido siguiente (por ejemplo, 3') con un enlace PS.

[00486]En esta solicitud, se pueden usar los términos "mA*", "mC*", "mU*" o "mG*" para indicar un nucleótido que se ha sustituido con 2'-O-Me y que está ligado al nucleótido siguiente (por ejemplo, 3') con un enlace PS.

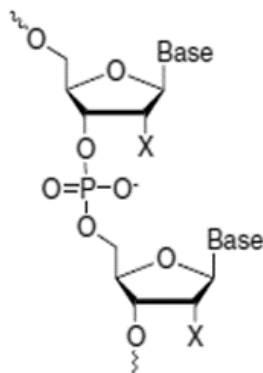
[00487]El diagrama a continuación muestra la sustitución de S- en un oxígeno de fosfato no puente, que genera un enlace PS en lugar de un enlace fosfodiéster:



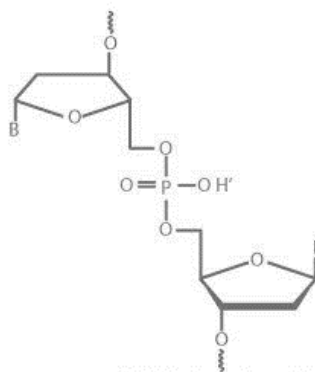
[00488]Los nucleótidos abásicos se refieren a aquellos que carecen de bases nitrogenadas. La figura a continuación muestra un oligonucleótido con un sitio abásico (también llamado apurínico) que carece de una base:



[00489]Bases invertidas se refiere a aquellas con enlaces que están invertidos con respecto al enlace 5' a 3' normal (es decir, ya sea un enlace 5' a 5' o un enlace 3' a 3'). Por ejemplo:



Enlace de oligonucleótido normal



Enlace de oligonucleótido invertido

[00490]Un nucleótido abásico puede unirse con un enlace invertido. Por ejemplo, un nucleótido abásico puede unirse al nucleótido del terminal 5' mediante un enlace 5' a 5', o un nucleótido abásico puede unirse al nucleótido del terminal 3' mediante un enlace 3' a 3'. Un nucleótido abásico invertido en el nucleótido del terminal 5' o 3' también puede denominarse terminación de extremo abásico invertido.

[00491]En algunas formas de realización, uno o más de los primeros tres, cuatro o cinco nucleótidos en el terminal 5', y uno o más de los últimos tres, cuatro o cinco nucleótidos en el terminal 3' están modificados. En algunas formas de realización, la modificación es un 2'-O-Me, 2'-F, nucleótido abásico invertido, enlace PS u otra modificación de nucleótido conocida en la técnica para aumentar la estabilidad y/o el

rendimiento.

[00492]En algunas formas de realización, los primeros cuatro nucleótidos en el terminal 5' y los últimos cuatro nucleótidos en el terminal 3' están ligados con enlaces fosforotioato (PS).

[00493]En algunas formas de realización, los primeros tres nucleótidos en el terminal 5', y los últimos tres nucleótidos en el terminal 3' comprenden un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-O-Me). En algunas formas de realización, los primeros tres nucleótidos en el terminal 5', y los últimos tres nucleótidos en el terminal 3' comprenden un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F). En algunas formas de realización, los primeros tres nucleótidos en el terminal 5', y los últimos tres nucleótidos en el terminal 3' comprenden un nucleótido abásico invertido.

[00494]En algunas formas de realización, el ARN guía comprende un sgARN modificado. En algunas formas de realización, se proporciona el ARN guía que comprende cualquier porción conservada de un sgARN mostrado en la Tabla 4, que opcionalmente tiene un patrón de modificación de cualquiera de un sgARN mostrado en la Tabla 4, opcionalmente en donde el sgARN comprende una modificación del extremo 5' y 3' (si no se muestra ya en la construcción de la Tabla 4). En algunas formas de realización, el sgARN comprende el patrón de modificación de cualquiera de un sgARN mostrado en la Tabla 4, donde N es cualquier nucleótido natural o no natural, y donde todas las N comprenden una secuencia guía que dirige una nucleasa a una secuencia diana en *KLKB1*, por ejemplo, como se muestra en la Tabla 1.

[00495]En algunas formas de realización, el ARN guía comprende un sgARN que comprende cualquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149 y cualquier porción conservada de un sgARN mostrado en la Tabla 4, que opcionalmente tiene un patrón de modificación de cualquiera de los sgARN mostrados en la Tabla 4, opcionalmente en donde el sgARN comprende una modificación del extremo 5' y 3' (si no se muestra ya en la construcción de la Tabla 4). En algunas formas de realización, el ARN guía comprende un sgARN que comprende cualquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149 y los nucleótidos de SEQ ID NO: 170, 171, 172 o 173, en donde los nucleótidos de SEQ ID NO: 170, 171, 172 o 173 están en el extremo 3' de la secuencia guía, y en donde el sgARN puede estar modificado como se muestra en la Tabla 4 o SEQ ID NO: 300.

[00496]Como se indicó anteriormente, en algunas formas de realización, una composición o formulación divulgada en la presente comprende un mARN que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un agente de fijación a

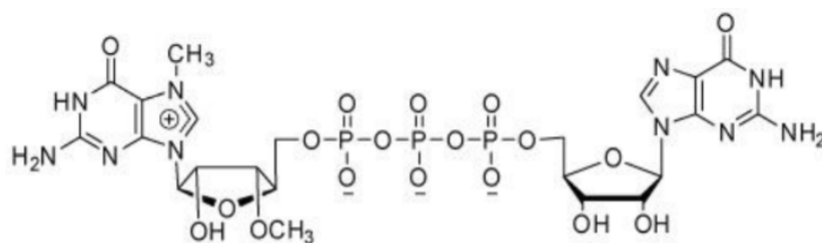
ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas descrita en la presente. En algunas formas de realización, se proporciona, usa o administra un mARN que comprende un ORF que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas. En algunas formas de realización, el ORF que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN es un "ORF de agente de fijación a ADN guiado por ARN modificado" o simplemente un "ORF modificado", que se usa como abreviatura para indicar que el ORF está modificado.

[00497]En algunas formas de realización, el ORF modificado puede comprender una uridina modificada en al menos una, una pluralidad o la totalidad de las posiciones de uridina. En algunas formas de realización, la uridina modificada es una uridina modificada en la posición 5, por ejemplo, con un halógeno, metilo o etilo. En algunas formas de realización, 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 formas de realización, la uridina modificada es 5-metoxiuridina. En algunas formas de realización, la uridina modificada es 5-yodouridina. En algunas formas de realización, la uridina modificada es pseudouridina. En algunas formas de realización, la uridina modificada es N1-metil-pseudouridina. En algunas formas de realización, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y N1-metil-pseudouridina. En algunas formas de realización, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y 5-metoxiuridina. En algunas formas de realización, la uridina modificada es una combinación de N1-metil-pseudouridina y 5-metoxiuridina. En algunas formas de realización, la uridina modificada es una combinación de 5-yodouridina y N1-metil-pseudouridina. En algunas formas de realización, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y 5-yodouridina. En algunas formas de realización, la uridina modificada es una combinación de 5-yodouridina y 5-metoxiuridina.

[00498]En algunas formas de realización, un mARN divulgado en la presente comprende una terminación 5', tal como Cap0, Cap1 o Cap2. Una terminación 5' es por lo general un ribonucleótido de 7-metilguanina (que puede estar modificado adicionalmente, como se analiza más adelante, por ejemplo, con respecto a ARCA) ligado a través de un 5'-trifosfato a la posición 5' del primer nucleótido de la cadena 5' a 3' del mARN, es decir, el primer nucleótido cercano a la terminación. En Cap0, las ribosas del primer y segundo nucleótidos cercanos a la terminación del mARN comprenden en ambos casos un 2'-hidroxilo. En Cap1, las ribosas del primer y

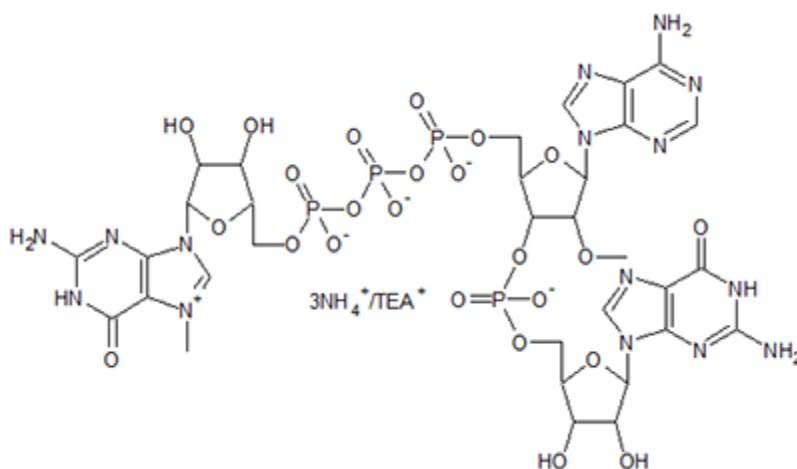
segundo nucleótidos transcritos del mRNA comprenden un 2'-metoxi y un 2'-hidroxilo, respectivamente. En Cap2, las ribosas del primer y segundo nucleótidos cercanos a la terminación del mRNA comprenden en ambos casos un 2'-metoxi. Ver, por ejemplo, Katibah *et al.* (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30; Abbas *et al.* (2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115. La mayoría de los mRNA eucariotas superiores endógenos, incluso mRNA de mamífero, tales como mRNA humanos, comprenden Cap1 o Cap2. Cap0 y otras estructuras de terminación distintas de Cap1 y Cap2 pueden ser inmunógenas en mamíferos, tales como seres humanos, debido al reconocimiento como "no propio" por parte de los componentes del sistema inmunitario innato, tales como IFIT-1 y IFIT-5, lo que puede dar como resultado niveles elevados de citocinas, incluso interferón tipo I. Los componentes del sistema inmunitario innato tales como IFIT-1 y IFIT-5 también pueden competir con eIF4E por la fijación de un mRNA con una terminación distinta de Cap1 o Cap2, lo que inhibe potencialmente la traducción del mRNA.

[00499]Se puede incluir una terminación cotranscripcionalmente. Por ejemplo, ARCA (análogo de terminación anti-inverso; Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. AM8045) es un análogo de terminación que comprende un 3'-metoxi-5'-trifosfato de 7-metilguanina ligado a la posición 5' de un ribonucleótido de guanina que puede incorporarse *in vitro* en un transcripto al inicio. ARCA da como resultado una terminación Cap0 en la que la posición 2' del primer nucleótido cercano a la terminación es hidroxilo. Ver, por ejemplo, Stepinski *et al.*, (2001) "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'deoxy)GpppG", *RNA* 7: 1486–1495. La estructura de ARCA se muestra a continuación.



[00500]Se puede usar CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies, N.º de cat. N-7113) o CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies, N.º de cat. N-7133) para proporcionar una estructura Cap1 cotranscripcionalmente. También hay disponibles versiones 3'-O-metiladas de CleanCap™ AG y CleanCap™ GG a través de TriLink Biotechnologies como N.º de cat. N-7413 y N-7433, respectivamente. La estructura de CleanCap™ AG se muestra a

continuación.



[00501]De manera alternativa, se puede agregar una terminación a un ARN de manera posterior a la transcripción. Por ejemplo, la enzima de terminación de vaccinia está disponible en el comercio (New England Biolabs, N.º de cat. M2080S) y tiene actividades de guanililtransferasa y trifosfatasa de ARN, proporcionadas por su subunidad D1, y guanina metiltransferasa, proporcionada por su subunidad D12. Por definición, puede agregar una 7-metilguanina a un ARN, a fin de obtener Cap0, en presencia de S-adenosil metionina y GTP. Ver, 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.

[00502]En algunas formas de realización, el mRNA comprende además una cola poli-adenilada (poli-A). En algunas formas de realización, la cola poli-A comprende al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 adeninas, opcionalmente hasta 300 adeninas. En algunas formas de realización, la cola poli-A comprende 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de adenina.

D. Complejo de ribonucleoproteína

[00503]En algunas formas de realización, la divulgación proporciona composiciones que comprenden uno o más gARN que comprenden una o más secuencias guía de la Tabla 1 o 2 y un agente de fijación a ADN guiado por ARN, por ejemplo, una nucleasa, tal como una nucleasa Cas, tal como Cas9. En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN tiene actividad de escindasa, que también puede denominarse actividad de endonucleasa bicatenaria. En algunas formas de realización, el agente de fijación a 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 otras procariotas (ver, por ejemplo, la lista en el siguiente

párrafo), y versiones modificadas (por ejemplo, modificadas por ingeniería genética por ingeniería genética o mutantes) de estas. Ver, 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 la subunidad Cas10, Csm1 o Cmr2 de este; y un complejo de cascada de un sistema CRISPR de tipo I, o la subunidad Cas3 de este. En algunas formas de realización, la nucleasa Cas puede ser de un sistema de tipo IIA, tipo IIB o tipo IIC. Se puede encontrar un análisis de diversos sistemas CRISPR y nucleasas Cas en, por ejemplo, Makarova *et al.*, NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova *et al.*, NAT. REV. MICROBIOL, 13: 722-36 (2015); Shmakov *et al.*, MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015).

[00504]Las especies de ejemplo no limitativas de las que se puede derivar la nucleasa Cas incluyen *pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus gasseri*, *Francisella novicida*, *Wolinella succinogenes*, *Sutterella wadsworthensis*, *Gammaproteobacterium*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Fibrobacter succinogene*, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Treponema denticola*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas sp.*, *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus sp.*, *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor beccsii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finegoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter sp.*, *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc sp.*, *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira sp.*, *Lyngbya sp.*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria sp.*, *Petrotoga mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, *Acidaminococcus sp.*, *Lachnospiraceae bacterium ND2006*, y *Acaryochloris marina*.

[00505]En algunas formas de realización, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de

Streptococcus pyogenes. En algunas formas de realización, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Streptococcus thermophilus*. En algunas formas de realización, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Neisseria meningitidis*. En algunas formas de realización, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Staphylococcus aureus*. En algunas formas de realización, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Francisella novicida*. En algunas formas de realización, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Acidaminococcus sp.* En algunas formas de realización, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Lachnospiraceae bacterium* ND2006. En otras formas de realización, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Francisella tularensis*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens* o *Porphyromonas macacae*. En ciertas formas de realización, la nucleasa Cas es una nucleasa Cpf1 de *Acidaminococcus* o *Lachnospiraceae*.

[00506]En algunas formas de realización, el gARN junto con un agente de fijación a ADN guiado por ARN se denomina complejo de ribonucleoproteína (RNP). En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN es una nucleasa Cas. En algunas formas de realización, el gARN junto con una nucleasa Cas se denomina Cas RNP. En algunas formas de realización, la RNP comprende componentes de tipo I, tipo II o tipo III. En algunas formas de realización, la nucleasa Cas es la proteína Cas9 del sistema CRISPR/Cas de tipo II. En algunas formas de realización, el gARN junto con Cas9 se denomina RNP de Cas9.

[00507]Cas9 de tipo silvestre 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 de ADN diana. En algunas formas de realización, la proteína Cas9 comprende más de un dominio RuvC y/o más de un dominio HNH. En algunas formas de realización, la proteína Cas9 es una Cas9 de tipo silvestre. En cada una de las formas de realización de composición, uso y método, la Cas induce una rotura bicatenaria en el ADN diana.

[00508]En algunas formas de realización, se usan nucleasas Cas quiméricas, donde un dominio o región de la proteína está reemplazada por una porción de una proteína diferente. En algunas formas de realización, un dominio de nucleasa Cas puede reemplazarse con un dominio de una nucleasa diferente, tal como Fok1. En algunas formas de realización, una nucleasa Cas puede ser una nucleasa modificada.

[00509]En otras formas de realización, la nucleasa Cas puede ser de un sistema CRISPR/Cas de tipo I. En algunas formas de realización, la nucleasa Cas puede ser un componente del complejo de cascada de un sistema CRISPR/Cas de tipo I. En algunas formas de realización, la nucleasa Cas puede ser una proteína Cas3. En algunas formas de realización, la nucleasa Cas puede ser de un sistema CRISPR/Cas de tipo III. En algunas formas de realización, la nucleasa Cas puede tener una actividad de escisión de ARN.

[00510]En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN tiene actividad de nickasa monocatenaria, es decir, puede cortar una cadena de ADN para producir una rotura monocatenaria, también denominada "corte". En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN comprende una nickasa Cas. Una nickasa es una enzima que crea un corte en dsADN, es decir, corta una cadena y no la otra de la doble hélice de ADN. En algunas formas de realización, una nickasa Cas es una versión de una nucleasa Cas (por ejemplo, una nucleasa Cas analizada anteriormente) en la que un sitio activo endonucleolítico es inactivado, por ejemplo, por una o más alteraciones (por ejemplo, mutaciones puntuales) en un dominio catalítico. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 8.889.356 para encontrar un análisis de nickasas Cas y alteraciones de dominio catalítico de ejemplo. En algunas formas de realización, una nickasa Cas, tal como una nickasa Cas9, tiene un dominio RuvC o HNH inactivado.

[00511]En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN está modificado para contener solo un dominio de nucleasa funcional. Por ejemplo, la proteína del agente puede estar modificada de manera tal que uno de los dominios de nucleasa esté mutado o total o parcialmente eliminado a fin de reducir su actividad de escisión de ácido nucleico. En algunas formas de realización, se usa una nickasa que tiene un dominio RuvC con actividad reducida. En algunas formas de realización, se usa una nickasa que tiene un dominio RuvC inactivo. En algunas formas de realización, se usa una nickasa que tiene un dominio HNH con actividad reducida. En algunas formas de realización, se usa una nickasa que tiene un dominio HNH inactivo.

[00512]En algunas formas de realización, un aminoácido conservado dentro de un dominio de nucleasa de proteína Cas está sustituido para reducir o alterar la actividad de nucleasa. En algunas formas de realización, una nucleasa Cas puede comprender una sustitución de aminoácidos en el dominio de nucleasa RuvC o similar a RuvC. Las sustituciones de aminoácidos de ejemplo en el dominio de nucleasa RuvC o similar a RuvC incluyen D10A (basada en la proteína Cas9 de *S. pyogenes*). Ver, por ejemplo,

Zetsche *et al.* (2015) *Cell* Oct 22;163(3): 759-771. En algunas formas de realización, la nucleasa Cas puede comprender una sustitución de aminoácidos en el dominio de nucleasa HNH o similar a HNH. Las sustituciones de aminoácidos de ejemplo en el dominio de nucleasa HNH o similar a HNH incluyen E762A, H840A, N863A, H983A y D986A (basadas en la proteína Cas9 de *S. pyogenes*). Ver, por ejemplo, Zetsche *et al.* (2015). Otras sustituciones de aminoácidos de ejemplo incluyen D917A, E1006A y D1255A (basadas en la secuencia U112 Cpf1 de *Francisella novicida* (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN))).

[00513]En algunas formas de realización, se proporciona un mARN que codifica una nickasa en combinación con un par de ARN guía que son complementarios a las cadenas sentido y antisentido de la secuencia diana, respectivamente. En esta forma de realización, los ARN guía dirigen la nickasa a una secuencia diana e introducen una DSB al generar un corte en cadenas opuestas de la secuencia diana (es decir, corte doble). En algunas formas de realización, el uso de un corte doble puede mejorar la especificidad y reducir los efectos secundarios. En algunas formas de realización, se usa una nickasa junto con dos ARN guía distintos que se dirigen a cadenas opuestas de ADN para producir un corte doble en el ADN diana. En algunas formas de realización, se usa una nickasa junto con dos ARN guía distintos que se seleccionan para que estén cerca para producir un corte doble en el ADN diana.

[00514]En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN carece de actividad de escindasa y nickasa. En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN comprende un polipéptido de fijación a ADN dCas. Un polipéptido dCas tiene actividad de fijación a ADN, mientras que carece esencialmente de actividad catalítica (escindasa/nickasa). En algunas formas de realización, el polipéptido dCas es un polipéptido dCas9. En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN que carece de actividad de escindasa y nickasa o el polipéptido de fijación a ADN dCas es una versión de una nucleasa Cas (por ejemplo, una nucleasa Cas analizada anteriormente) en la que sus sitios activos endonucleolíticos son inactivados, por ejemplo, por una o más alteraciones (por ejemplo, mutaciones puntuales) en sus dominios catalíticos. Ver, por ejemplo, US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1.

[00515]En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN comprende uno o más dominios funcionales heterólogos (por ejemplo, es o comprende un polipéptido de fusión).

[00516]En algunas formas de realización, el dominio funcional heterólogo puede

facilitar el transporte del agente de fijación a 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 formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN puede estar fusionado con 1-10 NLS. En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN puede estar fusionado con 1-5 NLS. En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN puede estar fusionado con una NLS. Cuando se usa una NLS, la NLS puede estar ligada en el terminal N o el terminal C de la secuencia de agente de fijación a ADN guiado por ARN. También puede insertarse dentro de la secuencia de agente de fijación a ADN guiado por ARN. En otras formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN puede estar fusionado con más de una NLS. En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN puede estar fusionado con 2, 3, 4 o 5 NLS. En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN puede estar fusionado con dos NLS. En ciertas circunstancias, las dos NLS pueden ser iguales (por ejemplo, dos SV40 NLS) o diferentes. En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN está fusionado con dos secuencias de SV40 NLS ligadas en el terminal carboxi. En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN puede estar fusionado con dos NLS, una ligada en el terminal N y una en el terminal C. En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN puede estar fusionado con 3 NLS. En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN puede no estar fusionado con NLS alguna. En algunas formas de realización, la NLS puede ser una secuencia monopartita, tal como, por ejemplo, la SV40 NLS, PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) o PKKKRRV (SEQ ID NO: 601). En algunas formas de realización, la NLS puede ser una secuencia bipartita, tal como la NLS de nucleoplasmina, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 602). En una forma de realización específica, una sola NLS PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) puede estar ligada en el terminal C del agente de fijación a ADN guiado por ARN. Se incluyen opcionalmente uno o más ligadores en el sitio de fusión.

[00517]En algunas formas de realización, el dominio funcional heterólogo puede ser capaz de modificar la semivida intracelular del agente de fijación a ADN guiado por ARN. En algunas formas de realización, se puede aumentar la semivida del agente de fijación a ADN guiado por ARN. En algunas formas de realización, la semivida del agente de fijación a ADN guiado por ARN puede reducirse. En algunas formas de realización, el dominio funcional heterólogo puede ser capaz de aumentar la

estabilidad del agente de fijación a ADN guiado por ARN. En algunas formas de realización, el dominio funcional heterólogo puede ser capaz de reducir la estabilidad del agente de fijación a ADN guiado por ARN. En algunas formas de realización, el dominio funcional heterólogo puede actuar como un péptido de señal para la degradación de proteínas. En algunas formas de realización, la degradación de proteínas puede estar mediada por enzimas proteolíticas, tales como, por ejemplo, proteasomas, proteasas lisosomales o proteasas calpaínas. En algunas formas de realización, el dominio funcional heterólogo puede comprender una secuencia PEST. En algunas formas de realización, el agente de fijación a ADN guiado por ARN puede modificarse mediante la adición de ubiquitina o una cadena de poliubiquitina. En algunas formas de realización, la ubiquitina puede ser una proteína similar a la ubiquitina (UBL). Los ejemplos no limitativos de proteínas similares a la ubiquitina incluyen un modificador similar a la ubiquitina pequeño (SUMO), una proteína de reactividad cruzada de ubiquitina (UCRP, también denominada gen estimulado por interferón 15 (ISG15)), un modificador relacionado con la ubiquitina 1 (URM1), una proteína de desarrollo regulada de manera descendente expresada en células precursoras neuronales 8 (NEDD8, también denominada Rub1 en *S. cerevisiae*), un antígeno leucocitario humano asociado a F (FAT10), autofagia 8 (ATG8) y 12 (ATG12), una proteína similar a Fau ubiquitina (FUB1), una UBL anclada a la membrana (MUB), un modificador de pliegue de ubiquitina 1 (UFM1) y una proteína similar a la ubiquitina 5 (UBL5).

[00518] En algunas formas de realización, el dominio funcional heterólogo puede ser un dominio de marcador. Los ejemplos no limitativos de dominios de marcador incluyen proteínas fluorescentes, etiquetas de purificación, etiquetas de epítipo y secuencias de genes indicadores. En algunas formas de realización, el dominio de marcador puede ser una proteína fluorescente. Los ejemplos no limitativos de proteínas fluorescentes adecuadas incluyen proteínas fluorescentes verdes (por ejemplo, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, Azami Green monomérica, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), proteínas fluorescentes amarillas (por ejemplo, YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), proteínas fluorescentes azules (por ejemplo, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), proteínas fluorescentes turquesas (por ejemplo, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), proteínas fluorescentes rojas (por ejemplo, mKate, mKate2, mPlum, monómero DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611,

mRaspberry, mStrawberry, Jred) y proteínas fluorescentes naranjas (mOrange, mKO, Kusabira-Orange, Kusabira-Orange monomérica, mTangerine, tdTomato) o cualquier otra proteína fluorescente adecuada. En otras formas de realización, el dominio de marcador puede ser una etiqueta de purificación y/o una etiqueta de epítipo. Las etiquetas de ejemplo no limitativas incluyen glutatión-S-transferasa (GST), proteína de fijación a quitina (CBP), proteína de fijación a maltosa (MBP), tioredoxina (TRX), poli(NANP), etiqueta 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 indicadores de ejemplo no limitativos incluyen glutatión-S-transferasa (GST), peroxidasa de rábano picante (HRP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, luciferasa o proteínas fluorescentes.

[00519]En formas de realización adicionales, el dominio funcional heterólogo puede dirigir el agente de fijación a ADN guiado por ARN a un orgánulo, tipo celular, tejido u órgano específico. En algunas formas de realización, el dominio funcional heterólogo puede dirigir el agente de fijación a ADN guiado por ARN a la mitocondria.

[00520]En otras formas de realización, el dominio funcional heterólogo puede ser un dominio efector. Cuando el agente de fijación a ADN guiado por ARN se dirige a su secuencia diana, por ejemplo, cuando un gARN dirige una nucleasa Cas a una secuencia diana, el dominio efector puede modificar o afectar la secuencia diana. En algunas formas de realización, el dominio efector puede elegirse de un dominio de fijación 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 de represión transcripcional. En algunas formas de realización, el dominio funcional heterólogo es una nucleasa, tal como una nucleasa FokI. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 9.023.649. En algunas formas de realización, el dominio funcional heterólogo es un activador o represor transcripcional. Ver, por ejemplo, Qi *et al.*, "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression", *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera *et al.*, "RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors", *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali *et al.*, "CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering", *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert *et al.*, "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes", *Cell* 154:442-51 (2013).

Por definición, el agente de fijación a ADN guiado por ARN se vuelve esencialmente un factor de transcripción que puede dirigirse para que se fije a una secuencia diana deseada mediante el uso de un ARN guía.

E. Determinación de la eficacia de los gARN

[00521]En algunas formas de realización, la eficacia de un gARN se determina cuando se administra o expresa junto con otros componentes que forman una RNP. En algunas formas de realización, el gARN se expresa junto con un agente de fijación a ADN guiado por ARN, tal como una proteína Cas, por ejemplo, Cas9. En algunas formas de realización, el gARN se administra a, o expresa en, una línea celular que ya expresa de manera estable una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa o nickasa Cas, por ejemplo, una nucleasa o nickasa Cas9. En algunas formas de realización, el gARN se administra a una célula como parte de una RNP. En algunas formas de realización, el gARN se administra a una célula junto con un mARN que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa o nickasa Cas, por ejemplo, una nucleasa o nickasa Cas9.

[00522]Como se describe en la presente, el uso de una nucleasa de ADN guiada por ARN y un ARN guía divulgados en la presente puede conducir a roturas bicatenarias (DSB), una rotura monocatenaria y/o de fijación específica al sitio que dan como resultado las modificaciones de ácido nucleico en el ADN, las cuales pueden producir errores en forma de mutaciones de inserción/eliminación (indel) tras las reparaciones realizadas por la maquinaria celular. Muchas mutaciones debido a indeles alteran el marco de lectura o introducen codones de detención prematuros y, por lo tanto, producen una proteína no funcional.

[00523]En algunas formas de realización, la eficacia de gARN particulares se determina en función de modelos *in vitro*. En algunas formas de realización, el modelo *in vitro* son células HEK293 que expresan Cas9 (HEK293_Cas9) de manera estable. En algunas formas de realización, el modelo *in vitro* son células de hepatocarcinoma humano HUH7. En algunas formas de realización, el modelo *in vitro* son células HepG2. En algunas formas de realización, el modelo *in vitro* son hepatocitos primarios humanos. En algunas formas de realización, el modelo *in vitro* son hepatocitos primarios de *Macaca fascicularis*. Con respecto al uso de hepatocitos primarios humanos, se pueden usar hepatocitos primarios humanos disponibles en el comercio para proporcionar una mayor consistencia entre experimentos. En algunas formas de realización, la cantidad de sitios secundarios en los que ocurre una eliminación o inserción en un modelo *in vitro* (por ejemplo, en hepatocitos primarios humanos) se

determina, por ejemplo, al analizar ADN genómico de hepatocitos primarios humanos transfectados *in vitro* con mARN de Cas9 y el ARN guía. En algunas formas de realización, tal determinación comprende analizar ADN genómico de hepatocitos primarios humanos transfectados *in vitro* con mARN de Cas9, el ARN guía y un oligonucleótido donante. Se proporcionan procedimientos de ejemplo para tales determinaciones en los ejemplos de trabajo más adelante.

[00524]En algunas formas de realización, la eficacia de gARN particulares se determina en múltiples modelos de células *in vitro* para un proceso de selección de gARN. En algunas formas de realización, se lleva a cabo una comparación entre líneas celulares de datos con gARN seleccionados. En algunas formas de realización, se lleva a cabo un cribado cruzado en múltiples modelos celulares. En algunas formas de realización, la eficacia de gARN particulares se determina en PHH o PCH para un proceso de selección de gARN.

[00525]En algunas formas de realización, la eficacia de gARN particulares se determina en función de modelos *in vivo*. En algunas formas de realización, el modelo *in vivo* es un modelo de roedor. En algunas formas de realización, el modelo de roedor es un ratón que expresa un gen *KLKB1*. En algunas formas de realización, el modelo de roedor es un ratón que expresa un gen *KLKB1* humano. En algunas formas de realización, el modelo *in vivo* es un primate no humano, por ejemplo, *Macaca fascicularis*.

[00526]En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se mide en función del porcentaje de edición de *KLKB1*. Se puede calcular el porcentaje de indeles a partir de la secuenciación de NGS. En algunas formas de realización, el porcentaje de edición de *KLKB1* se compara con el porcentaje de edición necesario para lograr la inactivación de la proteína precalicreína y/o calicreína, por ejemplo, de medios de cultivo celular o lisados celulares en el caso de un modelo *in vitro* o plasma que contiene niveles en circulación en el caso de un modelo *in vivo*.

[00527]En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se mide en función de la cantidad y/o frecuencia de indeles en secuencias no diana dentro del genoma del tipo celular diana. En algunas formas de realización, se proporcionan ARN guía eficaces que producen indeles en sitios secundarios con frecuencias muy bajas (por ejemplo, <5 %) en una población celular y/o en relación con la frecuencia de creación de indeles en el sitio diana. Por lo tanto, la divulgación proporciona ARN guía que no exhiben formación de indeles secundaria en el tipo celular diana (por ejemplo, un hepatocito tal como PHH), o que producen una frecuencia de formación de indeles

secundaria de <5 % en una población celular y/o en relación con la frecuencia de creación de indeles en el sitio diana. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona ARN guía que no exhiben ninguna formación de indeles secundaria en el tipo celular diana (por ejemplo, un hepatocito). En algunas formas de realización, se proporcionan ARN guía que producen indeles en menos de 5 sitios secundarios, por ejemplo, según lo evaluado a través de uno o más métodos descritos en la presente. En algunas formas de realización, se proporcionan ARN guía que producen indeles en menos de, o igual a, 4, 3, 2 o 1 sitio secundario, por ejemplo, según lo evaluado mediante uno o más métodos descritos en la presente. En algunas formas de realización, los sitios secundarios no ocurren en una región codificante de proteínas en el genoma de la célula diana (por ejemplo, hepatocito).

[00528]En algunas formas de realización, se utiliza amplificación lineal para detectar eventos de edición de genes, tal como la formación de mutaciones de inserción/eliminación ("indel"), translocaciones y eventos de reparación dirigida por homología (HDR) en el ADN diana. Por ejemplo, se puede utilizar amplificación lineal con un cebador etiquetado con una secuencia única y el aislamiento de los productos de amplificación etiquetados (en adelante denominado método "UnIT" o "Tagmentación de identificador único").

[00529]En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de KLKB1, pKal, KLKB1 total (precalicreína + pKal), la actividad de KLKB1, HMWK, la actividad de HMWK, y/o bradiquinina, en una muestra tal como un fluido corporal, por ejemplo, suero, plasma o sangre.

[00530]En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de mARN de KLKB1. Una disminución en los niveles de mARN de KLKB1 es indicativa de un ARN guía eficaz.

[00531]En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de bradiquinina en una muestra tal como un fluido corporal, por ejemplo, suero, plasma o sangre.

[00532]En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de bradiquinina y/o sus productos de degradación en una muestra. En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de bradiquinina y/o sus productos de degradación en suero o en plasma. Una disminución en los niveles de bradiquinina y/o sus productos de degradación en suero o en plasma es indicativa de un ARN guía eficaz.

[00533]Un método para detectar bradiquinina en sangre circulante se proporciona en

Ferreira, *et al.*, Br. J. Pharmac. Chemother. (1967), 29, 367-377. La bradiquinina también puede detectarse mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con medios de cultivo celular o suero o plasma. (Ver, por ejemplo, Abcam N.º de cat. ab136936; Markit-M Bradiquinina (Gentaur)). En algunas formas de realización, los niveles de bradiquinina se miden en los mismos sistemas o modelos *in vitro* o *in vivo* utilizados para medir la edición. En algunas formas de realización, los niveles de bradiquinina se miden en células, por ejemplo, hepatocitos primarios humanos. En algunas formas de realización, los niveles de bradiquinina se miden en un fluido, tal como suero o plasma. En algunas formas de realización, se miden los niveles en circulación de bradiquinina.

[00534]En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de calicreína total (precalicreína y calicreína en plasma (pKal)) en una muestra. En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de calicreína total en una muestra tal como un fluido corporal, por ejemplo, suero, plasma o sangre. En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de calicreína total en suero o en plasma. Una disminución en los niveles de calicreína total en suero o en plasma es indicativa de un ARN guía eficaz. En algunas formas de realización, la calicreína total en suero y/o en plasma disminuye por debajo de 40 % de los niveles iniciales. En algunas formas de realización, los niveles de calicreína total se miden con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con suero, plasma o medios de cultivo celular. En algunas formas de realización, los niveles de calicreína total se miden en los mismos sistemas o modelos *in vitro* o *in vivo* utilizados para medir la edición. En algunas formas de realización, los niveles de calicreína total se miden en células, por ejemplo, hepatocitos primarios humanos. En algunas formas de realización, los niveles de calicreína total se miden en células PHH y PCH.

[00535]En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de precalicreína y/o calicreína en una muestra tal como un fluido corporal, por ejemplo, suero, plasma o sangre. En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de precalicreína y/o calicreína en suero o en plasma. Una disminución en los niveles de precalicreína y/o calicreína en suero o en plasma es indicativa de un ARN guía eficaz. En algunas formas de realización, los niveles de precalicreína y/o calicreína se miden con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con suero, plasma o medios de cultivo celular. En algunas formas de realización, los niveles de precalicreína y/o

calicreína se miden en los mismos sistemas o modelos *in vitro* o *in vivo* utilizados para medir la edición. En algunas formas de realización, los niveles de precalicreína y/o calicreína se miden en células, por ejemplo, hepatocitos primarios humanos, en plasma o en medios de cultivo celular. En algunas formas de realización, los niveles de precalicreína y/o calicreína se miden en una muestra de plasma. En algunas formas de realización, los niveles de precalicreína y/o calicreína se miden en una muestra de suero. Los niveles de proteína de precalicreína y/o pKal se miden opcionalmente mediante ELISA después de una etapa de activación para convertir la precalicreína en su forma activa, pKal.

[00536]En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de precalicreína en una muestra. En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de precalicreína en una muestra tal como un fluido corporal, por ejemplo, suero, plasma o sangre. En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de precalicreína en suero o en plasma. Una disminución en los niveles de precalicreína en suero o en plasma es indicativa de un ARN guía eficaz. En algunas formas de realización, la precalicreína en suero y/o en plasma se reduce al menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más. En algunas formas de realización, la calicreína total en suero y/o en plasma, precalicreína y/o calicreína disminuye en alrededor de 60-80 %, 60-90 %, 60-95 %, 60-100 %, 85-95 % u 85-100 %. En algunas formas de realización, los niveles de precalicreína se miden con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con suero, plasma o medios de cultivo celular. En algunas formas de realización, los niveles de precalicreína se miden en los mismos sistemas o modelos *in vitro* o *in vivo* utilizados para medir la edición. En algunas formas de realización, los niveles de precalicreína se miden en células, por ejemplo, hepatocitos primarios humanos, en plasma o en medios de cultivo celular. En algunas formas de realización, los niveles de precalicreína se miden en una muestra de plasma. En algunas formas de realización, los niveles de precalicreína se miden en una muestra de suero.

[00537]En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de pKal en una muestra. En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de pKal en suero o en plasma. Una disminución en el nivel de pKal en suero o en plasma es indicativa de un ARN guía eficaz. En algunas formas de realización, el nivel de pKal se reduce al menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más. En algunas formas de realización, la pKal en suero y/o en plasma disminuye en alrededor de 60-80 %, 60-90 %, 60-95 %, 60-100 %, 85-95 % u 85-100 %.

60-100 %, 85-95 % u 85-100 %. En algunas formas de realización, los niveles de pKal se miden con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con suero, plasma o medios de cultivo celular. En algunas formas de realización, los niveles de pKal se miden en los mismos sistemas o modelos *in vitro* o *in vivo* utilizados para medir la edición. En algunas formas de realización, los niveles de pKal se miden en células, por ejemplo, hepatocitos primarios humanos, en plasma o en medios de cultivo celular. En algunas formas de realización, los niveles de pKal se miden en una muestra de plasma. En algunas formas de realización, los niveles de pKal se miden en una muestra de suero.

[00538]En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de HMWK escindido en circulación (cHMWK) y HMWK total en suero citratado o en plasma citratado. En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir los niveles de HMWK escindido en circulación (cHMWK) y HMWK total en suero citratado o en plasma citratado. Una disminución en la proporción de HMWK escindido en comparación con HMWK total es indicativa de un ARN guía eficaz. En algunas formas de realización, la proporción de HMWK escindido en comparación con HMWK total puede dirigirse a una relación de cHMWK en plasma en circulación con respecto a HMWK total de menos de alrededor de 60 %. En algunas formas de realización la relación de cHMWK con respecto a HMWK es menor de alrededor de 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 50 % o más. En algunas formas de realización, los niveles de precalicreína se miden con ensayo de transferencia Western con suero, plasma o medios de cultivo celular. En algunas formas de realización, los niveles de cHMWK y HMWK total se miden en los mismos sistemas o modelos *in vitro* o *in vivo* utilizados para medir la edición. En algunas formas de realización, los niveles de cHMWK y HMWK total se miden en células, por ejemplo, hepatocitos primarios humanos, en plasma o en medios de cultivo celular. En algunas formas de realización, los niveles de cHMWK y HMWK total se miden en una muestra de plasma. En algunas formas de realización, los niveles de cHMWK y HMWK total se miden en una muestra de suero.

[00539]En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir la actividad de pKal en una muestra. Una disminución en la actividad de pKal es indicativa de un ARN guía eficaz. En algunas formas de realización, la eficacia de un ARN guía se determina al medir la actividad de pKal en suero o en plasma.

[00540]En algunas formas de realización, la actividad de pKal se mide como la capacidad de una muestra de suero citratado o una muestra de plasma citratado para

convertir HMWK en cHMWK (ver Banerji *et al.*, N Engl J Med 2017;376:717-28.). Una disminución en la proporción final de cHMWK con respecto a HMWK total indica una disminución en la actividad de pKal. Los niveles de cHMWK y HMWK de longitud completa pueden medirse por transferencia Western. En otras formas de realización, la actividad de pKal se mide como la capacidad de una muestra de suero citratado o una muestra de plasma citratado para escindir enzimáticamente un sustrato de péptido similar a HWMK, en cuyo caso una disminución en la escisión del sustrato indica una disminución en la actividad de pKal.

[00541]En algunas formas de realización, la actividad de pKal se reduce en al menos 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más. En algunas formas de realización, la actividad de pKal disminuye en alrededor de 60-80 %, 60-90 %, 60-95 %, 60-100 %, 85-95 % u 85-100 %. En algunas formas de realización, la actividad de pKal se reduce a menos de alrededor de 40 % de los niveles iniciales. En algunas formas de realización, la actividad de pKal se reduce a alrededor de 40-50 % de los niveles iniciales. En algunas formas de realización, la actividad de pKal se reduce a 20-40 o 20-50 % de los niveles iniciales. En algunas formas de realización, los niveles de la actividad de pKal se miden en los mismos sistemas o modelos *in vitro* o *in vivo* utilizados para medir la edición. En algunas formas de realización, los niveles de actividad de pKal se miden en células, por ejemplo, hepatocitos primarios humanos, en plasma o en medios de cultivo celular. En algunas formas de realización, los niveles de actividad de pKal se miden en una muestra de plasma. En algunas formas de realización, los niveles de pKal se miden en una muestra de suero.

III. Métodos terapéuticos

[00542]Los gARN y los métodos y composiciones asociados divulgados en la presente son útiles para tratar y prevenir el HAE y para prevenir los síntomas del HAE. En algunas formas de realización, los gARN y los métodos y composiciones asociados son útiles para reducir la frecuencia de los ataques de HAE. En algunas formas de realización, los gARN y los métodos y composiciones asociados son útiles para prevenir los ataques de HAE. En algunas formas de realización, los gARN divulgados en la presente son útiles para tratar y prevenir la producción y acumulación de bradiquinina, la hinchazón inducida por bradiquinina, la obstrucción de las vías respiratorias por angioedema o la asfixia. En algunas formas de realización, los gARN divulgados en la presente son útiles para tratar y prevenir el angioedema y los ataques provocados por HAE. En algunas formas de realización, los gARN divulgados en la presente son útiles para reducir la frecuencia de los ataques de angioedema, tales

como los ataques de HAE. En algunas formas de realización, los gARN divulgados en la presente son útiles para reducir la gravedad de los ataques de angioedema. En algunas formas de realización, los gARN divulgados en la presente son útiles para reducir la frecuencia y/o la gravedad de los ataques, tales como los ataques de HAE. En algunas formas de realización, los gARN divulgados en la presente son útiles para lograr la remisión de los ataques de angioedema, tales como los ataques de HAE. En algunas formas de realización, los gARN divulgados en la presente son útiles para lograr una remisión duradera, por ejemplo, para mantenerla durante al menos 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más.

[00543] Los gARN y los métodos y composiciones asociados divulgados en la presente son útiles para disminuir la producción de mARN de KLKB1. Por lo tanto, en un aspecto, la eficacia del tratamiento/prevención puede evaluarse al medir los niveles de mARN de KLKB1, en donde una disminución en niveles de mARN de KLKB1 indica la eficacia.

[00544] Los gARN y los métodos y composiciones asociados divulgados en la presente son útiles para disminuir los niveles de proteína precalicreína en plasma o en suero. Por lo tanto, en un aspecto, la eficacia del tratamiento/prevención puede evaluarse al medir los niveles de proteína precalicreína o los niveles de proteína calicreína total, en donde una disminución en la proteína precalicreína y/o calicreína indica la eficacia. En algunas formas de realización, la eficacia del tratamiento/prevención puede evaluarse al medir la proteína precalicreína en una muestra, tal como suero o plasma, en donde una disminución en precalicreína indica la eficacia. Por ejemplo, la precalicreína en plasma o en suero puede medirse por ELISA como se describe en Ferrone JD, Bhattacharjee G, Revenko AS, *et al.* IONIS-PKK_{RX} a Novel Antisense Inhibitor of Prekallikrein and Bradykinin Production. *Nucleic Acid Ther.* 2019;29(2):82–91. De manera similar, la calicreína puede medirse por ELISA como se describe en la presente, y la administración de los gARN divulgados en la presente puede disminuir los niveles de proteína calicreína en plasma o en suero.

[00545] Los gARN y los métodos y composiciones asociados divulgados en la presente son útiles para disminuir los niveles de proteína calicreína total (precalicreína y pKal) en plasma o en suero. Por lo tanto, en un aspecto, la eficacia del tratamiento/prevención puede evaluarse al medir los niveles de proteína calicreína total (precalicreína y pKal), en donde una disminución en la proteína calicreína total indica la eficacia. La calicreína total, precalicreína y/o calicreína pueden medirse antes o después de la activación para liberar la calicreína en plasma. En algunas formas de

realización, la eficacia del tratamiento/prevención puede evaluarse al medir la precalicreína y/o la proteína pKal en una muestra, tal como suero o plasma, en donde una disminución en la proteína precalicreína indica la eficacia. En algunas formas de realización, la eficacia del tratamiento/prevención puede evaluarse al medir la proteína pKal en una muestra, tal como suero o plasma, en donde una disminución en la proteína pKal indica la eficacia. Por ejemplo, los niveles de precalicreína y proteína pKal pueden medirse por ELISA, por ejemplo mediante el uso del kit ELISA para humanos de precalicreína y calicreína (Abcam, Eugene, OR). Los niveles de proteína de precalicreína y/o pKal se miden opcionalmente mediante ELISA después de una etapa de activación para convertir la precalicreína en su forma activa, pKal.

[00546] Los gARN y los métodos y composiciones asociados divulgados en la presente son útiles para disminuir la proporción de HMWK escindido en circulación (cHMWK) en comparación con HMWK total en suero citratado o plasma citratado. Por lo tanto, en un aspecto, la eficacia del tratamiento/prevención puede evaluarse al medir los niveles de proteína de HMWK total y cHMWK, en donde una disminución en la proporción de HMWK escindido indica la eficacia. En algunas formas de realización, la eficacia del tratamiento/prevención puede evaluarse al medir los niveles de proteína de HMWK total y cHMWK en una muestra, tal como suero o plasma, en donde una disminución en la proporción de cHMWK indica la eficacia. Por ejemplo, la proporción de cHMWK en comparación con HMWK total en suero citratado o muestras de plasma citratado puede medirse por transferencia Western como se describe en Suffritti C, Zanichelli A, Maggioni L, Bonanni E, Cugno M, Cicardi M. High-molecular weight kininogen cleavage correlates with disease states in the bradykinin-mediated angioedema due to hereditary C1-inhibitor deficiency. *Clin Exp Allergy* 2014;44:1503-14 y en Banerji A, Busse P, Shennak M, *et al.* Inhibiting plasma kallikrein for hereditary angioedema prophylaxis. *N Engl J Med* 2017;376:717-28.

[00547] Los niveles de cHMWK en plasma en circulación por debajo de alrededor de 30 % HMWK total se asociaron con disminuciones en los ataques de HAE en pacientes tratados con lanadelumab (ver Banerji, *et al.*, 2017). En este mismo estudio, los controles sanos tuvieron niveles plasmáticos de cHMWK de alrededor de 8,3 % HMWK total. En otro estudio, Suffritti *et al.* encontraron niveles plasmáticos de cHMWK de un promedio de alrededor de 34,8 % en controles normales, alrededor de 41,4 % en pacientes con HAE en remisión y alrededor de 58,1 % en pacientes con HAE durante un ataque (Suffritti, *et al.* *Clin Exp Allergy* 2014;44:1503-14). En consecuencia, en algunas formas de realización, los gARN y los métodos y composiciones asociados

divulgados en la presente son útiles para reducir niveles de cHMWK en circulación de manera tal que un sujeto exhiba una cantidad reducida de ataques de HAE. En algunas formas de realización, los gARN y los métodos y composiciones asociados divulgados en la presente son útiles para reducir la proporción de cHMWK de un sujeto en plasma citratado por debajo de 30 %. En algunas formas de realización, los gARN y los métodos y composiciones asociados divulgados en la presente son útiles para reducir la proporción de cHMWK de un sujeto en plasma citratado por debajo de 30 %, 20 % y/o 10 %. En algunas formas de realización, los gARN y los métodos y composiciones asociados divulgados en la presente son útiles para reducir la proporción de cHMWK de un sujeto en plasma citratado a alrededor de las de los controles sanos.

[00548] Los gARN y los métodos y composiciones asociados divulgados en la presente pueden ser útiles para disminuir la actividad de pKal espontánea en suero o en plasma. Por lo tanto, en un aspecto, la eficacia del tratamiento/prevencción puede evaluarse al medir la actividad de pKal espontánea, en donde una disminución en la actividad de pKal espontánea indica la eficacia. En algunas formas de realización, la eficacia del tratamiento/prevencción puede evaluarse al medir la actividad de pKal espontánea en una muestra, tal como suero o plasma, en donde una disminución en la actividad de pKal espontánea indica la eficacia. En ciertas formas de realización, los gARN y los métodos y composiciones asociados divulgados en la presente son útiles para disminuir el nivel inicial de pKal en circulación y la actividad de pKal en circulación.

[00549] Los gARN y los métodos y composiciones asociados divulgados en la presente pueden ser útiles para disminuir la actividad de pKal inducible en suero o en plasma. Por lo tanto, en un aspecto, la eficacia del tratamiento/prevencción puede evaluarse al medir la actividad de pKal inducible, en donde una disminución en la actividad de pKal inducible indica la eficacia. En algunas formas de realización, la eficacia del tratamiento/prevencción puede evaluarse al medir la actividad de pKal inducible en una muestra, tal como suero o plasma, en donde una disminución en la actividad de pKal inducible indica la eficacia. En algunos ejemplos, la actividad de pKal puede inducirse mediante la exposición de una muestra a FXIIa (ver Banerji *et al.*, N Engl J Med 2017;376:717-28.) En algunos ejemplos, la actividad de pKal puede inducirse mediante la incubación de una muestra con sulfato de dextrano (ver Ferrone, *et al. Nucleic Acid Ther.* 2019;29(2):82–91.) En algunos ejemplos, la actividad de pKal puede inducirse mediante la adición de ácido elágico a una muestra (Aygören-Pürsün,

et al., J Allergy Clin Immunol 2016; 138: 934–936.)

[00550]En algunos ejemplos, la actividad de pKal se mide como la capacidad de una muestra de suero citratado o una muestra de plasma citratado para convertir HMWK en cHMWK (ver Banerji *et al.*, N Engl J Med 2017;376:717-28.) en donde una disminución en la proporción final de cHMWK con respecto a HMWK total indica una disminución en la actividad de pKal. La proporción de cHMWK y HMWK de longitud completa puede medirse por transferencia Western, por ejemplo como lo describen Suffritti, *et al.*, Clin Exp Allergy 2014;44:1503-14. En otros ejemplos, la actividad de pKal se mide como la capacidad de una muestra de suero citratado o una muestra de plasma citratado para escindir enzimáticamente un sustrato de péptido similar a HMWK, en cuyo caso una disminución en la escisión del sustrato indica una disminución en la actividad de pKal. En un ejemplo, el péptido de sustrato puede ser el sustrato cromogénico péptido de H-D-Pro-Phe-Arg- p-nitroanilida (Bachem, N.º de cat. L-2120) y la escisión se puede medir como un cambio en A405 (ver Defendi *et al.*, PLoS One 2013;8:e70140). En otro ejemplo, el péptido de sustrato puede ser el sustrato fluorogénico H-Pro-Phe-Arg-AMC (Sigma, N.º de cat. P9273) y la escisión se puede medir como cambios de fluorescencia como longitudes de onda de excitación y emisión a 360 y 480 nm, respectivamente (ver Banerji, *et al.*, N Engl J Med 2017;376:717-28).

[00551]En un estudio, la reducción de la actividad de pKal inducida en más de 40 % se asoció con una reducción de los ataques de HAE (Banerji, *et al.*, N Engl J Med 2017;376:717-28). Reducción de la actividad pKal inducida en al menos 50 % se asoció con una reducción de los ataques de HAE con un tratamiento mediante BCX7353 (Aygören-Pürsün, *et al.*, N Engl J Med 2018; 379:352-362). Las reducciones de la actividad pKal inducida en 60 % se han asociado con una reducción de los ataques en el tratamiento con lanadelumab (Banerji, *et al.*, N Engl J Med 2017;376:717-28). En consecuencia, en algunas formas de realización, la administración de los gARN y las composiciones divulgados en la presente son útiles para reducir la actividad de calicreína, por ejemplo la calicreína total, la precalicreína, y/o la actividad de pKal) de manera tal que un sujeto exhiba menos ataques de HAE.

[00552]En algunas formas de realización, la administración de los gARN y las composiciones divulgados en la presente reduce la actividad de pKal de un sujeto a menos de alrededor de 40 % de los niveles iniciales. En algunas formas de realización, la administración de los gARN y las composiciones divulgados en la presente reduce la actividad de pKal de un sujeto a alrededor de 40-50 % de los niveles iniciales. En

algunas formas de realización, la administración de los gARN y las composiciones divulgados en la presente reduce la actividad de pKal de un sujeto a 20-40 % o 20-50 % de los niveles iniciales.

[00553]En algunas formas de realización, uno o más cualesquiera de los gARN, composiciones o formulaciones farmacéuticas descritos en la presente son para usar en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto. En algunas formas de realización, el tratamiento y/o prevención se logra con una dosis única, por ejemplo, un tratamiento de una sola vez, del medicamento/composición. En algunas formas de realización, la enfermedad o el trastorno es HAE.

[00554]En algunas formas de realización, la invención comprende un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar uno o más cualesquiera de los gARN, composiciones o formulaciones farmacéuticas descritos en la presente. En algunas formas de realización, la enfermedad o el trastorno es HAE. En algunas formas de realización, los gARN, composiciones o formulaciones farmacéuticas descritos en la presente se administran como una dosis única, por ejemplo, en una sola vez. En algunas formas de realización, la dosis única logra un tratamiento y/o prevención duraderos. En algunas formas de realización, el método logra un tratamiento y/o prevención duraderos. Como se usa en la presente, tratamiento y/o prevención duraderos incluye el tratamiento y/o la prevención que se extienden al menos i) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 semanas; ii) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30 o 36 meses; o iii) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años. En algunas formas de realización, una dosis única de los gARN, composiciones o formulaciones farmacéuticas descritos en la presente es suficiente para tratar y/o prevenir cualquiera de las indicaciones descritas en la presente durante toda la vida del sujeto.

[00555]En algunas formas de realización, la invención comprende un método o uso para modificar (por ejemplo, crear una rotura bicatenaria) un ADN diana que comprende administrar uno o más cualesquiera de los gARN, composiciones o formulaciones farmacéuticas descritos en la presente. En algunas formas de realización, el ADN diana es el gen *KLKB1*. En algunas formas de realización, el ADN diana está en un exón del gen *KLKB1*. En algunas formas de realización, el ADN diana está en el exón 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 del gen *KLKB1*.

[00556]En algunas formas de realización, la invención comprende un método o uso para modular un gen diana que comprende administrar uno o más cualesquiera de los

gARN, composiciones o formulaciones farmacéuticas descritos en la presente. En algunas formas de realización, la modulación es la edición del gen diana *KLKB1*. En algunas formas de realización, la modulación es un cambio en la expresión de la proteína codificada por el gen diana *KLKB1*.

[00557]En algunas formas de realización, el método o uso da como resultado la edición de genes. En algunas formas de realización, el método o uso da como resultado una rotura bicatenaria dentro del gen *KLKB1* diana. En algunas formas de realización, el método o uso da como resultado la formación de mutaciones de indeles durante la unión de extremos no homólogos de la DSB. En algunas formas de realización, el método o uso da como resultado una inserción o eliminación de nucleótidos en un gen *KLKB1* diana. En algunas formas de realización, la inserción o eliminación de nucleótidos en un gen *KLKB1* diana conduce a una mutación de desplazamiento de marco o un codón de detención prematuro que da como resultado una proteína no funcional. En algunas formas de realización, la inserción o eliminación de nucleótidos en un gen *KLKB1* diana conduce a una inactivación o eliminación de la expresión del gen diana.

[00558]En algunas formas de realización, el método o uso da como resultado la modulación del gen *KLKB1*. En algunas formas de realización, la modulación del gen *KLKB1* es una disminución de la expresión génica. En algunas formas de realización, el método o uso da como resultado una disminución de la expresión de la proteína codificada por el gen diana en una población de células o *in vivo*.

[00559]En algunas formas de realización, se proporciona un método para inducir una rotura bicatenaria (DSB) dentro del gen *KLKB1*, que comprende administrar una composición que comprende un ARN guía que comprende una o más cualesquiera de secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149. En algunas formas de realización, los gARN que comprenden una o más cualesquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149 se administran para inducir una DSB en el gen *KLKB1*. Los ARN guía pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9) o un mRNA o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

[00560]En algunas formas de realización, se proporciona un método para modificar el gen *KLKB1*, que comprende administrar una composición que comprende un ARN guía que comprende una o más cualesquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149. En algunas formas de realización, los gARN que comprenden una o más cualesquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149 se administran para

modificar el gen *KLKB1*. Los ARN guía pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9) o un mRNA o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

[00561]En algunas formas de realización, se proporciona un método para tratar o prevenir el angioedema hereditario (HAE), que comprende administrar una composición que comprende un ARN guía que comprende una o más cualesquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149. En algunas formas de realización, los gARN que comprenden una o más cualesquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149 se administran para tratar o prevenir el HAE. Los ARN guía pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9) o un mRNA o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

[00562]En algunas formas de realización, se proporciona un método para disminuir o eliminar la producción y acumulación de bradiquinina que comprende administrar un ARN guía que comprende una o más cualesquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149. Los ARN guía pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9) o un mRNA o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

[00563]En algunas formas de realización, se proporciona un método para tratar o prevenir la hinchazón inducida por bradiquinina, que comprende administrar un ARN guía que comprende una o más cualesquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149. Los ARN guía pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9) o un mRNA o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

[00564]En algunas formas de realización, se proporciona un método para tratar o prevenir el angioedema inducido por bradiquinina, que comprende administrar un ARN guía que comprende una o más cualesquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149. Los ARN guía pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9) o un mRNA o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

[00565]En algunas formas de realización, se proporciona un método para tratar o

prevenir la obstrucción de las vías respiratorias y/o la asfixia, que comprende administrar un ARN guía que comprende una o más cualesquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149. Los ARN guía pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9) o un mRNA o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

[00566]En algunas formas de realización, los gARN que comprenden una o más cualesquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149 se administran para reducir los niveles de bradiquinina en plasma, suero o sangre. Los gARN pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9) o un mRNA o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

[00567]En algunas formas de realización, los gARN que comprenden una o más cualesquiera de las secuencias guía de SEQ ID NO: 1-149 se administran para disminuir la bradiquinina en suero o en plasma. Los gARN pueden administrarse junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9) o un mRNA o vector que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9).

[00568]En algunas formas de realización, los gARN que comprenden las secuencias guía de la Tabla 1, junto con una nucleasa de ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas, inducen DSB, y la unión de extremos no homólogos (NHEJ) durante la reparación conduce a una mutación en el gen *KLKB1*. En algunas formas de realización, la NHEJ conduce a una eliminación o inserción de nucleótidos, lo que induce una mutación de desplazamiento de marco o sin sentido en el gen *KLKB1*.

[00569]En algunas formas de realización, la administración de los ARN guía de la invención (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente) disminuye los niveles (por ejemplo, los niveles en suero o plasma) de calicreína, precalicreína y/o calicreína total en el sujeto y, por lo tanto, previene la sobreproducción y acumulación de bradiquinina. En algunas formas de realización, la administración de los ARN guía de la invención (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente) disminuye los niveles de actividad de la calicreína (por ejemplo, los niveles en suero o plasma) en el sujeto y, por lo tanto, previene la sobreproducción y acumulación de bradiquinina.

[00570]En algunas formas de realización, los métodos proporcionados en la presente dan como resultado menos ataques que incluyen la fuga de fluido a través de las

células sanguíneas a los tejidos. En algunas formas de realización, los métodos proporcionados en la presente reducen los ataques que aumentan la hinchazón en los tejidos de los órganos. En algunas formas de realización, la administración de los ARN guía de la invención (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente) disminuye la frecuencia o la gravedad de los ataques de angioedema.

[00571]En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero. En algunas formas de realización, el sujeto es un primate, por ejemplo, un ser humano.

[00572]En algunas formas de realización, se proporciona el uso de un ARN guía que comprende una o más cualesquiera de las secuencias guía de la Tabla 1 o la Tabla 2 (por ejemplo, en una composición proporcionada en la presente) para la preparación de un medicamento para tratar a un sujeto humano que tiene HAE.

[00573]En algunas formas de realización, los ARN guía, las composiciones y las formulaciones se administran por vía intravenosa. En algunas formas de realización, los ARN guía, las composiciones y las formulaciones se administran mediante infusión. En algunas formas de realización, los ARN guía, las composiciones y las formulaciones se administran en la circulación hepática.

[00574]En algunas formas de realización, una administración única de una composición que comprende un ARN guía proporcionada en la presente es suficiente para inactivar la expresión de la proteína. En otras formas de realización, más de una administración de una composición que comprende un ARN guía proporcionado en la presente puede ser beneficiosa para maximizar los efectos terapéuticos.

[00575]En algunas formas de realización, el tratamiento ralentiza o detiene la progresión de la enfermedad de HAE.

[00576]En algunas formas de realización, el tratamiento ralentiza o detiene la progresión del angioedema. En algunas formas de realización, el tratamiento da como resultado una mejora, estabilización o ralentización del cambio en los síntomas de HAE.

A. Administración de composiciones de gARN

[00577]Las nanopartículas lipídicas (LNP) son un medio conocido de administración de carga de nucleótido y proteína, y se las puede usar para administrar los ARN guía, composiciones o formulaciones farmacéuticas divulgados en la presente. En algunas formas de realización, las LNP administran ácido nucleico, proteína o ácido nucleico junto con proteína.

[00578]En algunas formas de realización, la invención comprende un método para administrar cualquiera de los gARN divulgados en la presente a un sujeto, en donde el

gARN está asociado con una LNP. En algunas formas de realización, el gARN/LNP también está asociado con una Cas9 o un mARN que codifica Cas9.

[00579]En algunas formas de realización, la invención comprende una composición que comprende cualquiera de los gARN divulgados y una LNP. En algunas formas de realización, la composición comprende además una Cas9 o un mARN que codifica Cas9.

[00580]En algunas formas de realización, las LNP comprenden lípidos catiónicos. En algunas formas de realización, las LNP comprenden (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato, también denominado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato) u otro lípido ionizable. Ver, por ejemplo, los lípidos de WO/2017/173054 y las referencias allí descritas. En algunas formas de realización, las LNP comprenden relaciones molares de una amina lipídica catiónica con respecto a fosfato de ARN (N:P) de alrededor de 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 o 6,5. En algunas formas de realización, los términos catiónico e ionizable son intercambiables en el contexto de lípidos de LNP, por ejemplo, en donde los lípidos ionizables son catiónicos en función del pH.

[00581]En algunas formas de realización, las LNP asociadas con los gARN divulgados en la presente son para su uso en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno.

[00582]La electroporación es un medio conocido para administrar la carga, y se puede usar cualquier metodología de electroporación para administrar cualquiera de los gARN divulgados en la presente. En algunas formas de realización, se puede usar electroporación para administrar cualquiera de los gARN divulgados en la presente y Cas9 o un mARN que codifica Cas9.

[00583]En algunas formas de realización, la invención comprende un método para administrar cualquiera de los gARN divulgados en la presente a una célula *ex vivo*, en donde el gARN está asociado con una LNP o no está asociado con una LNP. En algunas formas de realización, el gARN/LNP o gARN también está asociado con una Cas9 o un mARN que codifica Cas9.

[00584]En algunas formas de realización, las composiciones de ARN guía descritas en la presente, solas o codificadas en uno o más vectores, se formulan en una nanopartícula lipídica o se administran a través de esta; ver, por ejemplo, WO/2017/173054 y WO 2019/067992, cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

[00585]En ciertas formas de realización, la invención comprende vectores de ADN o ARN que codifican cualquiera de los ARN guía que comprenden una o más cualesquiera de las secuencias guía descritas en la presente. En algunas formas de realización, además de las secuencias de ARN guía, los vectores comprenden además ácidos nucleicos que no codifican ARN guía. Los ácidos nucleicos que no codifican ARN guía incluyen, entre otros, 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 formas de realización, el vector comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un crARN, un trARN, o un crARN y trARN. En algunas formas de realización, el vector comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un sgARN y un mARN que codifican una nucleasa de ADN guiada por ARN, que puede ser una nucleasa Cas, tal como Cas9 o Cpf1. En algunas formas de realización, el vector comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un crARN, un trARN y un mARN que codifican una nucleasa de ADN guiada por ARN, que puede ser una proteína Cas, tal como Cas9. En una forma de realización, la Cas9 es de *Streptococcus pyogenes* (es decir, Spy Cas9). En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el crARN, trARN, o crARN y trARN (que puede ser un sgARN) comprende o consiste en una secuencia guía flanqueada por la totalidad o una porción de una secuencia de repetición de un sistema CRISPR/Cas natural. El ácido nucleico que comprende o consiste en el crARN, trARN, o crARN y trARN puede comprender además una secuencia de vector en donde la secuencia de vector comprende o consiste en ácidos nucleicos que no se encuentran naturalmente con el crARN, trARN, o crARN y trARN.

[00586]Esta descripción y las formas de realización de ejemplo no deben considerarse limitativas. A los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades, porcentajes o proporciones, y otros valores numéricos usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, han de entenderse como modificados en todos los casos por la expresión "alrededor de", si es que no están ya modificados de esa manera. En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la siguiente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar en función de las propiedades deseadas que se buscan obtener. Como mínimo, y no como un intento de limitar la

aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse, al menos, a la luz del número de dígitos significativos informados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo ordinarias.

[00587]Se observa que, como se usan en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la", y cualquier uso en singular de cualquier palabra, incluyen referentes plurales a menos que estén limitadas expresa e inequívocamente a un referente. Como se usa en la presente, el término "incluye" y sus variantes gramaticales no pretenden ser limitativos, de modo que la enumeración de elementos en una lista no implica la exclusión de otros elementos similares que pueden sustituir los elementos enumerados o sumarse a estos.

EJEMPLOS

[00588]Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas formas de realización divulgadas y no deben considerarse limitativos del alcance de esta divulgación de manera alguna.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

1.1 Transcripción *in vitro* ("IVT") de mARN de nucleasa

[00589]Se generó mARN de Cas9 de *Streptococcus pyogenes* ("Spy") con terminación y poliadenilado que contenía N1-metil pseudo-U mediante transcripción *in vitro* con una plantilla de ADN de plásmido linealizado y ARN polimerasa de T7. El ADN del plásmido que contiene un promotor T7 y una secuencia para la transcripción (para producir mARN que comprende un mARN descrito en la presente (ver SEQ ID NO: 501-516 en la Tabla 5 más adelante para los ORF de Cas9) se linealizó mediante incubación a 37 °C para completar la digestión con XbaI con las siguientes condiciones: 200 ng/μl de plásmido, 2 U/μl de XbaI (NEB), y 1x amortiguador de reacción. La XbaI se inactivó al calentar la reacción a 65 °C durante 20 min. El plásmido linealizado se purificó a partir de enzima y sales de amortiguador mediante el uso de una columna Maxi Spin de sílice (Epoch Life Sciences) y se lo analizó con gel de agarosa para confirmar la linealización. La reacción de IVT para generar mARN 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); ARCA (Trilink) 10 mM; 5 U/μl de ARN polimerasa de T7 (NEB); 1 U/μl de inhibidor de RNasa murina (NEB); 0,004 U/μl de pirofosfatasa de *E. coli* inorgánica (NEB); y 1x amortiguador de reacción. Después de la incubación de 4 horas, se

agregó TURBO DNase (ThermoFisher) hasta una concentración final de 0,01 U/μl, y la reacción se incubó durante 30 minutos adicionales para quitar la plantilla de ADN. El mRNA de Cas9 se purificó a partir de enzima y nucleótidos con un kit MegaClear Transcription Clean-up de acuerdo con el protocolo del fabricante (ThermoFisher). De manera alternativa, el mRNA de Cas9 se purificó con un método de precipitación de LiCl, al que, en algunos casos, le siguió una purificación adicional mediante filtración de flujo tangencial. La concentración de transcripto se determinó al medir la absorbancia de la luz a 260 nm (Nanodrop), y el transcripto se analizó mediante electroforesis capilar con Bioanalyzer (Agilent).

[00590]Tabla 5: Secuencias mRNA de Cas9 de ejemplo

SEQ ID NO	Secuencia
501	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCTGTTGTGTGTCGTTGCAGGCCCTTATTC GGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGAT GGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCTGGGAAACACAGA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAA GCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAAGAAA GCTTCTGCTGGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAACATCGTCGACGAA GTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGA CAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCC TGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCA GACATACAACAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCC TGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAA GAAGAACGGACTGTTTCGGAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCA ACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGA CAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCGAGACCTGTTCTGGCAGCAAGAAGAACTGAGC GACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAGGCACCGCTGAGCG CAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGA CAGCAGCTGCCGGAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAAGGATA CATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTTACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGG ACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTC GACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGG AAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCC CGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGATGGATGACAAGAAAGAGCGA AGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCA TCGAAAGAATGACAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTG CTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAAGTGAACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGA AAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAG AAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGCTCG AATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAGACCTGCTGAAGATC ATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTGAC ACTGACACTGTTTGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCG ACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAA GCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCTGAAGAGCGAC GGATTTCGAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAGGAAGACAT CCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGA AGCCCGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGCACGAACCTGGTCAAGGTCA TGGGAAGACACAAGCCGGAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAACACAGAAG GGACAGAAGAACAGCAGAGAGAAAGATGAAGAGAAATCGAAGAAGGAATCAAGGAAGTGGGAAGCC AGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTAC CTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTGACCAAGTGGACATGACATCAACAGACTGAGCAGTACG ACGTGACACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACA AGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGA AGAATACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACA AAGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGAGGATTCAAGAGAGCTGAGCTGGTTCG AAACAAGACAGATCACAAGACGCTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAGTACGAC GAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTT CAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAAATCAACAATACCACCACGCACACGACGCT ACCTGAACGCAGTCGTGGAAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAGGCAATTCGTC TACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGAAAGATGATCGCAAGAGCGAAGCAAGAAATCGGAAA GGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAATCTTCAAGACAGAAATCACACTGGC

	AAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGG ACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAGCATGCCGACGGTCAACATCGTCAAG AAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTGAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACA AGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTGACAGCCCCGACAGT CGCATACAGCGTCTTGGTCTGTCGCAAAAGGTGAAAAGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTC AAGGAAGTCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAAGAACCCGATCGACTTCCT GGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGT TCGAAGTGGAAACCGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAGTGCAGAAGGGAAACGA ACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGG GAAGCCCAGGAAGACAACGAAAGCAGAGCTGTTCTGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGA AATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCTCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAGG TCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCAC CTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACATCGACAG AAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATCCAGCAACAGCTGACAGGAC TGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCGAAGAAGAA GAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAA AATGAAGATCAATAGCTTATTATCTCTTTTTCTTTTCTTTTCTGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAA AAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAGAAC CTCGAG
502	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUC GAAGUUCAGGUGGGAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG AGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAGAACAGAAUCUGCUACC GCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAAAGCUCCUGGUCGAAGAAGACAAGA AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCCAGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAAGGC CUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACAUCCUGAUCGAA ACGUCGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUCAGACAUAACAGCUGUUCGAAGAAACCCGAU ACCAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAGCAAGACUGGAAACACUGAACCGCAGCCGG AACCCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAA ACACAUACGACGACGACCUGGACAACCCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGACAGACCUGU ACCAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAUACAAAGGCACCGCUGAGCGCAA ACCCAGGACUGACACUGAAGGCACUGGACAGACAGCAGCAGCUGCCGAAAAGUACAGAA AUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAUAUUAACAAGUUAUCAAGCCGAUCC CUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCA ACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGA CCGUACUACGUCGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAGAGC CGAAGAGUCGUCGACAAGGGAGCAUCCGACAGAGCUUACUAGCAAGUACAAACUUCGAC GCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAGGUCAAGUAC CAUUCUGAGCGGAGAACAGAAAGGCAUUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAGGU ACUUCAAAGAAGAUCCGAUUCGACAGCGUCGAAUACAGCGGAGUCGAAGACAGAUUACACGC CUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAAGAAACGAAGCAUCCUGGAAGACA ACAGAGAAAUAGAUCCGAAGAAAGACUGAAGACAUCGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAA GAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACCGGAUUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACA AUUCGCAAAACAGAAACUUAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAUUAAGGAAGACA UCCA GACAGCCUGCAGCAACACAUCGCAAAACCCUGGACGGAAGCCCGGCAUAUCAAAGGAAGGAUCCUGC AGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAACAUUCGUAUCGAAAUUGGCAAGAGAAAACAG AGAGAAAGAAUGAAGAGAAUUCGAAGAAAGGAUUAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAAC AAGCAAAAGCUGUACCCUGUACUACUCCUGCAGAACGGAAGAGACAUAGUACGACGACGGAACUGG GUGACCAACAUUCGCCCCGACAGCUUCUUGAAGGACGACAGCAUACGACAACAGUCCUGGACAA GACAACGUCCCGAGCGAAGAGUCGUAAGAAGAUAGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACG GACAACCCUGACAAGGACAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUAUCAAGA ACAAAGCACGUCGACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGC CUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAUUA UACUGAAGCAGCAGUCGUGGAAACAGCACUAGAAAGAUACCGAACGGAAGGAAUUCG CUGCAGAAAGAUAGUCGAAAGAGCGAACAGGAAUUCGAAAGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCU ACAGAAAUACACUUGGCAACGGAGAAAUACAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAAC AGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGACGUAACAUCGUAAGAAGACAG AGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAAGGACUGGACCCGGA ACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAAGGUCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAGCUGAAG CAUUAUGGAAAGAAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAGGGGAUACAAG GCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGG ACACUGCCGAGCAAGUACGUAACUUCUGUACUCCUGGCAAGCCAGCAAGAAAGCUGAAGGGAA CUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACUCCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACGCGAAUUCAGCA CUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAA AACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUAAGUACUUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAA CUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCCAGCUGAGCCAGCUGGGAGGA
503	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACA GACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAAGUUAAGGUCCUGGGAACACAGACAGACACAGCAUCA AGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAGCAACAAGACUGA AGAAACAGCAAGAAAGAAAGAUACACAAGAAAGAAACAGAAUUCGUAACUGCAGGAAAUUCU CAGCAACGAAUUGGCAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCUGGU CGAAGAAGACAAGAAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUAC

	CACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUAGAGAAAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAG ACCUGAGACUGAUUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUUCG AAGGAGACCUGAACCCGACAAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCUACUCCAGCUGGUCAGACAU ACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCUACAGCA AGAACGGACUGUUCGGAACCUUGAUCCGCACUCCAGAUCCAGCUGGACACCGAACUUCUACAGCA ACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGG ACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCUCCUGGCAGCAAAGAACCUGA GCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAUUCACAAAGGCACCCGUGA GCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGG UCAGACAGCAGCUGCCGGAAGUACAAGGAAAUUCUUCUCCGACCAGAGCAAGAACGGAUACG CAGGAUACAUCGACGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCUACAAGCCGAUCCUGG AAAAGAUUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAAGAAC AGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGACAGCAACGCAAGCAUCC UGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAGAUCCU GACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAU GACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCCUGGAAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCA AGCGCACAGACUUCGAAAGAAUACAAACUUCGACAAGAACUUCGACAAAGAACUUCGAAAGGUCC UGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUA CGUCACAGAAGGAUUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAUUCGUCGA CCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGAAG AUCGAUUGCUUCGACAGCGUCGAAUACAGCGGAGUCGAAGACAGAUUACGCAAGCCUGGGGA ACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUCCUGGACAACGAAGAAACGAAG ACAUCCUGGAAGACAUUCGUCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAG ACUGAAGACAUACGCACACCUUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUAC ACAGGAUUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAUUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAG ACAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAAACAGAAACUUCGACGACGAGAACAC GACGACAGCCUGACAUUAAGGAAGACAUCACAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGC CUGCACGAACACAUCGCAAAACCUUGGCAGGAAGCCCGGCAUUAAGAAGGGAUCCUGCAGACA GUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAACAUUCGUCACU GAAUUGGCAAGAGAAAACCAAGACAACACAGAAGGGACAGAGAAGAAGAAUUGAAGA GAAUCGAAGAAGGAUUAAGGAACUGGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGUGCAGAAACA CACAGCUGCAGAACGAAAGCUGUACCUUGUACUACCUUGCAGAACGGAAGAGACAUUGUACGUCG ACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUUCGUCCCGCAGAGCU UCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGUCCUGACAAGAAGCGACAGAGAGGAAGAAAGAG CGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAA CGCAAAGCUGAUACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAG CGAACUGGACAAGGCAGGAUUAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCAC GUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAACGACAAGCUGAUACAG AAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGGUCGACGACUUCGAAAGGACUUCAGUUCU ACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUAGAACGCAGUCGUCGG AACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGU CUACGACGUCAGAAAGAUAGUCGCAAGAGCGAACAGGAAUUCGAAAGGCAACAGCAAAGUAC UUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUACACUGGCAACGGAAGAAUACA GAAAGAGACCCGUGAUCCGAAACAAACGAGAAACAGGAGAAAUUCGUCUGGGACAAGGGAAGAG ACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGAGGUCAACAUCGUAAGAAGACAGAAG UCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAGCUGAUUCG CAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAGUACGAGGAUUCGACGACCCGACAGCUGCAGUACA GCGUCCUGGUCGUCGCAAGGUCGAAAGGGAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAAC UGCUGGGAAUACAAUUAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAGAAACCCGAUCCGACUUCUGGAAG CAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUACGUCGCCGAAGUACAGCCUGUUCG AACUGGAAACGGAAGAAAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAAUCGACAGGGAAGAACGAC UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUUGGCAAGCCACUACGAAAGCUGAAGG GAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCAUACCUUGGACG AAAUCAUCGAACAGAUACGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAAACCUUGGACAA GGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUC CACCUGUUCACACUGACAACCUUGGGACACCGCAGCAUUAAGUACUUCGACACAACAUC GACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCA CAGGACUGUACGAAACAAGAAUCCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC
504	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGCGACUGGACAUCCGGAACAAACAGCGUCGGAUUGGGCAGUCAUC ACAGACGAUACAAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUAACAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCA UCAAGAAGAACCUGAUCCGAGCAGCUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGAC UGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUUCGCUACCUUGCAGGAAAU CUUCAGCAACGAAUUGGCAAGGUCGACGACAGCUUCUUCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCU GGUCGAAGAAGACAAGGACGCAAGAACCCGAUUCUUCGGAACAAACUUCGACGACGAAGUCGC AUACCACGAAAAGUACCCGACAACUACACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAG GCAGACCUGAGACUGAUUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUG AUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCUACUCCAGCUGGUCCAG ACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAGGCAUCC UGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAAGAAGACUGGAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAA AGAAGAACGGACUGUUCGGAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUAAGA GCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACC

	UGGACAACCUUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCUUGGCAGCAAAGAACC UGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGC UGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCAC UGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAGUAACAAGGAAAUUCUUCUUGACCAGAGCAAGAACGGAU ACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCC UGGAAGAUUGGACGGAACAGAAAGCUGCUGGUAACGUAAGCAGAGAGAAAGACCUUGAGAA AGCAGAGAAAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAA UCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCCGAAAGAU CCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUG GAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUAUCACCCGUGGAACUUCGAAGAACUGCUGACAAAGGGA GCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAAGAUACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAA GUACGUCACAGAAGGAUAGAGAAAGCCGGCAUUCUUGAGCGGAGAACAGAAGAGGCAUUCGU CGACCUGCUGUUAAGACAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGAACUAGAAUUAAG AAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAAACGCAAGCCUG GGAACAUUACCAGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACG AAGACAUCCUGGAAGACAUUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGA AAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACACAAGGUAUGAAGCAGCUGAAGAACGAAGA UACACAGGAUUGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAUUCAGAGACAAGCAGAGCGGA AAGACAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAACAGAAACUUCUAGCAGCUGAUC CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGAC AGCCUGCACGAACAUUCGCAACUUGGACGGAAGCCCGCAUUAAGAAAGGAAUCCUGCAG ACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAGAAACUUCGUC AUCGAAAUGGCAAGAGAAAACAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAAGCAGAGAGAAAGAAUGA AGAGAAUUCGAAGAAGGAUUAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAA ACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACG UCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGACUACGACGUCGACACUCCGACGACGACGAGA GCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAA GAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAGUCGUAAGAAGAUAGAAGACUACUGGAGACAGCUGCU GAACGCAAAGCUGAUCAACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAGGCAGAGAGAGGAGGACU GAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCUACAAGAGACAGCUGGUGAAGCAGACUAGCAACACA GCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUC AGAGAAGUCAAGGUCAUCACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAG UUCUACAAGGUCAGAGAAAUAACAACUACCACCACGCACACGCAUACCUUACGACGAGUCCG UCGGAACAGCAGUUAAGAAAGUACCCGAAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUUACGAGAGACUACA AGGUUACGACGUCAGAAAGAUAGUCGCAAGAGCGAACAGGAAUUCGAAAGGCAACAGCAAA GUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAACCGAGAA AUCAGAAAGAGACCGCUGAUUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAA GAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGAGGUAACAUCGUCAAGAAGACAG AAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAAAGACUAGGAAAGCUGA UCGCAAGAAAGAAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCGACAGUCGCAU ACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAGGUUCGAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGG AACUGCUGGGAAUACAUAUGGAAAGAAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGUAUCGACUUCUCCUGG AAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUACAAGAAAGACCGUAUCUACAAGCUGCCGAAGUACGAGCCUGU UCGAACUGGAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAAGGGAACG AACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUAACUUCUCCUGUACUCCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGA AGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCUGUUCGUCGACAGCACAAGCACAACUCCUGG ACGAAAUCAUCGAACAGAUACGCGAAUUCAGCAAGAGAGUACUCCUGGACAGCACAACUCCUGGA CAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAGCAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUUC AUCCACCUGUUCACACUGACAACUCCUGGGAGCACCAGGAGCAUUCAGUACUUCGACACAACAA UCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAGGAAGUCCUGGACGCAACAGUACUCCACCAGAGCAU CACAGACUGUACGAAACAAGAAUCCAGCAGCAGCUGGGAGGAGAGCGAAGCGGAAGCCGCCC GAAGAAGAAGAGAAAGGUCCGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCCGACAGCGGAUAG
505	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCCGGAACAAACAGCGUCGGAUUGGGCAGUACACACA GACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCA AGAAGAACCUGAUCCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAGCAAGCAACAAGACUGA AGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAAACAGAAUUCGCUACCCUGCAGGAAAUUCU CAGCAACGAAAUGGCAAGGUUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGU CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUAC CACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAG ACCUGAGACUGAUUACUCCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGACAGACUUCUAGUCG AAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCUACUCCAGCUGGUCCAGACAU ACAACCAGCUGUUCGAAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGAGUCGACGCAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGACAGCUGCCGGGAGAAAAGA AGAACGGACUGUUCGGAACCUUGAGCAGCAUCCAGCUGGACUAGACACUCCUAGAGCA ACUUCGACCUGGCAGAAAGACGCAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGG ACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGACGACCUGUUCUCCUGGACGAAAGAACUGA GCGACGCAAUCCUGCUGAGCGCAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUACAAGGACACCGCUGA GCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCAGGACCUGACAGCUGUAAGGACACUGG UCAGACAGCAGCUGCCGGAAGUAACAAGGAAAUUCUUCGACGACGAAGAAGCAGGAUACG CAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUAUCAAGCCGAUCCUGG AAAAGAUGGACGGAACAGAAAGACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGUGAGAAAGC

	AGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCACCUGGGAGAACUCGACGCAAUCC UGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAGAUCCU GACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGCGACCGUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAU GACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCA AGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCC UGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAAACUUCGACAAAGGUAAGUA CGUCACAGAAGGAAUGAGAAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGA CCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGAAG AUCGAAUGCUUCGACAGCGUCCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUACCGCAAGCCUGGGA ACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAAG ACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAG ACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUAC ACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAG ACAAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAAACAGAAACUUCGAGACAGAGAAC GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCGAGGACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGC CUGCACGAACACAUUCGCAAAACCUGGCAGGAAGCCCAGGCAUUAAGAGGGAUCCUGCAGACA GUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGAAAACAUUCGUCAUC GAAAUGGCAAGAGAAAACCAAGACAACAGAGGACAGAAAGAAGAAUGAAGAAAGAAUGAAGA GAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACA CACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGACAUUGUACGUCG ACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUUCGUCCCGCAGAGCU UCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAG CGACAACGUCCCGAGCGAAGAGUCGUAAGAAGAUAGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAA CGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAGGCGAGAGAGAGGAGGACUGAG CGAACUGGACAAGGCAGGAUUAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAAAAGCAC GUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAG AAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAGAACUUCGAGUUCU ACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGG AACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGU CUACGACGUCAGAAAGAUCAUCGCAAGAGCGAACAGGAAUUCGAAAGGCAACAGCAAAAGUAC UUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCAACAGCAAGAACCGGACUACA GAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACCGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAG ACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCCGAGGUCAACAUCGUCAGAAAGACAGAAG UCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCG CAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGAGGAUUCGACGCCGACUCCGACUACA GCGUCCUGGUCGUCGCAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAAC UGCUGGGAAUCACAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACC CGAUCGACUUCUGGAAG CAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUACGUCGCCGAAGUACAGCCUGUUCG AACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAAC UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUAAACUUCUGUACCUGGCAAGCGAACGAAAGGUAAGG GAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCAUACCUGGACG AAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAAACCUGGACAA GGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUAUC CACCUGUUCACACUGACAACCCUGGGAGCACCGGACGCAUUAAGUACUUCGACACAACAUAUC GACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCA CAGGACUGUACGAAACAAGAAUUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAGCGGAAGCGGAAGCCCCGA AGAAGAAGAGAAAGGUCCGACGGAAGCCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCCGACAGCGGA
506	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGTTGTCGTGTGTGTCGAGGCCCTTATTC GGATCCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAG TCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCTGGGAAACACAGACAGACAC AGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAA GACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAATCTGCTACCTGCAGGAA ATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCT GGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAACATCGTCGACGAAGTCGCAT ACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTACAGAGGACACTTCTGATCGA AGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCTACGACTGGTCCAGCATACA ACCAGCTGTTCTGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCTGAGCGC AAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAAC GGACTGTTCTCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGA CCTGGCAGAAGACGCAAAAGCTGCACTGAGCAAGGACACATACGACGACACTGGACACTGCTG CTGGCACAGATCGGAGACCACTACGACAGCTGTTCTTGGCAGCAAGAAGCTGAGCGACGCAA TCCTGCTGAGCGACATCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAGGCAACCGCTGAGCGCAAGCATG ATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACGACGCT GCCGGAAGATACAAAGGAAATCTTCTTGCAGCAGAGCAAGAAGGATACGACGATACATCCGACG GAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACA GAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAATTCGACAACGG AAGCATCCCGCACCATGACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCT ACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTAGAATCCCGTACTAC GTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAGAGCGGAAGAAACA TCACACCGTGGAATTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGA ATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGA

	ATACTTCACAGTCTACAACGAAGTACAAAGGTCAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGG CATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTC ACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAG CGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGG ACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACA CTGTTTCAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAA GGTTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATC AACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCCG CAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAG GCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCG GCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAAGTGGTCAAGGTCATGGGAA GACACAAGCCGGAAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAACACAGAAGGGACAG AAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAAGTGGGAAGCCAGATCCT GAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGTTCGACAACCTGACAAAAGCGA ACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAAGTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGA CCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGC GACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAGAAGATGAAGAACT ACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGTGCATCACACAGAGAAAAGTTCGACAACCTGACAAAAGCGA GAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAAACAA GACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAAAC GACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCAGACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAA GGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACACGACAGCAGCATACCTGA ACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAGCGAATTCGTCATCGGA GACTACAAGGTCACGACGTCAGAAAGTATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAAC AGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACCG AGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGAGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGG GAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGAGGTCACATCGTCAAGAAGACACA GAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGA TCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATA CAGCGTCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAA CTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAAGAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGTCTCTGGGAAGC AAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAAC TGGAAAACCGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGC ACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAAGCC CGGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCTGTTCTGCAACAGCACAAGCACTGCTGGACAGAAATCCT GAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAGGTCCTGAG CGCATACAACAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCA CACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGA TACACAAGCACAAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGA AACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAAGCCGAGAAAGAAAGAA GGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAA GATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAACACCTGTCTAAAAAACAT AAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAGAACCTCGAG
507	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCA CAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATC AAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAAGACTGAA GAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAATCTGTACCTGCAGGAAATCTTCA GCAACGAAATGGCAAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACcggCTGGAAGAAGTCTGCTGGTCGAA GAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGA AAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCAGACAGCAAGGCAGACCTGA GACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGAC CTGAACCCCGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATCAACACAGCT GTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCTCGACGCAAGACTG AGCAAGAGCAGAAGACTGGAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGACTGT TCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCA GAAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCAC AGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCT GAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGA GATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGA AAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGAGGAG CAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGAGCGAACAGAGAA CTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTTCGACAACGGAAGCAT CCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGT TCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGA CCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTGCGATGGATGACAAGAAAGATGGAGCGAACAGACACACC GTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAA ACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGTCTGCGGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTC ACAGTCTACAACGAAGTACAAAGGTCAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTCT GAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGTCACAGCTCA AGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTC GAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGA CTTCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTTCG

	AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATG AAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAA TCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGA AATTCATGCGACTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGT CAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAG AAGGGAATCCTGCGAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGCTGCTGAACGAAGACACAAGC CGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGC AGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAAGTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACA CCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAaAACCGAAGAG ACATGTACGTCGACCAGGAAGTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTC CCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACA GAGGAAAGAGCGACAACGTCCTGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAAGTACTGGAGACA GCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGA GGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCAAGCAAGACAGATCA CAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTG ATCAGAGAAGTCAAGGTCATCAGCTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCA GTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAATACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCG TCGGAACGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAGCGAATTCGCTGAACGAGACTACAAAG GTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTA CTTCTTACAGCAACATCATGAATTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAG AAAGAGACCGCTGATCGAAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGAG TTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCA GACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCTGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGA AAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCC TGGTCGTCGCAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAAGTCTGGG AATCACAATCATGGAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAAGGAT ACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCTGTTCGAAGTGGAAAAC GGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAGTGCAGAAGGGAAACGAAGTGGCACTGCCGA GCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGAC AACGAACAGAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGAT CAGCAATTACGCAAGAGATCATCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAGGTCGACGCGCATACA ACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACTGACA AACCTGGGAGCACCCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAG CACAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCAGGACTGTACGAAACAAGAA TCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAAAGCCGAAGAAGGAAAGGCTAG
508	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCA CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGTGCTGGGCAACACCGACAGACACAGCAT CAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAGACTG AAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTT CAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAGGAGACTTCTCGGTG GAGGAGGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACC ACGAGAAGTACCCCAACATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGA CCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCAGAGGCCACTTCTGATCGAGG GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACA CCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCTGAGCGCC AGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAGC GCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCTGACCCCCAATTCAAGAGCAACTTCGAC CTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACCTGGACCTGACATCGAC TGGCCAGATCGGCGACCACTACGCCGACCTGTTCTGCGCCGCAAGAACCTGAGCGACGCCAT CCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAGGCCCTGAGCGCCAGCATG ATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGAAGACAGCAGC TGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTGACCCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGAC GGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTTCATCAAGCCCATCTGGAGAAGATGACACGGCA CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAA CGGCAGCATCCCCACCATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGACAGGAGGAC TTCTACCCCTTCTGAAGGACAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAATCCCCTAC TACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGCAGATTGCGCTGGATGACCAAGAAGAGCGAGGAGA CCATCACCCCTGGAATTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTCATCGA GAGAATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGT ACGAGTACTTCACCGTGTAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAA GCCCCCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGA AAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGG AGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGAT CATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTG ACCCTGACCCTGTTTCGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGACGCCACTGCCCCACTGTT CGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACCGCTGGGGCAGACTGAGCAGA AAGCTGATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAGAGCG ACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATGCACTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGAC ATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGACACATCGCAACCTGGCC GGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGACGAGCTGGTGAAG GTGATGGGCAGACACAAGCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCC AGAAGGGCCAGAAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGG

	GCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCT GTACTACCTGCAGAACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACAGACTGAGC GACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGG TGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAA GAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGAGAAAGTTTCGACA ACCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGAGAC AGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCAGAATGAACAC CAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTG GTGAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAACAATACCACCACGC CCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGCCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAG AGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGAGCGAGC AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTCAAGACC GAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCG GCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAGCTGAGTGCCTGCCCCA GGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCC AAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGAAAGAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCT TCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCA AGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGAGAAAGCAGCTTGCAGAA GAACCCCATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAG CTGCCCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGAATGCTGGCCAGCGCCGGCG AGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCTGTACTGGCCAG CCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAG CACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTTCAGCAAGAGAGTATCCTGGC CGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCCATCAGAGAG CAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGT ACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCT GATCCACAGAGCATCACCGCCTGTACGAGACCAAGTGCACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGCAG GGCGGCGGCGAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGTGA
509	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCTGTGTGTGCTGTGCAGGCCTTATTC GGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCT GGGCCGTGATACCCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACCGCA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAG GCCACCAGACTGAAGAGAACC GCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAGAACAAGTCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAG AGCTTCTGTGGAGGAGGACAAGAAGCAGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACG AGGTGGCTTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAGTGGTGGACAGCAC CGACAAGGCCGACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCAGAGGCCACT TCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGT GCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCC ATCCTGAGCGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGCG AGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCTGACCCCAACTTCAA GAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGAC CTGGACAACCTGCTGGCCGAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACC TGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCAACCAAGGCCCTT GAGCGCCAGCATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTG GTGAGACAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACG CCGGCTACATCGACGGCGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCTCATCTGGA GAAGATGGACGGACCCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGCTGCTGAGAAGCCAG AGAACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGA GAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACC TTCAGAATCCCCTACTACGTGGGCCCTTGGCCAGAGGCAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCA GAAAGAGCGAGGAGACCATACCCCTTGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCG CCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCAAGAAGGCTGCTGCC AAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTACCCTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGAC CGAGGGCATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCT GTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGT GCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCAACGCCAGCTGGGCACTTACCA CGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTG GAGGACATCGTGTGACCTGACCTGTTTCGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGA CCTACGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACCGGCTG GGGCGAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGGACCTCTG GACTTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCT GACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCA CATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTG GACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCAGACACAAGCCCCGAGAACATCGTATCGAGCTGGCAGAG AGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAGAGAATCGAGGAGGG CATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAAC GAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACA TCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCTGAAGGACGACAG CATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAAGCAGAGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGC GAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCC AGAGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCG

	GCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGA CAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACC CTGAAGAGCAAGCTGGTGGAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAA CAACTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAG TACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAGAAAGATGAT CGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGA ACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACC AACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAGGTG CTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGG AGAGCATCCTGCCCCAAGAGAAAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCCAA GAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGA GAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGA AGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTGTGAGGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGCAACAGACAGAGACA GCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCC CGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCAGCACCAAGGAGGTGC TGGACGCCACCCCTGATCCACCAGAGCATACCCGGCCTGTACGAGACCAGAATCGACCTGAGCCA GCTGGGCGGCGACGGCGGCGCAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGTGACTAGCCATCACATTT AAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTT TTTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCT CTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAGAACCTCGAG
510	ATGGACAAGAAGTACTCTATCGGTTTGGACATCGGTACCAACTCTGTCTGGTGGGCCGTATCAC CGACGAATACAAGGTCCCATCTAAGAAGTTCAAGGTCTTGGGTAACACCGACAGACACTCTATCAA GAAGAACTTGATCGGTGCCTTGTGTTGCGACTCTGGTGAACCCGCCGAAGCCACCAGATTGAAGA GAACCGCCAGAAAGATACACCAGAAAGAAACAGAATCTGCTACTTGCAAGAAATCTTCTCTA ACGAAATGGCCAAAGTTCGACGACTCTTCTTCCACAGATTGGAAGAATCTTCTTGGTCTGAAGAAG ACAAGAAGCACGAAAGACACCCAATCTTCGGTAACATCGTCGACGAAAGTCTACCCAGCAAAAG TACCCAACCATCTACCACTTGAGAAAGAAGTTGGTCGACTCTACCGACAAGGCCGACTTGAGATT GATCTACTTGGCCTTGGCCACATGATCAAGTTTCAGAGGTCACTTCTTGATCGAAGGTGACTTGAA CCCAGACAACCTGACGTCGACAAGTTGTTTCATCCAATTGGTCCAAACCTACAACCAATTGTTCTGA AGAAAACCAATCAACGCCTCTGGTGTGACGCAAGGCCATCTGTCTGCAGATTGTCTAAGA GCAGAAGATTGGAAGAACTTGATCGCCCAATTGCCAGGTGAAAAGAAGAACCGTTTGTTCGGTAAC TTGATCGCCTTGTCTTTGGGTTTGACCCCAAACCTCAAGTCTAACTTCGACTTGGCCGAAGACGCC AAGTTGCAATTGTCTAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAACCTTGTGGCCCAAAATCGGTGA CCAATACGCCGACTTGTCTTGGCCGCCAAGAAGTGTCTGACGCCATCTTGTGTCTGACATCTT GAGAGTCAACACCGAAATCACCAGGCCCATTTGTCTGCCTCTATGATCAAGAGATACGACAAC ACCACCAAGACTTGACCTTGTGAAGGCCTTGGTCAGACAACAATTGCCAGAAAAGTACAAGGAAA TCTTCTTCGACCAATCTAAGAACGGTTACGCCGGTTACATCGACGGTGGTGCCTCTCAAGAAGAAT TCTACAAGTTCATCAAGCCAATCTTGAAAAGATGGACGGTACCGAAGAATTGTTGGTCAAGTTGA ACAGAGAAGACTTGTGAGAAAGCAAGAAGCTTCGACAACGGTTCTATCCCAACCAAAATCCACT TGGGTGAATTGCACGCCATCTTGAGAAGACAAGAAGACTTCTACCCATTCTTGAAGGACAACAGA GAAAAGATCGAAAAGATCTTGACCTTCAGAATCCCACTACTACGTCGGTCCATTGGCCAGAGGTAAC AGCAGATTCCGCTGGATGACCAAGAACTCTGAAGAAACCATCACCCCACTGGAACCTCGAAGAAGT CGTCGACAAGGGTGCTCTGCCCAATCTTCAAGTGAAGAAATGACCAACTTCGACAACTTGTG CAAACGAAAAGGTCTTGCCAAAGCACTCTTGTGTACGAATACTTCACCGTCTACAACGAATTGA CCAAGGTCAAGTACGTACCGAAGGTATGAGAAAGCCAGCCTTCTGTCTGGTGAACAAAAGAAG GCCATCGTCGACTTGTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTACCCGTCAAGCAATTGAAGGAAGACTA CTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACTCTGTGCAAACTCTGTGTGTCGAAGACAGATTCAACGCCCTC TTTGGGTACCTACCAGCACTTGTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTTGAGACAACGAAAAA CGAAGACATCTTGAAGACATCGTCTTGACCTTGACCTTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGA AAGATTGAAGACCTACGCCCACTTGTTCGACGACAAGGTATGAAGCAATTGAAGAGAAGAAGAT ACACCGGTTGGGGTAGATTGAGCAGAAAGTTGATCAACGGTATCAGAGACAAGCAATCTGGTAAG ACCATCTTGGACTTCTTGAAGTCTGACGGTTTCGCCAACAGAAAATTCATGCAATTGATCCACGAC GACTCTTTGACCTTCAAGGAAGACATCCAAAAGGCCCAAGTCTCTGGTCAAGGTGACTCTTTGCAC GAACACATCGCCAACTTGGCCGGTTCTCCAGCCATCAAGAAGGGTATCTTGCAACCGTCAAGGT CGTCGACGAATTGGTCAAGGTATGGGTAGACACAAGCCAGAAAACATCGTATCGAAATGGCCA GAGAAAACCAAAACCCAAAAGGGTCAAAAGAACAGCAGAGAGAAAGATGAAGAAATCGAAGAA GGTATCAAGGAATTGGGTTCTCAAATCTTGAAGGAACACCCAGTCGAAAACACCCAATTGCAAAAC GAAAAGTTGTACTGTACTACTTGCAAAACGGTAGAGACATGTACGTCCAGCAAGAATTGGACATC AACAGATTGTCTGACTACGACGTGACACATCGTCCCACAATCTTCTTGAAGGACGACTCTATC GACAACAAGGTCTTGACCAGATCTGACAAGAACAGAGGTAAGTCTGACAGCTCCCACTCAAGA AGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAATTGTTGAACGCCAAGTTGATCACCCAAAGAAA GTTTCGACAATTGACCAAGGCCGAAAGAGGTGGTTGTCTGAATTGGACAAGGCCGGTTTCATCA AGAGACAATTGGTTCGAAACAGACAAATCACCAAGCACGTGCCCCAAATCTTGGACAGCAGAATG AACACCAAGTACGACGAAAACGACAAGTTGATCAGAGAAGTCAAGGTATCAACCTTGAAGTCAAG TTGGTCTGACTTCAGAAAGGACTTCCAATTTACAAGGTGAGAGAAATCAACAACTACCCACAC GCCACGACGCCTACTTGAACGCCGTGCTCGGTACCGCCTTATCAAGAAGTACCCAAAGTTGGA ATCTGAATTCTGCTACGGTGACTACAAGGTCTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGTCTGAACA

	AGAAATCGGTAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCTAACATCATGAACCTCTTCAAGACCGA AATCACCTTGGCCAACGGTGAAATCAGAAAGAGACCATTGATCGAAACCAACGGTGAAACCGGTG AAATCGTCTGGGACAAGGGTAGAGACTTCGCCACCGTCAGAAAGGTCTTGCTATGCCACAAGTC AACATCGTCAAGAAGACCGAAGTCCAAACCGGTGGTTTCTCTAAGGAATCTATCTTGCCAAAGAGA AACTCTGACAAGTTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCAAAGAAGTACGGTGGTTTCGACTC TCCAACCGTCGCCTACTCTGTCTTGCTCGTCCGAAGGTCGAAAAGGGTACAGTCAAGAAAGTTGA AGTCTGTCAAGGAATTGTTGGGTATCACCATCATGAAAAGATCTTCTTTCGAAAAGAACCCAATCG ACTTCTTGGAAGCCAAGGGTTACAAGGAAGTCAAGAAGGACTTGATCATCAAGTTGCCAAAGTACT CTTTGTTTGAATTGGAAAACGGTAGAAAGAGAATGTTGGCCTCTGCCGGTGAATTGCAAAAGGGT AACGAATTGGCCTTGCCATCTAAGTACGTCAACTTCTTGACTTGGCCTCTCACTACGAAAAGTTG AAGGGTTCTCCAGAAGACAACGAACAAAAGCAATTGTTCTGTCGAACAACACAAGCACTACTTGGAC GAAATCATCGAACAAATCTCTGAATTCTCTAAGAGAGTCATCTTGGCCGACGCCAATTGGACAAG GTCTTGTCTGCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCAATCAGAGAACAAGCCGAAAACATCATCCA CTTGTTACCTTGACCAACTTGGGTGCCCGCCCTTCAAGTACTTCGACAGCCATCAAGTCAACA GAAAGAGATACACCTCTACCAAGGAAGTCTTGACGCCACCTTGATCCACCAATCTATCACCGGTT TGTACGAAACCAGAATCGACTTGTCTCAATTGGGTGGTGACGGTGGTGGTTCTCCAAAGAAGAAG AGAAAGGTCTAA
511	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCA CCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCAT CAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCTGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCT GAAGCGGACCGCCCGCGCGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCAGGATCTGCTACCTGCAGGAGAT CTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCTTCTCTGG TGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGCGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTA CCACGAGAAGTACCCCAACCTCTACCACTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGCC GACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGGCCACTTCTGATCGA GGGCGACCTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTATCCAGCTGGTGACAGCTAC AACAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCCTCCGGCGTGAGACGCAAGGCCATCTCTCCG CCCGGCTGTCCAAGTCCCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGA ACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCGTGACCCCAACTTCAAGTCCAATTC GACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACC TGCTGGCCAGATCGGCGACCACTACGAGGAGTGTCTGCGCCGAGGAGGAGTGTCCGACGC CATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAGGCCCCCTGTCCGCTCC ATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGC AGCTGCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACAGTCCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATC GACGGCGCGCCTCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCTGGAGAAGATGGACG GCACCGAGGAGCTGTGGTGAAGCTGAAGCGGGAGGACCTGCTCGGAAGCAGCGACCTTCG ACAACGGCTCCATCCCCACAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGA GGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCC CCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCAACTCCCGTTCCCTGGATGACCCGGAAGTCCGA GGAGACCATACCCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGCCGCTCCCGCAAGCTCTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTGCCAACGACTCCCT GCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATG CGGAAGCCCGCCTTCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGACCTGCTGTTCAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACTC CGTGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTG AAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT GCTGACCTGACCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCAC CTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGCGGTGACACCGCTGGGCCGCTG TCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGA AGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTCATGACGTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAG GAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAAC CTGGCCGGCTCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGTGGTGACAGCTG GTGAAGGTGATGGGCGGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCGGGAGAACCAG ACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAG GAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGC TGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACAGGAGCTGGACATCAACCG GCTGTCCGACTACGACGTGGACACATCGTGCCCCAGTCTTCTGAAGGACGACTCCATCGACA ACAAGGTGCTGACCCGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGT GGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATACCCAGCGGAAG TTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCA AGCGGAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCAACGACGACGTGGCCGAGATCCTGGACTCCGGAT GAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATACCCCTGAAGTCC AAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCA CCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGACCCGCTGATCAAGAAGTACCCCAAG CTGGAGTCCGAGTTCTGTACGGCGACATAAGGTTGACGACGTGACGAGTCCGCAAGT CCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACCTTCTC AAGACCGAGATACCTTGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGC GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCCGCCACCGTGGCGAAGGTGCTGTCC ATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGCGGCTTCTCAAGGAGTCCA TCTGCCCCAAGCGGAACCTCCGACAAGTGTATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGTA CGGCGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGG CAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGTGTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCC

	TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGA TCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTC CGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCTGTAC CTGGCCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTTCG TGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGT GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCCCTACAACAAGCACCAGGACAAAGCCC ATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCG CCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGAC GCCACCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCAGCTGG GCGGCGACGGCGGGCGGCTCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
512	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCA CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT CAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCGTAGGCCACCCGGCT GAAGCGGACCGCCCGCGCGGTACACCGCGGGAAGAACCAGTCTGCTGACGACGAGAT CTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTG GTGGAGGAGGACAAGAAGCAGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCT ACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGC CGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCTGGGGCCACTTCTGTATC GAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCT ACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAG CGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAA GAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAAC TTTCACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGACGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACA ACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCAAGAACCTGAGCGA CGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAGGCCCCCTGAGCGCC AGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGG AGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAGCCTGACCCGCTG CATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATG GACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACC TTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC AGGAGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGG ATCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGCAACAGCCGGTTCGCTGGATGACCCGGAAGA GCGAGGAGACCATACCCCTTGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCGAGA GCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCA CAGCCTGCTGTACGAGTACTTACCCTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGG GCATGCGGAAGCCCGCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAA GACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTC GACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGAC CTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGG ACATCGTGCTGACCCCTGACCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGG CCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGA CTTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCAGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACA TCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGG CGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTATCGAGATGGCCCGGGA GAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGG CATCAAGGAGTGGGAGCGCAGATCCTGAAGGAGCACCCTGTGAGAACACCCAGCTGACGAAAC GAGAAGCTGTACTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTGGACA TCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACACATCGTGCCCCAGAGCTTCTGAAGGACGACAG CATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCAGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCAG CGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAAGTACTGGCGGACGTGCTGACGCCAAGCTGATCACC CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCTGAGCGGGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGGCC GGCTTCATCAAGCGGACGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAGCAGCTGGCCAGATCCTGG ACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCAC CCTGAAGAGCAAGCTGGTGAAGGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATC AACAACCTACCACACGCCCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGACCCGCCCTGATCAAGA AGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGAT GATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTACAGCAACATCA TGAACCTTCTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGA GACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGACAAGGGCCGGGACTTCGCGACCTGCGGAA GGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGC AAGGAGAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACC CCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGGTGGTGGTGGCCAAGGT GGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGACCATCATCGAGTGGAG CGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGA AGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGAT GCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGA CTTCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAAG CAGCTGTTCTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCA GCAAGCGGGTATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCTACAACAAGCACCG GGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCTGACCAACCTGGGC

	GCCCCGCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACC AAGG AGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCT GAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
513	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCA CCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCAT CAAGAAGAACCTGATCGGGCGCCCTGCTGTTCCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCT GAAGCGGACCGCCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGATCTGCTACCTGCAGGAGAT CTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCTTCTCTGG TGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTA CCACGAGAAGTACCCCAACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCAGACAAGGCC GACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGGCCACTTCTGATCGA GGGCGACCTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTAC AACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCG ACCGGCTGTCCAAGTCCCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCATCTGCGCCAGCAAGGA ACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGTCCAACCTC GACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACC TGCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGC CATCTGTGTCCGACATCTGCGGGTGAACACCGAGATCAACCAAGGCTGTCGCGCTCTGCGCTCC ATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGGGCGAGC AGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATC GACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACG GCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTCGGAAGCAGCGGACCTTCG ACAACGGCTCCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGAGGA GGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCC CCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCCGGTTGCGCTGGATGACCCGGAAGTCCGA GGAGACCATACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCTCCGCCAGTCTCTTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCGGAGCCCT GCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATG CGGAAGCCCGCCTTCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCCTGGACCTGCTGTTCAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACTC CGTGAGATCTCCGGCTGGAGGACCGGTTCAACGCCTCCCTGGCACCTGCTGTTCAAGACCA AAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT GCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGACCGGCTGAAGACCTACGCCAC CTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTG TCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCTGGACTTCTTGA AGTCCGACGGCTTCGCGCAACCGGAACCTTCATGACGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAG GAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAAC CTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTG GTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCCGAGAACATCGTATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCAG ACCACCGAGAAGGGCCAGAAGAACCTCCCGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGCGGCATCAAG GAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGC TGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTGGACATCAACCG GCTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTCCCCAGTCTTCTTGAAGGACGACTCCATCGACA ACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGT GGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCGGACGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAG TTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCCGGCTTCATCA AGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACTCCCGGAT GAACCAAGTACGACGAGAAGCAGCAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGTACGCTGAACTCCAGTCC AAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCA CCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAG CTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGT CCGAGCAGGAGATCGGAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTACTCCCAACATCATGAACCTCTTC AAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCTCCATCGATCGAGACCAACCGGC GAGACCGGCGAGATCGTGTGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGGGAAGGTGCTGTCC ATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCA TCCTGCCAAGCGGAACCTCCGACAAGCTGATCGCCCGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTA CGGCGGCTTCGACTCCCCCACCCTGCGCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGG CAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCTCC TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGA TCATCAAGCTGCCAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGAAGCGGATGCTGGCCTC CGCCGGCAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCCAAGTACGTAACCTTCTGTAC CTGGCCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTTCG TGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGT GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCCATAACAAGCACCGGGACAAGCCC ATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACTGTTTACCCTGACCAACCTGGCGCCCCCGCCG CCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGAC GCCACCCTGATCCACAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCGGATCGACCTGTCCAGCTGG GCGGCGACGGCTCCGGCTCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCTCCCCAAGAAGAAGC GGAAGGTGGACTCCGGCTGA
514	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCA CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT CAAGAAGAACCTGATCGGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCT

	GAAGCGGACCGCCCGCGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGAT CTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTG GTGGAGGAGGACAAGAAGCAGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCT ACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGC CGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGCACTTCTGATC GAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCAGCTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGCCT ACAACCAGCTGTTGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAG CGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAA GAACGGCCTGTTGCGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAAC TTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACA ACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCACTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGA CGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGCTGAACACCGAGATCACCAGGCCCCCCCTGAGCGCC AGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCAGC AGCAGTGGCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAGCTGAGCCGCGCT CATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATG GACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACC TTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC AGGAGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCAGAAGCTGAGCCGCGCT ATCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGCAACAGCCGTTGCGCTGGATGACCCGGAAGA GCGAGGAGACCATACCCCTTGAACCTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCGAGA GCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCA CAGCCTGCTGTACGAGTACTTACCCTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGG GCATGCGGAAGCCCGCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGAGCTGCTGTTCAA GACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTC GACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGAC CTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGG ACATCGTGCTGACCCCTGACCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA CGCCACCTGTTGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGG CCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGA CTTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCAGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGGAGCCTGACGACGACCTGA TCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGA CGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTATCGAGATGGCCCGGA GAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGG GATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGAAGAC GAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACA TCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCTGAAGGACGACAG CATCGACAACAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCAG CGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCGGACGTGCTGAACGCCAAGCTGATCACC CAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGCCGAGCGGGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGGCC GGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCAGCTGGCCAGATCCTGG ACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCAC CCTGAAGAGCAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATC AACAACCTACCACACCGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGACACCCGCTGATCAAGA AGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGAT GATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTACAGCAACATCA TGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGCGGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGA GACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGCTGCTGCCACCTGTCGGAA GGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGC AAGGAGAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACC CCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGT GGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCCATCAGTGAG CGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGA AGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGAT GCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGA CTTCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAG CAGCTGTTCTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCA GCAAGCGGCTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCTACAACAAGCACCG GGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGC GCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACAGAGCATACCGGCCCTGACGAGCCGGATCCGACCT GAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCAGCGGCGAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCAGCC CCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACAGCGGCTGA
515	ATGGAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCA CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCAT CAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCT GAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGAT CTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTG GTGGAGGAGGACAAGAAGCAGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCT ACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGC CGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGCACTTCTGATC GAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCAGCTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCT ACAACCAGCTGTTGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAG CGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAA GAACGGCCTGTTGCGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAAC TTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACA ACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCACTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGA CGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGCTGAACACCGAGATCACCAGGCCCCCCCTGAGCGCC AGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCAGC AGCAGTGGCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAGCTGAGCCGCGCT CATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATG GACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACC TTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC AGGAGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCAGAAGCTGAGCCGCGCT ATCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGCAACAGCCGTTGCGCTGGATGACCCGGAAGA GCGAGGAGACCATACCCCTTGAACCTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCGAGA GCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCA CAGCCTGCTGTACGAGTACTTACCCTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGG GCATGCGGAAGCCCGCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGAGCTGCTGTTCAA GACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTC GACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGAC CTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGG ACATCGTGCTGACCCCTGACCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA CGCCACCTGTTGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGG CCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGA CTTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCAGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGGAGCCTGACGACGACCTGA TCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGA CGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTATCGAGATGGCCCGGA GAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGG GATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGAAGAC GAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACA TCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCTGAAGGACGACAG CATCGACAACAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCAG CGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCGGACGTGCTGAACGCCAAGCTGATCACC CAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGCCGAGCGGGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGGCC GGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCAGCTGGCCAGATCCTGG ACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCAC CCTGAAGAGCAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATC AACAACCTACCACACCGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGACACCCGCTGATCAAGA AGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGAT GATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTACAGCAACATCA TGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGCGGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGA GACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGCTGCTGCCACCTGTCGGAA GGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGC AAGGAGAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACC CCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGT GGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCCATCAGTGAG CGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGA AGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGAT GCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGA CTTCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAG CAGCTGTTCTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCA GCAAGCGGCTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCTACAACAAGCACCG GGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGC GCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACAGAGCATACCGGCCCTGACGAGCCGGATCCGACCT GAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCAGCGGCGAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCAGCC CCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACAGCGGCTGA

	ACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAA GAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAAC TTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACA ACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCACTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCAAGAACCTGAGCGA CGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGTGAACACCGAGATCACAAGGCCCCCTGAGCGCC AGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCG AGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTA CATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATG GACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTCGGGAAGCAGCGGACC TTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC AGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGG ATCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGCAACAGCCGGTTCGCTGGATGACCCGGAAGA GCGAGGAGACCATACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGAGACCTGACGCGCCGAG GCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCA CAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGG GCATGCGGAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGACCTGCTGTTCAA GACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTCTTC GACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGAGGAGCCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGAC CTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGAGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGG ACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGCGGTACACCGCTGGG CCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGA CTTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACA TCGCCAACCTGGCCGCGAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGA CGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCGGCAACAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGTGGCCCGGGA GAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGG CATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGAGAACACCCAGCTGCAGAAC GAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACAGGAGCTGGACA TCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCATCGTGCCCCAGACCTGAGGACGACAG CATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCAGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCAG CGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACC CAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGGCC GGCTTCATCAAGCGGAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACAAGCAGCTGAGCCGAGCTGGG ACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCAC CCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATC AACAACCTACCACACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGACCCGCTGATCAAGA AGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACTGCGGAAGAT GATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGCCACCGCCAAGTACTTCTTACGACCAACATCA TGAACCTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGA GACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAA GGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGC AAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGGACTGGGACC CCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGTGTTGGTGGCCAAGGT GGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAG CGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGA AGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGACCGGAGGAGTGGAGT GCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAA CTTCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAG CAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCA GCAAGCGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGAGACAAGGTGCTGAGCGCTACAAGGAGTGGACC GGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGC GCCCCGCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAGG AGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCTGTACGAGACCCGGATCGACCT GAGCCAGCTGGGCGGCGACTGA
516	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACAAGAAGUACUCCA UCGGCCUGGACAUCCGACCAACUCCGUGGGCUGGGCCUGAUACCCGACGAGUACAAGGUG CCCUCCAAGAAGUUCAGGUGUCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUAAGAAGAACCUGAUC GGGCGCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCCG GCGCGGUACACCCGCGGAAGAACCAGGUAUCGUACCUAGGAGAGUUCUACGAGGAGGAGGACA GGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUCCACCGGCUUGGAGGAGUCCUUCUGGUGGAGGAGGACA AGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGU ACCCCACCAUCUACCACCUUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGC UGAUCUACCUGGCCUUGGCCACAAGUUCUCCGGGGCCAGUCCUUCAGGAGGAGGAGGAGC CUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCUACUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAG CUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCG GCUGUCCAAGUCCCGGCGGCGUGGAGAACCUGAUCGCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAAGC GCCUGUCCGGAACCUGAUCGCCUUGCCUUGGCCUGACCCCCAACUUCAGUCCAGGAGGAGC ACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAAGGACACCUACGACGACGACCUAGGACCC UGCUGGCCCAGAUCCGCGACAGUACGCCGACCUGUCCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGAC GCCAUCCUGCUGUCCGACAUCUCCGCGGUGAACACCGAGAUACCAAGGCCCCCGUCCGCC

	UCCAUGAUAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCUUGGUGCG GCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUUUUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGG CUACAUCGACGGCGGCCUCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUAUCAAGCCAUCCUGGAGAA GAUGGACGGCACCAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGC GGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGC GGCGGCAGGAGACUUCUACCCUUCUUGAAGGACAACCGGGGAGAAGAUUGAGAAGAUCCUGA CCUUCGGAUCCCUACUACGUGGGCCCCUUGGCCCGGGGCAACUCCGGUUCGCCUGGAUG ACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGC CUCCGCCAGUCCUUAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGU GCUGCCCAAGCACUCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAA GUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCCGCCUUCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCCG UGGACCUGCUGUUAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUA AGAAGAUUGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUUCCGGCGUGGAGGACCGGUUAACGCCUCC CUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCAAGGACAAGGACUCCGCAACGAGGAG AACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAU CGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCG CGGCGGUACACCGGCUUGGGGCCGCGUGUCCCGGAAGCUGAUAACGGCAUCCGGGACAAGC AGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCUUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCG AGCUGAUCCACGACGACUCCUGACCUUAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGGUGUCCGGCC AGGGCGACUCCUGCAGGAGCACAUCGCCAACCUUGGCCGCGUCCCCGCCAUCAAGAAGGGCA UCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCCGAG AACAUUGAUCGAGAUUGGCCGGGAGAACCAAGACCCAGAACGGGCCAGAAGAACUCCCGG GAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUAAGGAGCUGGGCUCCAGAUCCUGAAGGAGCA CCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUUACUACCGCAGAACGGCCG GGACAUGUACGUGGACGAGCUGGACAUAACCGGCGUGUCCGACUACGACGUGGACCACAU CGUGCCCCAGUCCUUCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAA GAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGGCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGUAGAAAGAACUACUG GCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUAACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGA GCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGCGCUUCAUAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCC GGCAGAUACCAAGCACGUGGCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACCAAGUACGACGAGAG ACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUAACCCUGAAGUUAACUUCUUAAGACCGAGAU GGAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCCACGCCACGACGCCU ACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCUGAUCAAGAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUC GUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUAGUCCGAAGUCCGAGCAGGAGAU CGGCAAGGCCACCGCAAGUACUUCUUAUCUCCAACAUAUGAACUUCUUAAGACCGAGAU CACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCG AGAUCGUGUGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAG GUGAACAUUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCC AAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGCG UUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUC CAAGAAGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUACCAUAUGGAGCGGUCCUCCUUGCA GAAGAACCCCAUCGACUUCUUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAU CAAGCUGCCCAAGUACUCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCG CCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCCUCC CUGGCCUCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUC GUGGAGCAGCACAAGCACUACCUUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUUCCGAGUUCUCCAAGCGG GUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUUGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAG CCCAUCCGGGAGCAGGCGGAGAACAUCAUCCACCUUACCCUAGCAACCGGCGGCCCC GCCGCCUUAAGUACUUCGACACCAUCGACCGGAAGCGGUACCUCCACCAAGGAGGUG CUGGACGCCACCCUGAUCCACAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCGGGAUCGACCGUCC CAGCUGGGCGGCGACGGCGGCGGCCUCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUGACUAGCACCAGC CUCAAGAACCCGAAUGGAGUCUUAAGCUACAUAUACCAACUUAACUUAACUUAACUUAUG UCCCCAAAUAGUAGCCAUUCGUACUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUACAUUCUCUCG AG
--	--

1.2 Diseño de guía de *KLKB1* humana y diseño de guía de *KLKB1* humana con homología con *Macaca fascicularis*

[00591] Los ARN guía se diseñaron para *KLKB1* humana (ENSG00000164344) dirigidos a las regiones codificantes de proteínas dentro de los Exones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15. Los ARN guía también se diseñaron para *KLKB1* de *Macaca fascicularis* (ENSMFAT00000002355) dirigidos a las regiones codificantes de proteínas dentro de los Exones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15. Los ARN guía y las coordenadas genómicas diana correspondientes se proporcionan más arriba

(Tabla 1).

1.2. Administración de Cas9 (mARN/proteína) y ARN guía *in vitro*

1.2.1. Preparación de células, administración *in vitro*

[00592]Se descongelaron hepatocitos primarios humanos (PHH) (Gibco, Lotes Hu8296, Hu8300 y Hu8284, Hu8296, HU8290 y HU8317) y hepatocitos primarios de *Macaca fascicularis* (PCH) (Gibco, Lotes Cy367, Cy400 y 10281011) y se volvieron a suspender en medio para descongelar hepatocitos con complementos (Gibco, N.º de cat. CM7500), seguido de centrifugación. Se descartó el sobrenadante y las células peletizadas se volvieron a suspender en medio para colocar hepatocitos (William's E Medium (Invitrogen, N.º de catálogo A1217601) con dexametasona + suplemento de cóctel, contenido de FBS y complementos de colocación en placas (Gibco, N.º de cat. CM3000)). Las células se contaron y se colocaron en placas de 96 cavidades recubiertas con Bio-coat collagen I (ThermoFisher, N.º de catálogo 877272) a una densidad de 30.000-35.000 células/cavidad para PHH y 40.000-45.000 células/cavidad para PCH. Se permitió que las células colocadas en placas se asienten y adhieran durante 4-6 horas en una incubadora de cultivos tisulares a 37 °C y una atmósfera de 5 % de CO₂. Después de la incubación, se revisaron las células para detectar la formación de monocapas y se las lavó una vez con medio de cultivo de hepatocitos (William's E Medium con complementos de mantenimiento (Gibco, N.º de cat. CM4000)) o medio Cellartis Power Primary HEP (Takada, N.º de cat. Y20020).

[00593]Los ARN guía dirigidos a *KLKB1* se administraron a las células mediante el uso de un sistema liposomal con proteína Cas9, por ejemplo, o mediante el uso de una formulación de LNP que comprende mARN de Cas9 y ARN guía como se describe con mayor detalle más adelante.

1.2.2. Transfección de RNP

[00594]Se utilizó transfección de RNP con un sistema liposomal (Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, N.º de cat. 13778150) y reactivos CRISPR (ARN guía, proteína Cas9) para transportar un complejo de ribonucleoproteína (RNP) a través de la membrana celular.

[00595]Para los estudios que utilizan guía dual (dgARN), el crARN y trARN individuales se hibridaron previamente al mezclar cantidades equivalentes de reactivo e incubar a 95 °C durante 2 min y enfriar hasta temperatura ambiente. El gARN que consiste en crARN y trARN prehibridados se agregó a la proteína Spy Cas9 en el amortiguador de reacción (OptiMem) para formar un complejo de RNP y el complejo

de RNP formado se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El complejo de RNP se diluyó con OptiMem para preparar una solución de reserva de complejo de RNP de 1 μ M. Se preparó una mezcla de transfección que incluía Lipofectamine RNAiMAX y OptiMem y se incubó durante al menos 5 minutos. La mezcla de transfección se agregó al complejo de RNP y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y el agente de transfección (mezcla de transfección y complejo de RNP) se agregó a las células. Las células se transfectaron con el complejo de RNP que contenía proteína Spy Cas9 (10 nM), ARN guía/trazador individual (10 nM), y Lipofectamina RNAiMAX (1,0 μ l/cavidad) y OptiMem.

1.2.3. Electroporación de RNP

[00596]Se utilizó electroporación de RNP con el sistema de electroporación celular (kit Lonza 4D Nucleofector™ 816B0346) y reactivos CRISPR, gARN y proteína Cas9, para transportar un complejo de ribonucleoproteína (RNP) a través de la membrana celular.

[00597]Para los estudios que utilizan (dgARN, el crARN y trARN individuales se hibridaron previamente al mezclar cantidades equivalentes de reactivo e incubar a 95 °C durante 2 min y enfriar hasta temperatura ambiente.

[00598]Para los estudios que utilizan sgARN, se preparó una solución de reserva de sgARN 50 uM al incubar cantidades iguales de sgARN 100 uM en agua a 95 °C durante 2 min seguido de enfriamiento en hielo durante 5 minutos. El sgARN se agregó a la proteína Spy Cas9 en amortiguador de reacción (20 mM Hepes, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 % glicerol, DTT 1 mM a pH 7,5) para formar un complejo de RNP y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células se electroporaron (Amaxa™ Shuttle™ de 96 cavidades, N.º de cat. AAM-1001S) con el complejo de RNP que contenía la proteína Spy Cas9 (2uM) y gARN (4 uM) y amortiguador Lonza P3 (N.º de cat.: V4SP-3960). Después de la electroporación, se agregó medio para colocar hepatocitos (Will's E, N.º de cat. A12176-01) a la placa de células, el medio con células se transfirió a placas recubiertas de colágeno (Corning 354407). Después de 4 a 6 h, se cambió el medio a medio de mantenimiento (William's E (Gibco, N.º de cat. A12176-01, Lot 2039733) y complemento de mantenimiento (Gibco, N.º de cat. A12176-01, Lot 2039733) para la incubación durante la noche a 37 °C durante la noche.

1.2.4. Preparación de la formulación de LNP que contiene sgARN y mARN de Cas9

[00599]En general, los componentes de nanopartículas lipídicas se disolvieron en

100 % de etanol a diversas relaciones molares. Las cargas de ARN (por ejemplo, mARN de Cas9 y sgARN) se disolvieron en citrato 25 mM, NaCl 100 mM, pH 5,0, lo que dio como resultado una concentración de carga de ARN de aproximadamente 0,45 mg/ml. Las LNP usadas en los Ejemplos 2-10 contenían ((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato de lípido ionizable, también denominado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato), colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar de 50:38:9:3, respectivamente. Las LNP se formularon con una relación molar de amina lipídica con respecto a fosfato de ARN (N:P) de alrededor de 6, y una relación de gARN con respecto a mARN de 1:2 en peso. Los LNP usados en los Ejemplos 2-10 comprenden un mARN de Cas9 y un sgARN.

[00600]Las LNP se prepararon con una técnica de flujo cruzado a través de mezcla por impacto de chorros del lípido en etanol con dos volúmenes de soluciones de ARN y un volumen de agua. El lípido en etanol se mezcló a través de una cruz de mezclas con los dos volúmenes de solución de ARN. Una cuarta corriente de agua se mezcló con la corriente de salida de la cruz a través de una pieza en T en línea (ver la Figura 2 de WO2016010840). Las LNP se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente, y se diluyeron adicionalmente con agua (aproximadamente 1:1 v/v). Las LNP diluidas se concentraron mediante filtración de flujo tangencial en un cartucho de lámina plana (Sartorius, 100kD MWCO) y luego se cambió el amortiguador mediante el uso de columnas de desalación PD-10 (GE) en Tris 50 mM, NaCl 45 mM, 5 % (p/v) de sacarosa, pH 7,5 (TSS). Luego, la mezcla resultante se filtró con un filtro estéril de 0,2 µm. Los LNP finales se caracterizaron para determinar la eficiencia de encapsulación, el índice de polidispersidad y el tamaño de partícula promedio. La LNP final se almacenó a 4 °C o -80 °C hasta su próximo uso.

1.2.5. Lipofección de sgARN y mARN de Cas9

[00601]La lipofección de mARN de Cas9 y gARN utilizó formulaciones de lípidos mezcladas previamente. El reactivo de lipofección contenía ((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato de lípido ionizable, también denominado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato), colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar de 50:38:9:3, respectivamente. Esta mezcla se reconstituyó en 100 % de etanol, luego se mezcló con cargas de ARN

(por ejemplo, mARN de Cas9 y gARN) en una relación molar de amina lipídica con respecto a fosfato de ARN (N:P) de alrededor de 6,0. El ARN guía se sintetizó químicamente mediante proveedores comerciales o mediante el uso de técnicas de síntesis *in vitro* estándar con nucleótidos modificados. Se produjo un ORF de Cas9 de la Tabla 5 mediante IVT como se describe en WO2019/067910, ver, por ejemplo, el párrafo [00354], mediante el uso de un tiempo de reacción de IVT de 2 horas y purificación del mARN mediante precipitación de LiCl seguida de filtración de flujo tangencial. Las lipofecciones se llevaron a cabo con 3 % de suero de *Macaca fascicularis* y una relación de gARN con respecto a mARN de 1:1 en peso.

1.2.6. Transfección de LNP

[00602] Los sgARN modificados dirigidos a KLKB1 humana se formularon en las LNP como se describe en el Ejemplo 1. Los hepatocitos primarios humanos se colocaron en placas como se describe en el Ejemplo 1. Las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 48 horas antes del tratamiento con LNP. Las LNP se incubaron en un medio que contenía 3 % de suero bovino fetal (FBS) a 37 °C durante 10 minutos. Después de la incubación, el medio se aspiró de las células y la mezcla de medios con 3 % de FBS y la LNP se agregó a los hepatocitos. A las 72 a 96 horas posteriores a la transfección, se recolectó una porción de las células y se procesó para la secuenciación de NGS como se describe en el Ejemplo 1.

1.3. Aislamiento de ADN genómico

[00603] El PHH y el PCH transfectados se recolectaron a las 48 o 72 horas después de la transfección. El gADN se extrajo de cada cavidad de una placa de 96 cavidades mediante el uso de 50 µl/cavidad de solución BuccalAmp DNA Extraction (Epicentre, N.º de cat. QE09050) o el kit de extracción de ARN/ADN Zymo's Quick (N.º de cat. R2130) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Todas las muestras de ADN se sometieron a PCR y análisis de NGS posterior, como se describe en la presente.

1.4 Secuenciación de próxima generación ("NGS") y análisis de la eficacia de escisión en la diana

[00604] Para determinar cuantitativamente la eficacia de la edición en la ubicación diana en el genoma, se utilizó secuenciación de próxima generación para identificar la presencia de inserciones y eliminaciones introducidas por la edición de genes. Se diseñaron cebadores de PCR alrededor del sitio diana dentro del gen de interés (por ejemplo, *KLKB1*), y se amplificó el área genómica de interés. El diseño de las secuencias de cebadores se realizó de la manera estándar en el campo.

[00605]Se llevó a cabo una PCR adicional de acuerdo con los protocolos del fabricante (Illumina) para agregar química para secuenciación. Los amplicones se secuenciaron en un instrumento Illumina MiSeq. Las lecturas se alinearon con el genoma de referencia humano (por ejemplo, hg38) después de eliminar las que tenían bajas calificaciones de calidad. Los archivos resultantes que contenían las lecturas se mapearon al genoma de referencia (archivos BAM), donde se seleccionaron las lecturas que se superponían con la región diana de interés y se calculó la cantidad de lecturas de tipo silvestre en comparación con la cantidad de lecturas que contenían una inserción o eliminación ("indel").

[00606]El porcentaje de edición (por ejemplo, la "eficacia de edición" o "porcentaje de edición") se define como la cantidad total de lecturas de secuencia con inserciones o eliminaciones ("indeles") sobre la cantidad total de lecturas de secuencia, incluso de tipo silvestre.

[00607]Además, se utilizó un ensayo bioquímico (ver, por ejemplo, Cameron *et al.*, *Nature Methods*. 6, 600-606; 2017) para descubrir potenciales sitios genómicos secundarios escindidos por Cas9 que se dirige a *KLKB1*. El ADN genómico purificado (gADN) de las células se digirió con ribonucleoproteína (RNP) ensamblada *in vitro* de Cas9 y sgARN, para inducir la escisión de ADN en el sitio en la diana y en los potenciales sitios secundarios con homología con la secuencia espaciadora de sgARN. Después de la digestión de gADN, los extremos libres del fragmento de gADN se ligaron con adaptadores para facilitar el enriquecimiento de fragmentos editados y la construcción de colecciones de NGS. Las colecciones de NGS se secuenciaron y, mediante análisis bioinformático, se analizaron las lecturas para determinar las coordenadas genómicas de los extremos de ADN libres. Las ubicaciones en el genoma humano con una acumulación de lecturas se anotaron luego como potenciales sitios secundarios.

[00608]En los ensayos de detección secundarios conocidos, tal como el ensayo bioquímico utilizado anteriormente, normalmente se recupera una gran cantidad de potenciales sitios secundarios, mediante diseño, para "considerar todas las posibilidades" de sitios potenciales que pueden validarse en otros contextos, por ejemplo, en una célula primaria de interés. Además, el ensayo bioquímico por lo general sobrerrepresenta la cantidad de posibles sitios secundarios ya que el ensayo utiliza ADN genómico de alto peso molecular purificado libre del entorno celular y depende de la dosis de RNP de Cas9 utilizada. En consecuencia, los potenciales sitios

secundarios identificados por estos ensayos pueden validarse mediante el uso de secuenciación dirigida de los potenciales sitios secundarios identificados.

[00609]En un enfoque para la secuenciación dirigida, se introdujeron Cas9 y un sgARN de interés (por ejemplo, un sgARN que tiene potenciales sitios secundarios para la evaluación) en células PHH o PCH. Luego, se lisan las células y se utilizan cebadores que flanquean los potenciales sitios secundarios para generar un amplicón para el análisis de NGS. La identificación de indeles a un cierto nivel se puede utilizar para validar un potencial sitio secundario, mientras que la falta de indeles encontrada en el potencial sitio secundario puede indicar un falso positivo en el ensayo secundario que se utilizó.

[00610]Las guías que mostraban la actividad de indel de la diana se analizaron para detectar potenciales sitios de escisión genómica secundarios con este ensayo. Las estructuras de reparación se inspeccionaron manualmente en un locus con velocidades de indel estadísticamente relevantes en los sitios de escisión secundarios para validar las estructuras de reparación.

1.5 Análisis de transcripción mediante PCR cuantitativa

[00611]Se llevó a cabo PCR cuantitativa para evaluar los niveles de transcripción de *KLKB1*. Para aislar mRNA, se usó el kit Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, N.º de cat. 74106). El procedimiento del RNeasy Mini Kit se completó de acuerdo con el protocolo del fabricante.

[00612]Se cuantificó el ARN con un Nanodrop 8000 (ThermoFisher Scientific, N.º de cat. ND-8000-GL). El procedimiento de cuantificación del ARN se completó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las muestras de ARN se almacenaron a -20 °C antes de su uso.

[00613]Se utilizó el kit Taqman RNA-to-Ct 1-Step (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 4392938) para crear las reacciones de PCR. La preparación de la reacción se completó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Alternativamente, se utilizó un kit Cells-to-CT 1-Step TaqMan (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. A25603) para producir muestras para qPCR. Se usaron sondas de PCR cuantitativa dirigidas a *KLKB1* humana o de *Macaca fascicularis* (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 4351372, transcripción UniGene ID Hs01111828_m1; Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 4331182, transcripción UniGene ID Hs00168478_m1), *PP1B* de control interno (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 4351372, transcripción UniGene ID Hs00168719_m1; Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 4331182, transcripción UniGene

ID Mf02802985_m1), *GAPDH* de control interno (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 4351372, transcripto UniGene ID Hs02786624_g1), y *18S* de control interno (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 4319413E) en las reacciones de PCR. Se utilizó el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 4376600) para llevar a cabo la reacción de PCR en tiempo real y la cuantificación de transcritos de acuerdo con el protocolo del fabricante.

[00614]Se proporcionó un análisis de Ct doble delta del mRNA de *KLKB1* mediante el uso de los valores de Ct determinados a partir del sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus. Se calculó un valor de Ct doble delta para los valores de Ct de los controles internos dentro de cada muestra en comparación con los valores para *KLKB1*. La relación de cambio de expresión se determinó en función del valor de Ct doble delta para cada secuencia.

1.6. Análisis de proteínas de medios de cultivo de tejidos mediante ELISA

[00615]Se transfectaron PHH o PCH como se describió anteriormente. A partir de los tres días después de la transfección y la colocación en placas (placa de 96 cavidades), se cambió el medio en las células cada dos días. De siete a diez días después de la transfección, se extrajo el medio de las células y luego se reemplazó con 100 µl de medios de cultivo William's E o medio Cellartis Power Primary HEP (Takada, N.º de cat. Y20020). De veinticuatro a cuarenta y ocho horas más tarde, se recolectó el medio y se almacenó a -20 °C. Los niveles de proteína *KLKB1* secretada total se determinaron mediante el uso de un kit ELISA de precalicreína (Abcam, N.º de cat. ab202405), que detecta precalicreína y calicreína (también denominadas calicreína total). Los reactivos y los estándares del kit se prepararon mediante el uso del protocolo del fabricante. Antes de ejecutar el ELISA, el medio congelado se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto para peletizar los desechos y luego se colocaron en hielo. Para el ELISA, se diluyeron de 10 a 40 µl de medios con un diluyente de ensayo Sample Diluent NS hasta un volumen total de 50 µl. El procedimiento de ELISA se completó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se leyó la placa en un lector de placas SpectraMax M5. Se calcularon los niveles de calicreína total con el *software* SoftMax Pro ver. 6.4.2 mediante el uso de un ajuste de curva logística de cuatro parámetros de la curva estándar. Se determinó la reducción de la proteína precalicreína secretada total para las células tratadas con reactivos de *KLKB1* en comparación con las cavidades tratadas con reactivos de control o muestras no tratadas.

1.6.1 Análisis de proteínas de suero mediante ELISA

[00616] Los niveles de precalicreína en suero se midieron en ratones humanizados mediante el siguiente procedimiento. De seis a siete días después de la dosis, se sacrificaron los animales mediante exanguinación a través de punción cardíaca bajo anestesia con isoflurano. Se recolectó la sangre en tubos separadores de suero y se coaguló a temperatura ambiente durante 2 horas antes de centrifugarla a 9000 g durante 10 min para separar el suero. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

[00617] Se determinaron los niveles de proteína de precalicreína mediante el uso de un kit ELISA de precalicreína humana (Abcam, N.º de cat. ab202405), que detecta precalicreína y calicreína (también denominadas calicreína total). Brevemente, los sueros se diluyeron en serie con diluyente de muestra del kit hasta una dilución final de 1:500 o 1:1000 veces antes de agregarlos a la placa de ELISA. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se leyó la placa en un lector de placas Clariostar (BMG Labtech). Se calcularon los niveles de precalicreína total con el software Mars mediante el uso de un ajuste de curva logística de cuatro parámetros de la curva estándar. Se determinó la reducción de la proteína precalicreína secretada total para las células tratadas con reactivos de KLKB1 en comparación con las cavidades tratadas con reactivos de control o muestras no tratadas.

1.6.2. Análisis de proteínas mediante transferencia Western

[00618] Los PHH se trataron con LNP formuladas con ARN guía seleccionados de la Tabla 1 como se describe con mayor detalle más adelante. Las LNP se incubaron en medio Cellartis Power Primary HEP (Takada, N.º de cat. Y20020) que contenía 3 % de suero de *Macaca fascicularis* a 37 °C durante 10 minutos. Después de la incubación, las LNP se agregaron a los hepatocitos humanos. A partir de los tres días después de la transfección, se cambió el medio en las células cada dos días. De diez a catorce días después de la transfección, para las células sembradas en una placa de 96 cavidades, se retiraron los medios y las células se lisaron con 50 µl/cavidad de amortiguador RIPA (Boston Bio Products, N.º de cat. BP-115) más una mezcla de inhibidores de la proteasa recién agregada que consiste en un cóctel completo de inhibidores de la proteasa (Sigma, N.º de cat. 11697498001), DTT 1 mM y 250 U/ml de benzonasa (EMD Millipore, N.º de cat. 71206-3) por 30.000 a 45.000 células. Las células se mantuvieron en hielo durante 30 minutos, momento en el cual se agregó NaCl (concentración final 1 M). Los lisados celulares se mezclaron por completo y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Los extractos de células enteras ("WCE") se transfirieron a una placa de PCR y se centrifugaron para peletizar los residuos. Se usó

un ensayo de Bradford (Bio-Rad, N.º de cat. 500-0001) para evaluar el contenido de proteína de los lisados. El procedimiento de ensayo de Bradford se completó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los extractos se almacenaron a -20 °C antes de su uso.

[00619]Se llevaron a cabo transferencias Western para evaluar los niveles de proteína KLKB1. Se mezclaron los lisados con amortiguador de Laemmli (Boston BioProducts, N.º de cat. BP-111R) y desnaturalizaron a 95 °C durante 10 minutos. Las transferencias Western se ejecutaron con el sistema NuPage en 4-12 % de gel Bis-Tris (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. NP0323BOX) de acuerdo con el protocolo del fabricante seguido de transferencia en húmedo a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Bio-Rad, N.º de cat. 1620115). Después de la transferencia, las membranas se enjuagaron por completo con agua y se tiñeron con solución Ponceau S (Boston Bio Products, N.º de cat. ST-180) para confirmar la transferencia completa y uniforme. Las transferencias se bloquearon con 5 % de leche en polvo 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 de α-calicleína de conejo (Abcam, N.º de cat. ab124938) a 1:1000 en TBST. Para las transferencias con lisado celular *in vitro*, se utilizó GAPDH como control de carga (Novus, N.º de cat. NB600502) a 1:2500 en TBST y se incubó simultáneamente con el anticuerpo primario de KLKB1. Después de la incubación, las transferencias se enjuagaron 3 veces durante 5 minutos cada una en TBST. Las transferencias se visualizaron y analizaron mediante densitometría con un sistema Licor Odyssey.

1.6.3. Detección basada en electroquimioluminiscencia de los niveles de calicleína en plasma

[00620]Los niveles de calicleína en plasma en las muestras se midieron a través de un inmunoensayo mediante el uso de una plataforma de detección de electroquimioluminiscencia por MesoScale Discovery (MSD). Se recubrió una placa estándar de MSD de 96 cavidades (N.º de cat. L15XA) con 25 o 40 µl de un anticuerpo de captura monoclonal de ratón para la calicleína (LS-Bio, LS-C38308) a una concentración de 1µg/ml en PBS durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las cavidades se lavaron y luego se bloquearon con 150 µl de 3 % de Blocker-A (MSD, N.º de cat. R93AA) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador ajustado a 700 rpm. Después del lavado, las muestras para la determinación de la concentración de calicleína junto con un estándar de calicleína humana de una

concentración conocida, elaborada internamente, se agregaron a las cavidades y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador ajustado a 700 rpm. Tanto las muestras como los estándares se diluyeron en 1 % de Blocker-A, opcionalmente con 0,05 % de Tween20.

[00621]Después del lavado, se agregaron 25 µl de la solución de anticuerpos de detección (LSBio #C185168 a 1 µg/ml y MSD# R32AG a 500 µg/ml en 1 % de Blocker-A con 0,05 % Tween20) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la placa y se agregaron 150 µl de amortiguador de lectura de oro MSD (MesoScale Discovery, N.º de cat. R92TG) a cada cavidad. Se leyó la placa mediante el uso del instrumento QuickPlex SQ 120 (MesoScale Discovery). La placa se lavó 3 veces con PBS con 0,05 % de Tween20 entre las diferentes etapas.

1.7. Análisis fluorométrico de la actividad de calicreína en plasma

[00622]Se midieron los niveles de actividad de calicreína total en plasma en las muestras, tales como muestras de primates no humanos (NHP), mediante el uso del kit de ensayo fluorométrico de actividad de calicreína en plasma Sensolyte Rh110 (Anaspec N.º de cat. AS-72255). Se llevó a cabo un pretratamiento con cloroformo para inhibir la actividad del inhibidor de C1 al mezclar un volumen igual de cloroformo frío con plasma K2EDTA NHP en una placa de 96 cavidades. Luego, se centrifugó la placa durante 5 min a 4 °C a 16.000 X de g y se recolectaron cuidadosamente 10 µl del plasma tratado de la capa superior. En una microplaca negra de 96 cavidades, los 10 µl de plasma pretratado se mezclaron con 30 µl de amortiguador de ensayo, 10 µl de activador de precalicreína de plasma y 50 µl de sustrato, todo lo cual se incluye en el kit y se preparó de acuerdo con el protocolo del kit. Las mediciones de fluorescencia se iniciaron inmediatamente a Ex/Em = 490 nm/520 nm con una lectura cada 5 minutos durante 1 hora en un lector de placas SpectraMax M5. La pendiente de la porción lineal de la lectura fluorométrica cinética para una determinada muestra de plasma posterior al tratamiento se compara con la pendiente de la muestra de plasma previa al tratamiento del mismo animal para calcular el % inicial.

1.7.1 Detección basada en electroquimioluminiscencia de los niveles de calicreína en plasma en primates no humanos

[00623]Los niveles de calicreína en plasma en primates no humanos se midieron a través de un inmunoensayo mediante el uso de una plataforma de detección de electroquimioluminiscencia por MesoScale Discovery (MSD). Se recubrió una placa estándar de MSD de 96 cavidades (N.º de cat. L15XA) con 40 µl de un anticuerpo de

captura monoclonal de ratón para la calicreína (LS-Bio, LS-C38308) a una concentración de 1µg/ml en PBS durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las cavidades se lavaron y luego se bloquearon con 150 µl de 3 % de Blocker-A (MSD, N.º de cat. R93AA) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador ajustado a 700 rpm. Después del lavado, las muestras de NHP para la determinación de la concentración de calicreína junto con un estándar de calicreína de NHP de una concentración conocida, elaborada internamente, se agregaron a las cavidades y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador ajustado a 700 rpm. Tanto las muestras como los estándares se diluyeron en 1 % de Blocker-A con 0,05 % de Tween20.

[00624]Después del lavado, se agregaron 25 µl de la solución de anticuerpos de detección y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la placa y se agregaron 150 µl de amortiguador de lectura de oro MSD (MesoScale Discovery, N.º de cat. R92TG) a cada cavidad. Se leyó la placa mediante el uso del instrumento QuickPlex SQ 120 (MesoScale Discovery). La placa se lavó 3 veces con PBS con 0,05 % de Tween20 entre las diferentes etapas.

1.8 Ensayo de permeabilidad vascular

[00625]El ensayo de permeabilidad vascular azul de Evans es un modelo establecido de edema y fuga vascular que se puede utilizar como modelo en el estudio de HAE (ver, por ejemplo, Bhattacharjee *et al.*, 2013). El ensayo se basa en la inyección de azul de Evans, un tinte de unión a la albúmina, en un animal de prueba, típicamente un ratón. En condiciones fisiológicas, el endotelio es impermeable a la albúmina, por lo que el azul de Evans unido a la albúmina permanece restringido dentro de los vasos sanguíneos. En condiciones patológicas que promueven una mayor permeabilidad vascular, la extravasación de azul de Evans se puede observar cualitativamente, por ejemplo, por la presencia de color azul en las orejas, las patas y la nariz de los ratones después de la inyección intravenosa, o cuantitativamente a través de la medición del tinte incorporado en el tejido, por ejemplo, el intestino.

[00626]Mediante el uso del ratón huKLKB1, se desarrolló un modelo de permeabilidad vascular para evaluar el potencial de la edición de KLKB1 para mitigar los efectos del exceso de producción de bradiquinina (Bhattacharjee *et al.*, 2013). Se administró una KLKB1 modificada dirigida a sgARN y mARN de Cas9 en respuesta a la dosis a dosis de ARN total de 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg. Se trataron grupos adicionales con 0,3 mg/kg de control de LNP no dirigido y control de vehículo de TSS. Trece días después de la dosis, se indujo la permeabilidad vascular mediante el uso de una

inyección intraperitoneal de 2,5 mg/kg del inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) captopril. Después de 15 minutos, se administró una mezcla de tinte azul de Evans (30 mg/kg) y sulfato de dextrano (0,3 mg/kg) mediante inyección intravenosa en la cola. Se sacrificaron los animales 15 minutos después de esta inyección y se evaluó la extravasación de tinte en el colon mediante densidad óptica (OD) a una absorbancia de 600 nm a través del lector de placas Clariostar (BMG LabTech). Se recolectaron hígado y suero para cuantificar la edición del gen huKLKB1 y la proteína calicreína, respectivamente.

Ejemplo 2: Cribado y caracterización guía *in vitro*

2.1. Detección de ARN de guía dual (dgARN) que se dirigen a *KLKB1* humana

[00627]Se prepararon guías dirigidas a *KLKB1* humana como ARN de guía doble y se evaluaron mediante transfección en hepatocitos primarios humanos (PHH) y hepatocitos primarios de *Macaca fascicularis* (PCH) como se describe en el Ejemplo 1. Las células se lisaron 48 horas después del tratamiento para el análisis de NGS como se describió en el Ejemplo 1. Se evaluaron las guías que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Guías duales y guías individuales en seres humanos y *Macaca fascicularis*

dgARN humano	secuencia guía humana	SEQ ID NO	sgARN humano	sgARN de <i>Macaca fascicularis</i>
CR005916	ACAGGAAACUGUAGCAAACA	1	G012253	NA
CR005917	AUAGAUAAUUCACUACCAC	2	G012254	NA
CR005918	UACAUCCCCACCUCUGAAGA	3	G012255	NA
CR005919	AACUGAAUAGCAAACACCUU	89	NA	NA
CR005920	ACAAUUACCAAUUUCUGAAA	90	NA	NA
CR005921	UACAAUUACCAAUUUCUGAA	91	NA	NA
CR005922	UCUUGAGGAGUAGAGGAACU	4	G012256	NA
CR005923	GGUGUUUUCUUGAGGAGUAG	92	NA	NA
CR005924	ACCAGGUAAGUUCUUUUGC	5	G012257	NA
CR005925	GGGUAAAUUUUAGAAUGGCA	6	G012258	NA
CR005926	CGGGUAAAUUUUAGAAUGGC	93	NA	G013884
CR005927	CUCCCGGGUAAAUUUUAGAA	94	NA	G013925
CR005928	AUUUACCCGGGAGUUGACUU	7	G012259	NA
CR005929	UACCCGGGAGUUGACUUUGG	8	G012260	NA
CR005930	UAUGGGACACAAGGGAGCUC	95	NA	NA
CR005931	UCUUUGAGAUUGUGUAAACAC	9	G012261	NA
CR005932	CUUUGAGAUUGUGUAAACACU	10	G012262	NA
CR005933	UUUGAGAUUGUGUAAACACUG	11	G012263	NA
CR005934	UUGGAGGAACAAACUCUUCU	96	NA	G013912
CR005935	UGGAGGAACAAACUCUUCU	97	NA	NA
CR005936	CAACUCUUCUUGGGGAGAG	98	NA	NA
CR005937	CUAUGAGUGACCCUCCACAC	99	NA	G013886
CR005938	CUGUGUGGAGGGUCACUCAU	100	NA	G013938
CR005939	GGUCACUCAUAGGACACCAG	101	NA	G013946
CR005940	GUCACUCAUAGGACACCAGU	102	NA	G013896
CR005941	ACUGCUGCCCACUGCUUUGA	103	NA	NA
CR005942	ACACUUACCCAUAAGAGCAG	104	NA	G013902
CR005943	UACAUACCAGUGUAAUCAA	12	G012264	NA
CR005944	AGGAACACCUACCGCUAUA	105	NA	G013871
CR005945	CUCCGGGACUGUACUUUAAU	106	NA	G013889

dgARN humano	secuencia guía humana	SEQ ID NO	sgARN humano	sgARN de <i>Macaca fascicularis</i>
CR005946	GUCCCAUACGCAAUCCUAGU	107	NA	G013890
CR005947	CUCAGCACCUUUUAUAGCGGU	108	NA	G013892
CR005948	UAUAGCGGUAGGUGUUCUC	109	NA	G013874
CR005949	CUCCAACUAGGAUUGCGUAU	13	G012265	G013933
CR005950	CUAUUAAAGUACAGUCCCGG	110	NA	G013875
CR005951	AGGAUUGCGUAUGGGACACA	14	G012266	G013904
CR005952	GGAUUGCGUAUGGGACACAA	15	G012267	G013901
CR005953	GUGCUGAGUAACGUGGAAUC	111	NA	G013883
CR005954	UAUAAAGGUGCUGAGUAACG	112	NA	G013878
CR005955	UCUCCAACUAGGAUUGCGUA	113	NA	G013908
CR005956	GUUACUCAGCACCUUUUAUAG	16	G012268	G013945
CR005957	AUAGCGGUAGGUGUUCUCC	114	NA	G013873
CR005958	CUGCCAAAAGUACAUCGAAC	115	NA	G013877
CR005959	UGCCUAUUAAAGUACAGUCC	17	G012269	NA
CR005960	CUAUGGAUGGUUCUCCAACU	18	G012270	G013922
CR005961	ACCAUUUUCUGAAAGGGCAC	116	NA	NA
CR005962	GUGUUUCUUAAGAUUAUCUA	117	NA	NA
CR005963	GAUGUUUGGCGCAUCUAUAG	19	G012271	G013921
CR005964	CCAUUUUCUGAAAGGGCACA	118	NA	NA
CR005965	UUCUUAAGAUUAUCUAUGGA	119	NA	G013940
CR005966	CUGUUCGAUGUACUUUUGGC	120	NA	NA
CR005967	UGUUCGAUGUACUUUUGGCA	121	NA	G013880
CR005968	GGUGGAAUGUGCACCUCUUC	122	NA	G013939
CR005969	GUCCGACACACAAAAGCAUC	123	NA	G013894
CR005970	AUGCGCCAAACAUCUGCAG	20	G012272	G013885
CR005971	AAACUGGCAGCGAAUGUUAC	124	NA	G013930
CR005972	UGCCACGCAAACAUUUCACA	125	NA	NA
CR005973	GCACCUUUCGAUGUACUUU	126	NA	G013870
CR005974	AGAUGCGCCAAACAUCUUC	127	NA	NA
CR005975	GCACCUCAUCUGGCAGUAUU	128	NA	NA
CR005976	CAUCUGAGAACGCAAGAUUC	129	NA	G013934
CR005977	AUGCCCAAUACUGCCAGAUG	130	NA	NA
CR005978	UGCACCUCAUCUGGCAGUAU	131	NA	G013944
CR005979	CUCCUUUAUAAUGUCUGCA	21	G012273	G013905
CR005980	AUGUCAUUGAUUGAACUUGC	132	NA	G013936
CR005981	ACAAGCACACGCAUUGUUGG	133	NA	G013893
CR005982	UGUUACUGGUGCACCUUUUU	22	G012274	NA
CR005983	GAUGCGCCAAACAUCUGCA	23	G012275	G013876
CR005984	UAUCGCCUUGAUAAAACUCC	134	NA	G013926
CR005985	CCUCAAGAAAACACCAUAUC	135	NA	G013906
CR005986	AAACGCCUUCUUCAGAGGUG	136	NA	NA
CR005987	AAAACAGCACACGCAUUGU	137	NA	G013891
CR005988	CAUCGAACAGGUGCAGUUUC	138	NA	G013879
CR005989	GGCUUCCCCUGCAGGAUGUU	139	NA	G013881
CR005990	UUGAUGACCACAUUGC UUCA	140	NA	G013937
CR005991	AGGAGCCUGGAGUUUUUAUCA	141	NA	NA
CR005992	AUCUGGCAGUAUUGGGCAUU	24	G012276	G013915
CR005993	UGCCAUCGAGACAUUUUAAA	142	NA	G013899
CR005994	GCGUGGCAUAUGAAAAAAC	25	G012277	NA
CR005995	UAUAAAGGAGUUGAUUAGAG	26	G012278	G013913
CR005996	AGCAAGUUCAAUCAUUGACA	143	NA	G013897
CR005997	GGACAUUCCUUGAAGCAAUG	144	NA	NA
CR005998	ACACCUUGAAUUGUACUCAC	27	G012279	NA
CR005999	GUUGGGGUGAUAGGUGCAGA	145	NA	NA
CR006000	GAAAACGCCUUCUUCAGAGG	146	NA	NA
CR006001	UAUGAAAACGCCUUCUUCAG	147	NA	NA
CR006002	CUCAGAUGUGGAUGUUGCCA	148	NA	NA
CR006003	CUCUCCUAGGCUUCCCCUGC	149	NA	NA

[00628]Se determinó la edición para los dgARN en dos conjuntos separados de poblaciones de PHH y PCH. Los datos de cribado para las secuencias guía se enumeran en la Tabla 6 anterior. La Tabla 7A y las Figuras 1A-1B muestra el

porcentaje de edición para las guías de direccionamiento a *KLKB1* cotransfectadas con proteína Spy Cas9 en hepatocitos primarios humanos (PHH) (N=2) y la Tabla 7B y las Figuras 1C-1D para hepatocitos primarios de *Macaca fascicularis* (PCH) (N=2). [00629] Los ARN guía de mayor rendimiento y los datos de edición correspondientes del Conjunto 2 están marcados con un asterisco (*) en la Tabla 7A y 7B. Cuando se compararon, se determinó que los conjuntos estaban altamente correlacionados (Spearman R = 0,985).

Tabla 7A: Datos de edición de *KLKB1* para guías duales administradas a hepatocitos primarios humanos: Conjuntos de cebadores 1 y 2

ID DE GUÍA	CONJUNTO 1		ID DE GUÍA	CONJUNTO 2	
	% de edición promedio	% de edición de desviación estándar		% de edición promedio	% de edición de desviación estándar
CR005916*	44,8	4,67	CR005916*	46,8	1,7
CR005917*	45,75	1,77	CR005917*	49,9	4,38
CR005918	ND	ND	CR005918	ND	ND
CR005919	24,6	0,28	CR005919	28,9	4,81
CR005920	9,35	0,35	CR005920	10,7	0,99
CR005921	6,15	1,06	CR005921	5,55	0,64
CR005922	ND	ND	CR005922	19,25	1,91
CR005923	19,25	4,74	CR005923	20,35	2,76
CR005924	6,1	0,71	CR005924	5,55	0,78
CR005925*	35,55	1,06	CR005925*	36,3	1,41
CR005926	11,95	4,45	CR005926	11,2	2,83
CR005927	29,2	4,24	CR005927	30,4	2,97
CR005928	ND	ND	CR005928	33,45	4,03
CR005929	ND	ND	CR005929	51,35	0,07
CR005930*	32,45	0,21	CR005930*	32,6	8,06
CR005931*	37,85	5,02	CR005931*	33,15	1,63
CR005932*	62,25	3,04	CR005932*	63,25	4,6
CR005933*	70,05	1,91	CR005933*	62,45	2,47
CR005934	17	2,12	CR005934	16,5	0,71
CR005935	26,25	0,35	CR005935	26,45	3,75
CR005936	4,55	0,64	CR005936	5	0,71
CR005937*	32,6	0,99	CR005937*	32,45	1,63
CR005938*	39,25	8,7	CR005938*	36,85	5,87
CR005939	27	0,57	CR005939	24,85	3,46
CR005940	16,7	2,12	CR005940	17,15	1,91
CR005941	8,9	0,85	CR005941	8,95	1,48
CR005942	19,8	0,71	CR005942	20,05	0,49
CR005943*	38,3	6,08	CR005943*	38,05	3,32
CR005944	23,55	1,91	CR005944	22,05	4,17
CR005945	21,95	1,63	CR005945	23,05	1,63
CR005946	29,35	2,47	CR005946	27,4	2,55
CR005947	12,4	2,97	CR005947	12,55	1,63
CR005948	15,2	1,56	CR005948	14,5	0,85
CR005949	19,15	2,33	CR005949	19,5	0,99
CR005950	21,6	2,12	CR005950	19,2	1,7
CR005951*	44,9	1,41	CR005951*	43,45	3,75
CR005952*	63,4	3,11	CR005952*	64,4	2,26
CR005953	5,7	0	CR005953	6,35	1,06
CR005954	12,5	1,7	CR005954	12,8	0,57
CR005955	24,65	3,04	CR005955	24,95	0,64
CR005956*	31,35	0,92	CR005956*	30,55	4,88
CR005957	22,95	2,05	CR005957	24,8	1,41
CR005958	16,45	1,2	CR005958	12,05	2,33
CR005959*	42,4	3,11	CR005959*	42,95	4,17
CR005960*	38,7	0,57	CR005960*	41,1	4,38
CR005961	15,2	0,71	CR005961	13,8	3,25

	CONJUNTO 1			CONJUNTO 2	
CR005962*	31,4	0	CR005962*	29,65	0,92
CR005963	ND	ND	CR005963	45,25	9,97
CR005964	17,45	1,91	CR005964	15,65	3,89
CR005965	25,25	2,33	CR005965	22,25	0,21
CR005966	8,35	2,9	CR005966	6,15	0,49
CR005967	19,5	2,55	CR005967	16,7	3,11
CR005968	11,55	2,33	CR005968	11,65	1,91
CR005969	13,5	2,26	CR005969	12,35	3,75
CR005970	ND	ND	CR005970	22,25	4,17
CR005971	1,1	0,42	CR005971	1,15	0,64
CR005972	13,65	1,63	CR005972	12,1	2,97
CR005973	6,45	0,21	CR005973	5,25	1,06
CR005974	ND	ND	CR005974	16,7	1,27
CR005975	7,95	1,34	CR005975	6,75	0,92
CR005976	ND	ND	CR005976	14,6	0,99
CR005977	12,2	2,69	CR005977	13,65	3,32
CR005978	9,95	1,06	CR005978	9,25	0,92
CR005979	22,35	1,63	CR005979	22,15	0,21
CR005980	18,2	2,26	CR005980	21,25	0,78
CR005981	18,2	1,27	CR005981	17,8	0,42
CR005982	6,25	1,77	CR005982	3,95	2,76
CR005983*	53	NA	CR005983*	43,3	9,9
CR005984	17,7	7,07	CR005984	18,45	5,73
CR005985	15,1	8,91	CR005985	16,3	0,71
CR005986	ND	ND	CR005986	ND	ND
CR005987	10,6	2,12	CR005987	9,8	0,85
CR005988	8,55	2,05	CR005988	6,4	1,13
CR005989	ND	ND	CR005989	4,9	0,42
CR005990	ND	ND	CR005990	20,2	6,36
CR005991	28,15	2,9	CR005991	26,9	4,81
CR005992	1,65	0,21	CR005992	4,85	0,92
CR005993*	38	1,27	CR005993*	31,35	1,2
CR005994*	33,4	1,98	CR005994*	36,4	1,98
CR005995	22,55	2,47	CR005995	30,65	7,14
CR005996	16,55	0,64	CR005996	13,75	3,46
CR005997	22,05	1,2	CR005997	16,45	3,61
CR005998*	56,65	2,33	CR005998*	59,05	14,07
CR005999	25	3,68	CR005999	22,45	2,19
CR006000	ND	ND	CR006000	ND	ND
CR006001	ND	ND	CR006001	ND	ND
CR006002	23,25	3,75	CR006002	20,85	2,05
CR006003	ND	ND	CR006003	7	1,13

* “dgARN seleccionado”, un subconjunto de los ARN guía evaluados

Tabla 7B: Datos de edición de *KLKB1* para crARN administrados a hepatocitos primarios de *Macaca fascicularis* Conjuntos 1 y 2

	CONJUNTO 1			CONJUNTO 2	
ID DE GUÍA	% de edición promedio	% de edición de desviación estándar	ID DE GUÍA	% de edición promedio	% de edición de desviación estándar
CR005916*	26,6	2,4	CR005916*	26,1	1,8
CR005917*	31,5	3,3	CR005917*	33,2	2,8
CR005918*	0,6	0,2	CR005918	ND	ND
CR005919*	2,5	ND	CR005919*	3,2	0,3
CR005920*	0,4	0,1	CR005920	0,1	0,1
CR005921	0,1	0,0	CR005921	0,1	0,1
CR005010	72,8	0,2	CR005010	65,7	0,9
CR005922*	0,5	0,1	CR005922*	0,6	0,3
CR005923	0,4	0,1	CR005923	0,3	0,1
CR005924	0,2	0,0	CR005924	0,2	0,2
CR005925*	0,7	0,4	CR005925*	1,5	0,3
CR005926	0,0	0,0	CR005926	0,0	0,0
CR005927*	3,1	0,8	CR005927*	3,2	0,2
CR005928*	3,3	1,6	CR005928*	2,2	0,4
CR005929*	13,0	2,7	CR005929*	12,5	0,0
CR005930*	5,0	0,9	CR005930*	3,6	1,3

	CONJUNTO 1			CONJUNTO 2	
CR005931*	1,3	0,0	CR005931*	2,3	0,0
CR005932*	15,5	3,5	CR005932*	12,2	5,7
CR005933*	21,5	2,6	CR005933*	16,6	ND
CR005934	ND	ND	CR005934	0,3	0,2
CR005935	ND	ND	CR005935*	2,0	0,1
CR005936	0,1	0,0	CR005936	ND	ND
CR005937*	2,8	0,1	CR005937*	2,9	0,1
CR005938*	5,8	0,4	CR005938*	6,2	0,0
CR005939*	2,3	0,1	CR005939*	1,9	0,4
CR005940*	1,2	0,3	CR005940*	1,2	0,3
CR005025	31,3	10,8	CR005025	36,5	ND
CR005941	0,4	0,1	CR005941*	0,3	0,0
CR005942*	1,2	0,6	CR005942*	1,0	0,8
CR005943*	4,0	0,4	CR005943*	3,1	0,0
CR005020	29,5	1,5	CR005020	30,7	0,6
CR003187	14,5	0,6	CR003187	15,2	2,2
CR005964	0,3	0,4	CR005964	0,1	0,1
CR005032	5,3	1,6	CR005032	4,5	0,9

* “dgARN seleccionado”, un subconjunto de los ARN guía evaluados

2.1.1 Cribado cruzado de sgARN en PHH y PCH, edición

[00630]Se prepararon secuencias guía seleccionadas dirigidas a KLKB1 como sgARN y se evaluaron adicionalmente en PHH y PCH. Se prepararon PHH y PCH (Gibco, Lot Hu8298) y se transfectaron con RNP como se describe en el Ejemplo 1. Las células se lisaron a las 48 y 72 horas, respectivamente, después del tratamiento para el análisis de NGS como se describió en el Ejemplo 1. La Tabla 8A y las Figuras 2A-2B muestran el porcentaje de edición en PHH y la Tabla 8B y las Figuras 2C-2D en PCH.

[00631]**Tabla 8A: Datos de edición de *KLKB1* para sgARN administrados a hepatocitos primarios humanos Conjuntos 1 y 2**

	CONJUNTO 1			CONJUNTO 2	
ID DE GUÍA	% de edición promedio	% de edición de desviación estándar	ID DE GUÍA	% de edición promedio	% de edición de desviación estándar
G012321*	64,7	5,8	G012321*	62	5,5
G012102	64	5,7	G012102	63,6	4,7
G012293*	63,5	4,4	G012293*	61,6	3,9
G009246	63,3	3,1	G009246	62,3	4,6
G012308*	59,0	1,6	G012308*	59	1,5
G012253*	58,6	3,5	G012253*	59,1	1,7
G012319*	55,3	0,9	G012319*	55,1	3,6
G012298*	53,1	4,2	G012298*	54	4,9
G012320*	52,5	5,5	G012320*	51,9	7,7
G012290*	52,0	1,4	G012290*	51,7	0,9
G012304*	48,7	2,7	G012304	NA	NA
G012323*	47,4	1,4	G012323*	49,1	1,1
G012280*	46,2	4,0	G012280*	45,4	5,4
G012305*	46,1	5,2	G012305	NA	NA
G012303*	45,4	7,4	G012303	NA	NA
G012285*	45,1	7,6	G012285*	45,2	8,6
G012335*	45,1	2,4	G012335*	44,7	3,2
G012286*	44,7	5,3	G012286*	43,9	3,5
G000644	42,4	9,9	G000644	42,7	9,5
G012294*	42,0	1,3	G012294*	43	2,4
G009267	41,6	0,6	G009267	45,8	1,3
G009285	37,7	1,7	G009285	35,6	1,3
G012334*	36,4	2,5	G012334*	36	5,3

	CONJUNTO 1			CONJUNTO 2	
G012325*	36,2	1,8	G012325*	36,4	3,6
G012296*	35,9	6,2	G012296*	35,4	7,8
G012331	35,5	3,0	G012331*	35,7	1,2
G012306	34,9	1,8	G012306	NA	NA
G012313	34,9	1,3	G012313*	36,3	3,3
G012297	34,4	4,7	G012297	32,7	4,7
G012322	32,9	0,4	G012322	33,2	0,4
G012299	32,4	0,7	G012299	NA	NA
G012333	31,3	0,4	G012333	32,3	3,3
G012328	31,2	2,3	G012328*	34,9	0,1
G012309	30,4	0,1	G012309	29,9	2,3
G009321	29,9	2	G009321	31,8	4,5
G012338	29,0	2,2	G012338	29,7	2,3
G012283	26,2	4,2	G012283	24,9	4,1
G012291	25,3	2,3	G012291	24,7	3,7
G012302	23,2	NA	G012302	24,6	3,1
G012337	23,0	2,3	G012337	23,6	0,5
G012311	22,8	0,8	G012311	23,9	0,2
G012144	22,6	1,5	G012144	22,9	0,9
G012327	22,4	3,5	G012327	21,7	3,4
G012316	22,3	0,1	G012316	21,1	0,5
G000645	22	0,7	G000645	22,5	1,6
G012281	20,9	0,1	G012281	21,5	0,1
G012300	19,2	2,6	G012300	NA	NA
G012310	19,2	2,5	G012310	18,2	0,1
G012329	19,2	1,6	G012329	21,7	0,8
G012318	18,8	0,7	G012318	17,5	0,6
G012314	18,6	0,7	G012314	19,6	2,7
G012326	18,4	3,2	G012326	18,5	3,2
G012295	17,7	3,6	G012295	17,6	5,7
G012287	17,2	0,4	G012287	17	2,4
G012288	16,7	0,1	G012288	15,4	0,3
G012339	16,5	2,6	G012339	17,6	1,3
G012284	15,3	0,3	G012284	15,4	1,5
G012324	15,3	2,2	G012324	19,1	3,5
G012289	14,3	1,8	G012289	13,6	0,8
G012312	14,0	0,8	G012312	14,4	NA
G012292	13,4	3,6	G012292	12,9	3
G012330	13,3	1,9	G012330	12,9	0,6
G012315	13,0	0,1	G012315	12,8	1,9
G012332	12,6	1,0	G012332	11,5	0,6
G012340	10,5	2,3	G012340	13,9	1,8
G012301	9,2	0,1	G012301	NA	NA
G012336	7,5	1,6	G012336	6,3	1,8
G012282	7,3	1,2	G012282	8,6	2,3
G012307	5,3	0,2	G012307	NA	NA
G012317	3,5	0,6	G012317	3,5	0,7
G012260	1,9	0,6	G012260	1,8	0,1
G012254	1,6	0,2	G012254	0,7	0,3
G012266	1,0	0,1	G012266	1,9	0,6
G012256	0,8	0,4	G012256	0,2	0
G012274	0,8	0,1	G012274	0,7	0,1
G012259	0,6	0,1	G012259	0,6	0,1
G012262	0,5	0,1	G012262	0,6	0,2
G012276	0,5	0,0	G012276	0,8	NA
G012257	0,4	0,1	G012257	0,1	0
G012277	0,4	0,1	G012277	0,4	0,1
G012261	0,2	0,1	G012261	0,2	0,1
G012270	0,2	0,1	G012270	0,1	0
G012255	0,1	0,1	G012255	0,1	0,1
G012258	0,1	0,0	G012258	0,1	0,1
G012263	0,1	0,0	G012263	0,1	0
G012264	0,1	0,0	G012264	0,2	0,1
G012265	0,1	0,0	G012265	0,1	0

	CONJUNTO 1			CONJUNTO 2	
G012267	0,1	0,0	G012267	0,2	0,1
G012268	0,1	0,0	G012268	0,1	0,1
G012269	0,1	0,0	G012269	0,1	0,1
G012272	0,1	0,1	G012272	0,1	0
G012273	0,1	0,1	G012273	0,1	0,1
G012275	0,1	0,0	G012275	0,2	0,1
G012278	0,1	0,0	G012278	0,1	0,1
G012279	0,0	0,0	G012279	0,1	0,1
G012271	NA	NA	G012271	0,1	0

* “dgARN seleccionado”, un subconjunto de los ARN guía evaluados

Tabla 8B: Datos de edición de *KLKB1* para sgARN administrados a hepatocitos primarios de *Macaca fascicularis* Conjuntos 1 y 2

	CONJUNTO 1			CONJUNTO 2	
ID DE GUÍA	% de edición promedio	% de edición de desviación estándar	ID DE GUÍA	% de edición promedio	% de edición de desviación estándar
G000644	35,9	3,5	G000644	37,4	2,3
G000645	64,1	0,2	G000645	65	0,1
G009246	92,7	1,2	G009246	93	0,9
G009267	84	1,6	G009267	83,3	1,9
G009285	82,5	0,3	G009285	80,7	0,7
G009321	46,8	17	G009321	46,3	12,8
G012102	91,4	0,5	G012102	92,4	0,1
G012144	45,3	0,6	G012144	45,4	4,2
G012253*	92	0,3	G012253*	90,4	1,3
G012254	2,3	0,1	G012254*	2,8	0,1
G012255	0	0	G012255	0,1	0
G012256	0,1	0	G012256	0,1	0
G012257	0,1	0	G012257	0,2	0
G012258	NA	NA	G012258	0,1	0,1
G012259	0,3	0,1	G012259	0,3	0,1
G012260	0,6	0	G012260*	0,8	0,1
G012261	0,2	0,1	G012261	0,2	0,1
G012262	0,3	0,2	G012262	0,4	0,1
G012263	0,2	0,1	G012263	0,2	0,1
G012264	0,1	0	G012264	0,1	0
G012265	NA	NA	G012265	0,1	0
G012266	0,3	0,1	G012266	0,3	0,1
G012267	0,2	0,1	G012267	0,1	0
G012268	0,1	0,1	G012268	0,1	0
G012269	0,1	0	G012269	0,1	0
G012270	NA	NA	G012270*	4,8	0,7
G012271	0,2	0,1	G012271	0	0
G012274	NA	NA	G012274	0,6	0,2
G012277	0,6	0,1	G012277	0,6	0
G012278	0	0	G012278	0,2	0,1

	CONJUNTO 1			CONJUNTO 2	
G012279	0,2	0,1	G012279	0,1	0
G012280*	42,2	1,6	G012280*	39,1	5,6
G012282*	8,8	0,3	G012282*	10,3	NA
G012283*	50,5	NA	G012283*	53,7	3,2
G012284	0,3	0,2	G012284	0,2	0
G012285*	30,2	4,9	G012285*	30,5	0,8
G012287	0,1	0	G012287	0,1	0
G012291	5,5	0,8	G012291*	4,8	1,3
G012292	6,4	0,3	G012292*	6,3	0,7
G012293*	86,6	0,1	G012293*	83,3	6,8
G012294*	53,6	1,5	G012294*	52,1	0,3
G012295*	6,7	0,1	G012295*	7	0,8
G012296*	51,4	2,1	G012296*	49	3,4
G012297	NA	NA	G012297*	41,9	0,4
G012299*	38,2	0,9	G012299	NA	NA
G012300*	28,5	4,6	G012300	NA	NA
G012301*	7,6	2	G012301	NA	NA
G012302*	39,9	2,8	G012302	NA	NA
G012303*	13,8	1,1	G012303	NA	NA
G012304*	69,7	2,8	G012304	NA	NA
G012305*	16	0,1	G012305	NA	NA
G012307	0,3	0,2	G012307	NA	NA
G012308*	57,7	3,9	G012308*	58,1	0,7
G012309*	55,9	7,3	G012309*	55,1	3,7
G012310*	27	2,3	G012310*	27	1,9
G012311	4	0,1	G012311*	3,6	1,8
G012312*	14,4	0,5	G012312*	14,7	0,3

* “sgARN seleccionado”, un subconjunto de los ARN guía evaluados

2.2. Cribado de sgARN en hepatocitos primarios humanos (PHH), edición e inactivación de proteínas

[00632] Tres lotes de PHH (Hu8296, Hu8300 y Hu8284) se colocaron en placas individualmente como se describe en el Ejemplo 1 y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 24 horas antes de la lipofección. Se preparó una mezcla de 6,88 µl de sgARN guía 10 µM y 4,5 µl de 500 ng/µl de mARN de Cas9 en un volumen total de 11,4 µl de agua. Un reactivo de lipofección como se describe en el Ejemplo 1 se descongeló a temperatura ambiente. La mezcla de mARN guía/de Cas9 se agregó secuencialmente con 4,8 µl de citrato de sodio 50 mM/NaCl 200 mM (pH 5), 4,8 µl de reactivo de lipofección y 54 µl de agua de grado molecular, para preparar un volumen total de 75 µl por muestra. Se preincubó la muestra de lipofección con medio, William's E o medio

Cellartis Power Primary HEP (Takada, N.º de cat. Y20020), que contenía 3 % de FBS o suero de *Macaca fascicularis* durante 10 min a 37 °C antes de su adición a las células. Se transfectaron las células con 10 µl de una muestra de lipofección preparada que contenía 300 ng de mRNA de Cas9 y 302 ng de sgARN guía.

[00633]Las células se lisaron 72 horas después de la transfección para llevar a cabo el análisis de NGS como se describe en el Ejemplo 1.

[00634]Para que las células se utilicen para el análisis de proteínas secretadas mediante ELISA o el análisis de proteínas intracelulares mediante transferencia Western, 72 horas después de la transfección, se aspiró el medio y se reemplazó con medio Cellartis Power Primary HEP (Takada, N.º de cat. Y20020). El medio se aspiró y se reemplazó cada dos días. Para las muestras utilizadas para determinar la reducción de la proteína secretada, se aspiró el medio de las cavidades y se reemplazó con medio fresco que se incubó durante 24 a 48 horas antes de la recolección. El medio se recolectó y se transfirió a placas de PCR de 96 cavidades y se almacenó a -20 °C antes de su uso en los ensayos.

[00635]La Tabla 8C y las Figuras 3A-3B muestran el porcentaje de edición y los niveles de proteína KLKB1 secretada en función de la transfección de tres lotes de PHH. Se compararon veinte guías en pares de lotes de PHH y se determinó que estaban altamente correlacionadas (Spearman R >0,8) como se muestra en las Figuras 3C-3E.

Tabla 8C. Frecuencia de indel de KLKB1 y niveles de proteína KLKB1 secretada en PHH

ID DE GUÍA	Lote 1 de PHH - HU8296				Lote 2 de PHH - HU8284				Lote 3 de PHH - HU8300			
	Frec. de indel	SD	KLKB1 secretada	SD	Frec. de indel	SD	KLKB1 secretada	SD	Frec. de indel	SD	KLKB1 secretada	SD
G012253	0,32	0,01	1,54	0,03	0,63	0,06	0,24	0,00	0,49	0,01	0,43	0,11
G012254	0,12	0,01	7,22	0,33	0,40	0,09	0,57	0,05	0,15	0,00	1,61	0,06
G012255	0,02	0,00	15,72	0,70	0,22	0,02	5,05	0,26	0,03	0,01	5,33	0,08
G012256	0,10	0,03	9,26	0,13	0,43	0,05	1,57	0,31	0,11	0,00	2,69	0,07
G012257	0,00	0,00	22,99	0,45	0,08	0,04	8,75	0,28	0,00	0,00	3,71	0,21
G012258	0,13	0,01	4,24	0,02	0,26	0,02	3,89	0,03	0,09	0,02	2,76	0,00
G012259	0,27	0,01	2,18	0,01	0,55	0,07	1,02	0,01	0,35	0,01	0,91	0,13
G012260	0,69	0,03	0,07	0,02	0,73	0,03	0,05	0,01	0,82	0,03	-0,50	0,01
G012261	0,06	0,00	14,26	0,77	0,38	0,03	3,39	0,11	0,07	0,02	3,84	0,28
G012262	0,48	0,03	1,65	0,05	0,74	0,04	0,68	0,09	0,53	0,03	1,40	0,10
G012263	0,42	0,02	2,48	0,06	0,67	0,03	0,78	0,02	0,53	0,03	0,55	0,16
G012264	0,32	0,02	1,97	0,02	0,65	0,07	0,54	0,03	0,26	0,01	2,02	0,09
G012265	0,11	0,00	6,24	0,02	0,29	0,09	1,36	0,10	0,11	0,01	1,10	0,03
G012266	0,42	0,01	1,30	0,02	0,61	0,05	0,87	0,03	0,45	0,02	0,15	0,02
G012267	0,72	0,00	0,23	0,02	0,79	0,02	0,14	0,00	0,82	0,00	-0,52	0,01
G012268	0,20	0,01	4,78	0,14	0,44	0,01	1,65	0,06	0,30	0,01	1,05	0,03
G012269	0,18	0,03	4,10	0,06	0,68	0,01	0,52	0,07	0,25	0,00	2,79	0,04
G012270	0,48	0,01	0,46	0,02	0,77	0,02	0,21	0,00	0,67	0,06	-0,13	0,04
G012271	0,10	0,02	3,16	0,02	0,58	0,06	0,79	0,04	ND	0,00	0,87	0,05
G012272	0,12	0,02	6,42	0,09	0,53	0,06	1,16	0,03	0,21	0,01	0,09	0,02

	Lote 1 de PHH - HU8296				Lote 2 de PHH - HU8284				Lote 3 de PHH - HU8300			
G012273	0,07	0,01	9,39	0,03	0,16	ND	0,82	0,04	0,07	0,00	2,14	0,06
G012274	0,04	0,00	15,14	0,43	0,38	0,11	2,73	0,03	ND	0,00	4,13	0,04
G012275	0,54	0,00	2,35	0,02	0,75	0,03	0,89	0,00	0,62	0,02	0,33	0,00
G012276	0,01	0,00	20,54	0,24	0,09	0,00	4,56	0,18	0,03	0,00	3,92	0,03
G012277	0,28	0,05	3,39	0,08	0,57	0,00	1,61	0,01	0,22	0,03	2,22	0,01
G012278	0,22	0,01	1,61	0,03	0,64	0,04	0,50	0,00	0,42	0,02	-0,08	0,01
G012279	0,40	0,05	2,56	0,08	0,59	0,03	1,51	0,02	0,53	0,03	-0,12	0,01
G012280	0,39	0,02	1,34	0,06	0,55	0,04	0,52	0,01	0,44	0,02	0,08	0,00
G012285	0,24	0,00	2,53	0,01	0,56	ND	1,23	0,06	0,26	0,00	1,60	0,06
G012286	0,26	0,01	2,56	0,05	0,48	0,12	1,06	0,01	0,33	0,01	0,55	0,02
G012290	0,13	0,00	14,44	0,06	0,60	0,01	5,45	0,06	0,29	0,00	2,41	0,04
G012293	0,00	0,00	21,78	0,26	0,00	0,00	6,39	0,02	0,54	0,04	0,21	0,02
G012294	0,23	0,01	2,12	0,16	0,62	0,02	0,39	0,06	0,34	0,02	0,29	0,08
G012296	0,22	0,00	2,89	0,11	0,58	0,05	0,90	0,04	0,35	0,01	0,55	0,04
G012298	0,37	0,01	2,19	0,01	0,68	0,05	0,72	0,03	0,63	0,01	-0,04	0,00
G012303	0,40	0,03	0,52	0,02	0,70	0,05	0,38	0,00	0,38	0,03	0,04	0,00
G012304	0,30	0,02	0,89	0,09	0,26	ND	0,20	0,01	0,27	0,03	1,31	0,06
G012305	0,38	0,03	0,79	0,07	0,73	0,03	0,32	0,01	0,51	0,02	0,04	0,00
G012308	0,18	0,02	1,79	0,13	0,72	0,03	0,53	0,04	0,33	0,01	-0,03	0,01
G012319	0,26	0,00	1,45	0,03	0,25	0,02	3,62	0,76	0,32	0,03	0,80	0,00
G012320	0,21	0,00	2,24	0,11	0,63	0,03	0,88	0,01	0,32	0,01	1,17	0,02
G012321	0,45	0,00	0,49	0,07	0,72	0,01	0,49	0,09	0,60	0,07	-0,09	0,02
G012323	0,28	0,00	1,32	0,01	0,48	0,12	0,75	0,17	0,33	0,00	0,01	0,02
G012325	0,40	0,02	2,51	0,01	0,62	0,00	1,37	0,68	0,50	0,05	0,27	0,02
G012334	0,10	0,00	7,52	0,18	0,19	ND	2,86	0,14	0,06	0,02	3,07	0,19
G012335	0,27	0,02	3,78	0,26	0,47	0,10	1,42	0,09	0,42	0,01	0,11	0,02
G009321 (HOX9)	0,10	0,03	19,59	1,30	0,30	0,32	6,57	0,00	0,37	0,03	3,80	0,11
Sin tratar			24,03	0,03			7,58	0,10			3,47	0,03

2.3. Cribado de sgARN en PHH

[00636]Se transfectaron hepatocitos primarios humanos (PHH) con mARN de Cas9 y sgARN como se describe en el Ejemplo 1. Las células se lisaron 72 horas después de la transfección y se llevó a cabo el análisis de NGS como se describe en el Ejemplo 1.

[00637]Se determinó el porcentaje de edición para los sgARN que comprenden las secuencias guía de la Tabla 1 para dos conjuntos de cebadores. El porcentaje de edición promedio para cada guía en los dos conjuntos de datos se muestra en la Tabla 9A y las Figuras 4A-4B.

Tabla 9A. Datos de edición de KLKB1 en hepatocitos primarios humanos

Conjunto 1				Conjunto 2			
ID de guía	% de edición	SD	N	ID de guía	% de edición	SD	N
G013946*	49,9	2,2	2	G013946	50,8	9,1	2
G000644	49,3	5,7	2	G000644	44,7	3,7	2
G013945*	48,6	1,9	2	G013945*	50,3	1,6	2
G012102	48,1	4,4	2	G012102	45,8	0,3	2
G012320*	45	14	2	G012320*	41,9	15	2
G013938*	44,5	9,5	2	G013938	ND	NA	2
G009285	42,1	0,7	2	G009285	41,4	4,9	2
G009246	40,5	0,6	2	G009246	39,1	3,1	2
G000502	36,5	15	2	G000502	34,9	18	2
G000502	36,5	15	2	G000502	34,9	18,4	2
G012304*	36,2	3,3	2	G012304	ND	NA	2
G013886*	30,5	4	2	G013886*	37,2	0,8	2
G012325*	28,7	3,3	2	G012325*	33,9	0,9	2
G013896*	28,4	3,7	2	G013896*	28,7	1,2	2
G009321	27,7	10	2	G009321	26,9	11	2
G012323*	27,4	7,2	2	G012323*	30,6	6,5	2

	Conjunto 1			Conjunto 2			
G013925*	25,9	11	2	G013925*	28,7	12	2
G013922*	21	7	2	G013922*	19,3	3,3	2
G012327	20,5	2,3	2	G012327*	19,5	4,6	2
G012322	18,6	3,8	2	G012322	13,9	4,5	2
G009267	18,3	1,9	2	G009267	20,4	4,8	2
G013924*	17,4	9,3	2	G013924	ND	NA	2
G013943*	14,2	9,5	2	G013943*	12,1	6,1	2
G000645	13,5	3,2	2	G000645	9,1	4	2
G013895*	13,4	3,1	2	G013895	14	6,6	2
G013941*	13	4,8	2	G013941	14,3	2,6	2
G013882*	10,4	8,1	2	G013882	ND	NA	2
G012329*	9,8	0,7	2	G012329*	8,9	0,9	2
G012300*	9,7	1,8	2	G012300	ND	NA	2
G013899	9,3	0,2	2	G013899*	7,1	4,4	2
G013874	9	2,3	2	G013874*	9,5	3,6	2
G013931	8,9	1,6	2	G013931	ND	NA	2
G012315	8,8	5,4	2	G012315	ND	NA	2
G013902	6,2	3,9	2	G013902*	4,9	5,2	2
G013917	6,1	4,6	2	G013917*	7,1	6,5	2
G013916	5,6	0,6	2	G013916	4	0,8	2
G012324	5,2	2,9	2	G012324	4,8	3,9	2
G013912	5,1	2,9	2	G013912	4,6	1,1	2
G013913	4,8	0,4	2	G013913*	5	0,2	2
G013932	4,8	4,9	2	G013932	ND	NA	2
G013900	4,6	2,1	2	G013900	4,6	0,7	2
G012340	3,3	1,1	2	G012340	2,2	1,7	2
G013873	2,8	0,8	2	G013873	3,6	1,1	2
G013884	2,3	1,1	2	G013884	3	0,3	2
G013903	1,4	0,4	2	G013903	1,3	0,5	2
G013901	1,2	1,3	2	G013901	1,4	1,3	2
G013889	0,9	0,2	2	G013889	1,1	1,2	2
G013930	0,9	1,1	2	G013930	1,3	0,1	2
G013893	0,8	0,3	2	G013893	1,8	0,4	2
G013919	0,8	0,2	2	G013919	0,6	0,4	2
G013891	0,7	0,1	2	G013891	0,3	0	2
G013934	0,6	0,2	2	G013934	0,9	1,1	2
G013894	0,3	0,4	2	G013894	0,6	0,8	2
G013906	0,3	0	2	G013906	0,7	0,3	2
G013914	0,3	0,1	2	G013914	ND	NA	2
G013928	0,3	0,2	2	G013928	0,5	NA	2
G013875	0,2	0,1	2	G013875	0,3	0,1	2
G013878	0,2	0,1	2	G013878	0,3	0,1	2
G013880	0,2	0,1	2	G013880	0,1	0	2
G013939	0,2	0,2	2	G013939	0,2	0,1	2
G013942	0,2	0,1	2	G013942	0,2	0,1	2
G013870	0,1	0	2	G013870	0,1	0	2
G013871	0,1	0	2	G013871	0,1	0	2
G013883	0,1	0	2	G013883	0,6	0,4	2
G013897	0,1	0	2	G013897	0,1	0	2
G013927	0,1	0	2	G013927	0	0	2
G013929	0,1	0	2	G013929	ND	NA	2
G013935	0,1	0,1	2	G013935	0,1	0	2
G013936	0,1	0	2	G013936	0,1	0	2
G013940	0,1	0	2	G013940	0,1	0,1	2
G013921	ND	ND	2	G013921	0,3	0,2	2
G013926	ND	ND	2	G013926	0,2	0,1	2

* “sgARN seleccionado”, un subconjunto de los ARN guía evaluados

2.3.1 Cribado de sgARN en PCH

[00638]Se transfectaron hepatocitos primarios de *Macaca fascicularis* (PCH) con mARN de Cas9 y sgARN como se describe en el Ejemplo 1 mediante el uso de

cantidades crecientes de muestra de lipofección preparada para evaluar un efecto de respuesta a la dosis. Las células se lisaron 72 horas después de la transfección y se llevó a cabo el análisis de NGS como se describe en el Ejemplo 1. Se determinó el porcentaje de edición para los sgARN que comprenden las secuencias guía de la Tabla 1 mediante el uso de dos conjuntos de cebadores para amplificación y detección de indeles. El porcentaje de edición promedio para cada guía en los dos conjuntos de datos se muestra en la Tabla 9B y las Figuras 4C-4D.

[00639] Los ARN guía seleccionados y los datos de edición correspondientes de los Conjuntos 1 y 2 están marcados con un asterisco (*) en la Tabla 9B. Cuando se compararon los conjuntos de datos, se determinó que estaban altamente correlacionados (Spearman R = 0,987).

Tabla 9B. Datos de edición de KLKB1 en hepatocitos primarios de *Macaca fascicularis*

ID de guía	Conjunto 1			Conjunto 2		
	% de edición	SD	N	% de edición	SD	N
G013923	4,3	0	2	5	0,6	2
G013877	1,5	0	2	1,3	0,2	2
G013884	0,4	0	2	0,2	0,1	2
G013929	0,3	0	2	0,5	0,1	2
G013940	0,2	0	2	0,3	0,1	2
G013915	0,1	0	2	0,2	ND	2
G013939	9,3	0,1	2	10,1	0,3	2
G013870	4,8	0,1	2	4	1	2
G013879	3,4	0,1	2	3,1	0,6	2
G012327	1,4	0,1	2	1,5	0,1	2
G013942	0,7	0,1	2	0,2	ND	2
G013883	0,3	0,1	2	0,2	0,1	2
G013926	0,1	0,1	2	0	0	2
G013887	0,9	0,2	2	0,7	0,7	2
G013930	3,1	0,3	2	3,2	1,3	2
G013902	0,9	0,3	2	0,7	0,4	2
G013903	0,7	0,3	2	0,9	0,1	2
G013875	6,8	0,4	2	5,6	0,2	2
G013881	5,8	0,4	2	5,7	0	2
G013914	1,4	0,4	2	ND	ND	2
G013936	8,2	0,6	2	8,1	1,3	2
G013916	7,1	0,6	2	6,4	1,9	2
G013874	6,9	0,6	2	6	0,4	2
G012340	3,6	0,6	2	3,7	0,9	2
G013880	1,9	0,6	2	1,9	0,1	2
G013919	0,9	0,6	2	0,7	0,4	2
G013878*	14,3	0,7	2	11,8	3	2
G013931	4	0,8	2	ND	ND	2
G013872	11,1	0,9	2	11,7	1	2
G013909	4,8	0,9	2	5,3	0,5	2
G013899	3	0,9	2	3	1,6	2
G013886*	15,4	1,1	2	15,2	0,4	2
G013944	2,1	1,1	2	2,3	0,5	2
G013876*	23,4	1,3	2	21,4	3,3	2
G013921	4,1	1,3	2	3,1	3,3	2
G013913*	12,1	1,5	2	11,8	ND	2
G013871*	25,9	1,6	2	23,9	4	2
G013904	9	1,6	2	10,4	2,3	2
G013906	3,2	1,6	2	3,3	1,9	2
G013928	4,6	1,7	2	4,1	1,6	2

	Conjunto 1			Conjunto 2		
G012324	3,9	1,8	2	4,4	2,4	2
G013910	3,9	1,8	2	4,8	1,8	2
G013892	2,7	1,8	2	2,8	1,8	2
G013943	3,1	2	2	3,7	2,3	2
G013920	2	2	2	2,9	1,4	2
G013889*	29,4	2,1	2	31,4	0,5	2
G013938*	24,9	2,1	2	24,2	0,6	2
G012329*	12,4	2,1	2	11,4	0,5	2
G012315	4,1	2,1	2	ND	ND	2
G013927	4	2,1	2	5,2	0,3	2
G013918	2,3	2,1	2	2	1,6	2
G013935	4,1	2,2	2	4,3	1,1	2
G013941	7	2,3	2	8,7	1,3	2
G012322	10,8	2,4	2	10,4	3,4	2
G013890	4,9	2,5	2	5,5	2,1	2
G013925	5,8	2,6	2	6,9	2,3	2
G012325*	11,8	2,8	2	11,6	3,4	2
G013888	6,7	2,8	2	7,1	1,6	2
G013897	11	3	2	11,9	1,6	2
G013900	6,6	3	2	7,7	4,2	2
G013917*	16,4	3,2	2	18,3	3,8	2
G013937*	30,4	3,8	2	26,5	6	2
G013932	5,6	4,4	2	ND	ND	2
G012304*	11,7	4,7	2	ND	ND	2
G013895	6,8	4,7	2	6	3,2	2
G013896*	11,5	5	2	10,3	3,8	2
G013907*	36,1	5,5	2	36,2	5,7	2
G012320	8,9	5,7	2	9,2	4,6	2
G013945*	19	6,6	2	20	6,1	2
G013924*	13,9	6,7	2	ND	ND	2
G013882*	24,7	9	2	ND	ND	2
G013946*	27,2	ND	2	22,4	4,2	2
G013873*	23,6	ND	2	20,1	2,9	2
G012323*	12,3	ND	2	11,8	1,5	2
G013934	8,3	ND	2	7,1	1,6	2
G013905	6	ND	2	4	3,3	2
G013898	5,7	ND	2	6	2,1	2
G013908	1,8	ND	2	3,6	1,3	2
G013911	1,8	ND	2	3,4	1,6	2
G013894	0,3	ND	2	0,2	0,1	2
G013885	ND	ND	2	5,9	0,2	2
G013891	ND	ND	2	3,3	0,7	2
G013893	ND	ND	2	1,2	0,9	2
G013901	ND	ND	2	42,2	4,2	2
G013912	ND	ND	2	0,4	ND	2
G013922	ND	ND	2	11,2	1,1	2
G013933	ND	ND	2	12,2	4	2

* “sgARN seleccionado”, un subconjunto de los ARN guía evaluados

Ejemplo 3: Ensayos de respuesta a la dosis

3.1 Cribado cruzado de sgARN en PCH y PHH en ensayos de respuesta a la dosis de 4 puntos

[00640] Los sgARN modificados dirigidos a KLKB1 humana y las secuencias de sgARN coincidentes de *Macaca fascicularis* se evaluaron en PHH y PCH en un ensayo de respuesta a la dosis, mediante el uso de 16 guías del cribado de guía de PHH descrito en el Ejemplo 2.2. Se prepararon muestras de lipofección que incluyen mRNA de Cas9 y sgARN como se describe en el Ejemplo 2.2. Los hepatocitos primarios humanos y de *Macaca fascicularis* se colocaron en placas como se describe en el Ejemplo 1. Ambas

líneas celulares se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 48 horas antes del tratamiento con muestras de lipofección. Se incubaron muestras de lipofección en medio Cellartis Power Primary HEP (Takada, N.º de cat. Y20020) que contenía 3 % de suero de FBS a 37 °C durante 10 minutos.

[00641]Después de la incubación, las muestras de lipofección se agregaron a los hepatocitos humanos o de *Macaca fascicularis* en un ensayo de respuesta a la dosis de 4 puntos. Los PHH se lisaron 120 horas después de la transfección y los PCH se lisaron 168 horas después de la transfección y los gADN se sometieron a PCR cuantificada para el análisis de NGS como se describe en el Ejemplo 1.

[00642]La frecuencia de indel de los sgARN a concentraciones de 0,4 nM, 3,3 nM, 30 nM y 90 nM en células de PHH se muestra en la Tabla 10 y las Figuras 5A-5B. Los niveles de proteína KLKB1 secretada de los sgARN determinados por ELISA se muestran en la Tabla 10 y las Figuras 5C-5D.

Tabla 10: Datos de edición de KLKB1 y niveles de proteína KLKB1 secretada en PHH

ID DE GUÍA	Concentración de guía (nM)	Frec. de indel promedio	SD	KLKB1 secretada promedio	SD
G012253	90	0,54	0,04	5,84	0,29
	30	0,64	0,05	4,06	0,09
	3,3	0,31	0,01	17,29	0,35
	0,4	0,02	0,00	26,56	0,00
G012259	90	0,30	0,02	8,70	0,10
	30	0,52	0,06	4,90	0,00
	3,3	0,20	0,03	18,90	0,20
	0,4	0,02	0,00	26,60	0,00
G012260	90	0,73	0,04	2,20	0,00
	30	0,84	0,00	0,30	0,30
	3,3	0,71	0,02	4,00	0,20
	0,4	0,20	0,01	25,10	0,30
G012267	90	0,80	0,03	2,10	0,10
	30	0,89	0,01	0,30	0,00
	3,3	0,76	0,05	4,00	0,20
	0,4	0,29	0,03	20,70	0,20
G012278	90	0,47	0,10	4,80	0,10
	30	0,57	0,02	1,80	0,10
	3,3	0,24	0,02	10,80	0,10
	0,4	0,02	0,01	26,50	0,10
G012279	90	0,00	0,00	18,70	0,40
	30	0,00	0,00	21,10	0,30
	3,3	0,00	0,00	26,60	0,00
	0,4	0,00	0,00	26,60	0,00
G012280	90	0,42	0,08	6,90	0,10
	30	0,69	0,01	4,70	0,10
	3,3	0,21	0,00	23,30	0,10
	0,4	0,01	0,00	26,60	0,00
G012293	90	0,48	0,05	5,10	0,10
	30	0,70	0,00	4,20	0,00
	3,3	0,32	0,02	15,20	0,60
	0,4	0,03	0,00	26,60	0,00
G012294	90	0,39	0,08	7,37	0,08
	30	0,48	0,04	6,44	0,06
	3,3	0,13	0,01	22,57	0,25
	0,4	0,01	0,00	23,49	0,73
G012298	90	0,48	0,14	9,30	0,60

ID DE GUÍA	Concentración de guía (nM)	Frec. de indel promedio	SD	KLKB1 secretada promedio	SD
	30	0,52	0,00	6,20	0,10
	3,3	0,20	0,07	21,50	0,50
	0,4	0,01	0,00	25,50	0,50
G012303	90	0,68	0,05	6,00	0,00
	30	0,75	0,04	3,80	0,30
	3,3	0,43	0,03	15,80	0,20
	0,4	0,02	0,00	23,20	2,70
G012304	90	0,54	0,02	6,00	0,10
	30	0,52	0,02	7,20	0,20
	3,3	0,21	0,04	21,30	0,30
	0,4	0,01	0,00	25,60	0,00
G012305	90	0,61	0,03	7,90	0,00
	30	0,66	0,01	4,40	0,10
	3,3	0,33	0,01	18,00	0,00
	0,4	0,01	0,00	26,10	0,20
G012308	90	0,41	0,01	10,70	0,20
	30	0,42	0,10	9,10	0,10
	3,3	0,08	0,01	24,30	0,10
	0,4	0,01	0,00	26,60	0,00
G012321	90	0,43	0,00	9,70	0,10
	30	0,61	0,13	5,20	0,00
	3,3	0,17	0,01	21,70	0,20
	0,4	0,02	0,02	26,50	0,10
G012323	90	0,28	0,03	9,90	0,30
	30	0,28	0,10	7,60	0,10
	3,3	0,14	0,03	22,40	0,30
	0,4	0,01	0,00	26,60	0,00
Sin tratar	NA			22,61	0,21

[00643]La frecuencia de indel de los sgARN a concentraciones de 0,4 nM, 10 nM, 30 nM y 90 nM en células de PCH se muestra en la Tabla 11 y las Figuras 5E-5F. Los niveles de proteína KLKB1 secretada de los sgARN determinados por ELISA se muestran en la Tabla 11 y las Figuras 5G-5H.

Tabla 11: Datos de edición de KLKB1 y niveles de proteína KLKB1 secretada en PCH

guía	Concentración de guía (nM)	Media de frec. de indel	SD	Media de KLKB1 secretada	SD
G012253	90	0,25	0,01	0,82	0,01
	30	0,38	0,05	0,77	0,00
	10	2,76	0,09	0,44	0,07
	0,4	13,26	0,32	0,01	0,00
G012259	90	1,13	0,02	0,70	0,01
	30	0,81	0,12	0,69	0,01
	10	3,95	0,41	0,37	0,04
	0,4	12,88	0,96	0,00	0,00
G012260	90	0,36	0,02	0,82	0,02
	30	0,23	0,00	0,81	0,01
	10	1,56	0,13	0,56	0,06
	0,4	11,51	1,03	0,01	0,00
G012267	90	1,28	0,10	0,67	0,02
	30	0,98	0,07	0,67	0,00
	10	3,18	0,37	0,42	0,04
	0,4	11,88	0,28	0,01	0,00
G012278	90	1,01	0,06	0,61	0,03
	30	0,82	0,01	0,63	0,02
	10	3,16	0,19	0,30	0,05
	0,4	12,08	1,14	0,00	0,00
G012279	90	9,88	1,25	0,00	0,00
	30	9,44	1,07	0,00	0,00

guía	Concentración de guía (nM)	Media de frec. de indel	SD	Media de KLKB1 secretada	SD
G012280	10	12,49	0,14	0,00	0,00
	0,4	12,12	0,25	0,00	0,00
	90	4,32	0,20	0,44	0,02
	30	3,08	0,18	0,46	0,00
	10	7,70	0,21	0,13	0,02
G012293	0,4	11,69	1,13	0,00	0,00
	90	0,80	0,22	0,80	0,03
	30	0,54	0,09	0,80	0,02
	10	2,56	0,16	0,59	0,00
G012294	0,4	11,79	0,23	0,01	0,00
	90	6,96	0,48	0,39	0,09
	30	6,21	0,29	0,41	0,03
	10	15,19	1,13	0,12	0,00
G012298	0,4	24,96	3,85	0,00	0,00
	90	18,40	0,36	ND	ND
	30	25,03	2,87	ND	ND
	10	24,81	2,89	ND	ND
G012303	0,4	23,59	3,91	ND	ND
	90	18,34	4,33	0,16	0,06
	30	16,05	4,43	0,17	0,00
	10	26,04	3,42	0,03	0,00
G012304	0,4	27,82	2,74	0,00	0,00
	90	5,75	1,35	0,52	0,04
	30	6,14	0,68	0,54	0,01
	10	17,23	1,75	0,21	0,04
G012305	0,4	24,90	0,95	0,00	0,00
	90	19,27	4,43	0,07	0,02
	30	18,57	3,56	0,11	0,01
	10	22,11	2,31	0,02	0,00
G012308	0,4	27,30	1,17	0,00	0,00
	90	6,97	2,00	0,44	0,04
	30	7,52	0,00	0,49	0,03
	10	14,43	0,07	0,18	0,05
G012321	0,4	22,80	2,56	0,00	0,00
	90	4,95	1,25	ND	ND
	30	5,96	0,07	ND	ND
	10	10,71	0,16	ND	ND
G012323	0,4	23,83	1,78	ND	ND
	90	9,93	2,24	ND	ND
	30	8,97	3,13	ND	ND
	10	15,75	0,20	ND	ND
	0,4	22,16	0,27	ND	ND

[00644]Se demostró que la frecuencia de indel y los niveles de proteína KLKB1 secretada están inversamente correlacionados tanto en PHH como en PCH como se muestra en las Figuras 5I-5J.

3.2 Cribado cruzado de sgARN en PHH y PCH en ensayos de respuesta a la dosis de 7 puntos

[00645]Las formulaciones de nanopartículas lipídicas (LNP) de los sgARN dirigidos a secuencias de sgARN de KLKB1 humana se evaluaron en PHH y PCH en un ensayo de respuesta a la dosis.

[00646]Las LNP se formularon como se describió en el Ejemplo 1. Los LNP finales se caracterizaron para determinar la eficiencia de encapsulación, el índice de polidispersidad y el tamaño de partícula promedio de acuerdo con los métodos

analíticos proporcionados anteriormente.

[00647] Los hepatocitos primarios humanos y de *Macaca fascicularis* se colocaron en placas como se describe en el Ejemplo 1. Ambas líneas celulares se incubaron a 37 °C, con 5 % de CO₂ durante 24 horas antes del tratamiento con LNP. Las LNP se incubaron en un medio que contenía 3 % de FBS a 37 °C durante 10 minutos. Después de la incubación, las LNP se agregaron a los hepatocitos humanos o de *Macaca fascicularis* en una curva de respuesta a la dosis de 3 veces en 7 puntos. Las células se lisaron 72 horas después de la transfección y los gADN se sometieron a PCR cuantificada para el análisis de NGS como se describe en el Ejemplo 1.

[00648] La frecuencia de indel de los sgARN a concentraciones de 0,04 nM, 0,13 nM, 0,40 nM, 1,19 nM, 3,58 nM, 10,75 nM y 32,25 nM se muestran en la Tabla 12 y las correspondientes curvas de respuesta a la dosis en las Figuras 6A-B para PHH y las Figuras 6C-D para PCH.

Tabla 12: Frecuencia de indel y proteína KLKB1 secretada para LNP dirigidas a *KLKB1* in vitro

ID DE GUÍA	Conc. de guía (nM)	PHH				PCH			
		Media de frec. de indel	SD	Media de KLKB1 secretada	SD	Media de frec. de indel	SD	Media de KLKB1 secretada	SD
G012253	32,25	0,91	0,00	-1,38	0,22	0,90	0,01	-1,58	0,10
	10,75	0,89	0,00	-1,30	0,08	0,89	0,01	-1,57	0,07
	3,58	0,89	0,02	-1,23	0,19	0,84	0,00	-1,39	0,07
	1,19	0,83	0,01	-0,48	0,11	0,55	0,03	5,01	0,24
	0,40	0,64	0,04	2,49	0,07	0,18	0,02	22,35	0,29
	0,13	0,34	0,03	9,34	0,01	0,05	0,01	27,18	0,07
	0,04	0,12	0,01	15,04	0,17	0,01	0,00	27,18	0,07
G012259	32,25	0,84	0,01	-1,12	0,21	0,95	0,01	-1,57	0,07
	10,75	0,86	0,01	-1,17	0,11	0,93	0,01	-1,57	0,02
	3,58	0,85	0,02	-1,00	0,06	0,80	0,00	-0,71	0,70
	1,19	0,79	0,01	-0,28	0,04	0,44	0,04	8,93	0,23
	0,40	0,63	0,02	2,37	0,19	0,12	0,03	25,94	0,05
	0,13	0,36	0,03	8,32	0,31	0,01	0,00	27,18	0,07
	0,04	0,13	0,01	12,97	0,41	0,00	0,00	27,18	0,07
G012260	32,25	0,93	0,00	-1,36	0,21	0,96	0,00	-1,32	0,18
	10,75	0,92	0,01	-1,35	0,15	0,95	0,01	-1,41	0,37
	3,58	0,92	0,01	-1,43	0,19	0,87	0,02	-0,94	0,03
	1,19	0,92	0,01	-1,37	0,27	0,50	0,00	7,33	0,02
	0,40	0,90	0,00	-1,03	0,17	0,13	0,01	24,00	1,03
	0,13	0,84	0,02	0,30	0,03	0,03	0,00	27,18	0,07
	0,04	0,63	0,03	4,51	0,20	0,00	0,00	26,95	0,39
G012267	32,25	0,94	0,03	-1,58	0,13	0,95	0,02	-1,88	0,02
	10,75	0,94	0,01	-1,50	0,08	0,94	0,02	-1,94	0,02
	3,58	0,93	0,01	-1,57	0,13	0,84	0,00	-1,48	0,10
	1,19	0,91	0,05	-1,62	0,25	0,52	0,01	7,68	0,29
	0,40	0,91	0,01	-1,48	0,22	0,15	0,01	24,74	1,33
	0,13	0,87	0,01	-0,77	0,07	0,04	0,01	27,00	0,05
	0,04	0,78	0,02	1,28	0,07	0,01	0,00	27,00	0,05
G012278	32,25	0,95	0,00	-1,63	0,18	0,95	0,01	-1,87	0,04
	10,75	0,94	0,01	-1,64	0,10	0,94	0,01	-1,91	0,14
	3,58	0,94	0,00	-1,59	0,05	0,82	0,02	-1,41	0,16
	1,19	0,88	0,01	-1,38	0,20	0,44	0,01	8,23	0,17
	0,40	0,65	0,03	0,29	0,14	0,08	0,03	26,13	1,19

ID DE GUÍA	Conc. de guía (nM)	PHH				PCH			
		Media de frec. de indel	SD	Media de KLKB1 secretada	SD	Media de frec. de indel	SD	Media de KLKB1 secretada	SD
	0,13	0,34	0,02	5,68	0,20	0,02	0,00	27,00	0,05
	0,04	0,12	0,01	12,54	0,43	0,01	0,00	27,00	0,05
G012279	32,25	0,00	0,00	-0,99	0,39	0,00	0,00	0,02	0,11
	10,75	0,00	0,00	-0,56	0,05	0,00	0,00	8,49	0,34
	3,58	0,00	0,00	3,54	0,08	0,00	0,00	26,50	0,03
	1,19	0,00	0,00	12,69	0,56	0,00	0,00	27,00	0,05
	0,40	0,00	0,00	15,91	0,26	0,00	0,00	26,85	0,17
	0,13	0,00	0,00	17,60	0,18	0,00	0,00	27,00	0,05
	0,04	0,00	0,00	17,32	0,00	0,00	0,00	27,00	0,05
G012280	32,25	0,93	0,01	-1,68	0,27	0,87	0,01	-1,91	0,01
	10,75	0,90	0,03	-1,56	0,20	0,83	0,01	-1,62	0,30
	3,58	0,91	0,03	-1,55	0,11	0,56	0,02	2,88	0,53
	1,19	0,85	0,01	-0,61	0,27	0,15	0,00	21,86	0,24
	0,40	0,61	0,02	4,05	0,45	0,02	0,00	26,36	0,86
	0,13	0,26	0,01	11,55	0,19	0,01	0,00	27,00	0,05
	0,04	0,08	0,00	15,47	0,38	0,00	0,00	27,00	0,05
G012293	32,25	0,91	0,00	-1,79	0,18	0,98	0,00	-1,82	0,06
	10,75	0,91	0,01	-1,63	0,19	0,96	0,02	-1,84	0,02
	3,58	0,92	0,02	-1,65	0,27	0,90	0,00	-1,21	0,55
	1,19	0,89	0,00	-1,27	0,55	0,54	0,02	3,40	0,13
	0,40	0,82	0,02	-0,36	0,32	0,19	0,02	22,12	0,61
	0,13	0,60	0,00	3,31	0,19	0,04	0,02	26,91	0,09
	0,04	0,32	0,01	10,09	0,50	0,01	0,00	27,00	0,04
G012294	32,25	0,93	0,01	-1,58	0,28	0,90	0,02	-1,84	0,12
	10,75	0,91	0,01	-1,41	0,14	0,89	0,00	-1,86	0,04
	3,58	0,91	0,01	-1,46	0,23	0,60	0,00	-0,15	0,19
	1,19	0,82	0,02	-0,96	0,32	0,23	0,03	13,68	0,43
	0,40	0,60	0,03	1,61	0,43	0,07	0,03	25,94	1,04
	0,13	0,30	0,01	7,91	0,02	0,01	0,00	26,73	0,16
	0,04	0,12	0,00	12,18	1,01	0,01	0,00	27,00	0,05
G012298	32,25	0,95	0,00	-0,50	0,11	NA	NA	15,77	0,15
	10,75	0,95	0,00	-0,47	0,23	NA	NA	27,00	0,05
	3,58	0,91	0,00	-0,15	0,21	NA	NA	27,00	0,05
	1,19	0,83	0,01	0,88	0,40	NA	NA	27,00	0,05
	0,40	0,59	0,01	6,54	0,52	NA	NA	26,39	0,82
	0,13	0,24	0,02	12,35	0,21	NA	NA	27,00	0,05
	0,04	0,08	0,00	16,29	1,12	NA	NA	27,00	0,05
G012303	32,25	0,96	0,01	-1,27	0,14	0,88	0,01	-1,55	0,10
	10,75	0,94	0,00	-1,39	0,18	0,83	0,02	-1,36	0,12
	3,58	0,93	0,01	-1,28	0,15	0,40	0,02	8,20	0,71
	1,19	0,90	0,01	-0,60	0,18	0,08	0,01	26,23	0,95
	0,40	0,74	0,02	2,18	0,05	0,02	0,00	27,18	0,07
	0,13	0,36	0,01	9,45	0,14	0,00	0,00	27,18	0,07
	0,04	0,13	0,01	15,14	0,26	0,00	0,00	27,18	0,07
G012304	32,25	0,94	0,01	-1,37	0,32	0,96	0,00	-1,70	0,19
	10,75	0,95	0,01	-1,39	0,10	0,94	0,01	-1,72	0,08
	3,58	0,91	0,00	-1,41	0,21	0,87	0,00	-1,52	0,01
	1,19	0,84	0,02	-0,38	0,15	0,52	0,02	6,62	0,71
	0,40	0,61	0,02	3,74	0,19	0,13	0,02	25,35	1,70
	0,13	0,22	0,01	11,39	0,18	0,02	0,00	27,18	0,07
	0,04	0,06	0,00	15,41	0,72	0,00	0,00	27,18	0,07
G012305	32,25	0,95	0,01	-1,26	0,16	0,86	0,01	-1,53	0,11
	10,75	0,94	0,00	-1,37	0,13	0,75	0,02	-0,43	0,12
	3,58	0,92	0,02	-1,30	0,15	0,33	0,01	15,42	0,72
	1,19	0,86	0,01	-0,26	0,07	0,06	0,00	27,18	0,07
	0,40	0,65	0,03	3,85	0,04	0,01	0,00	27,18	0,07
	0,13	0,27	0,04	10,94	0,24	0,00	0,00	27,18	0,07
	0,04	0,08	0,01	15,12	0,54	0,00	0,00	27,18	0,07
G012308	32,25	0,95	0,01	-1,07	0,19	0,93	0,02	-1,66	0,12
	10,75	0,95	0,01	-0,92	0,07	0,92	0,01	-1,44	0,02
	3,58	0,88	0,02	-0,77	0,27	0,60	0,07	-0,18	0,32
	1,19	0,75	0,01	1,00	0,10	0,34	0,03	14,44	0,04
	0,40	0,31	0,05	7,89	0,27	0,08	0,02	26,77	0,64

ID DE GUÍA	Conc. de guía (nM)	PHH				PCH			
		Media de frec. de indel	SD	Media de KLKB1 secretada	SD	Media de frec. de indel	SD	Media de KLKB1 secretada	SD
	0,13	0,07	0,00	12,76	0,59	0,03	0,02	27,18	0,07
	0,04	0,02	0,01	14,75	0,43	0,00	0,00	27,17	0,05
G012321	32,25	0,93	0,00	-1,17	0,24	0,96	0,01	-1,68	0,19
	10,75	0,93	0,01	-1,26	0,14	0,92	0,02	-1,60	0,12
	3,58	0,88	0,02	-1,07	0,21	0,80	0,02	-0,84	0,10
	1,19	0,85	0,00	-0,17	0,17	0,40	0,02	14,33	0,57
	0,40	0,63	0,02	3,56	0,06	0,09	0,01	23,98	1,24
	0,13	0,25	0,03	10,27	0,82	0,03	0,02	27,17	0,05
	0,04	0,09	0,01	13,27	0,79	0,01	0,00	27,18	0,07
G012323	32,25	0,89	0,01	-1,17	0,28	0,93	0,00	-1,74	0,12
	10,75	0,90	0,00	-1,35	0,14	0,93	0,00	-1,72	0,03
	3,58	0,84	0,01	-1,14	0,17	0,76	0,54	-0,36	0,32
	1,19	0,73	0,01	0,20	0,14	0,35	0,01	15,43	0,17
	0,40	0,49	0,01	4,28	0,04	0,07	0,01	25,63	1,00
	0,13	0,23	0,02	10,12	1,03	0,01	0,00	27,18	0,07
	0,04	0,08	0,01	14,08	0,80	0,00	0,00	27,18	0,07
G013901	32,25	0,29	0,01	7,11	0,34	0,97	0,00	-1,58	0,48
	10,75	0,29	0,00	8,89	0,40	0,98	0,00	-1,76	0,26
	3,58	0,22	0,02	10,94	0,34	0,95	0,01	-1,81	0,19
	1,19	0,15	0,02	14,44	0,70	0,79	0,01	-0,82	0,32
	0,40	0,08	0,01	13,76	0,22	0,46	0,00	8,67	0,27
	0,13	0,05	0,00	14,80	0,40	0,19	0,01	21,35	0,16
	0,04	0,02	0,00	14,97	0,59	0,05	0,00	26,84	0,19
sin tratar	NA	0,00	0,00	13,62	0,95	0,00	0,00	25,77	2,09

3.3 Cribado cruzado de sgARN líder en PCH y PHH en ensayos de respuesta a la dosis de 7 puntos

[00649]Las formulaciones de nanopartículas lipídicas (LNP) de los sgARN modificados se evaluaron en PHH y PCH en un ensayo de respuesta a la dosis.

[00650]En este estudio se utilizaron las LNP descritas en el Ejemplo 3.2.

[00651]Después de la incubación, las LNP se agregaron a los hepatocitos humanos o de Macaca fascicularis en una curva de respuesta a la dosis de 3 veces en 7 puntos. Las células se lisaron 72 horas después de la transfección y los gADN se sometieron a PCR cuantificada para el análisis de NGS como se describe en el Ejemplo 1. Para el análisis de proteína KLKB1, las células se lisaron el día 8 después de la transfección y los extractos de células enteras se sometieron a análisis de transferencia Western como se describe en el Ejemplo 1.

[00652]La frecuencia de indel de los sgARN a concentraciones de 0,04 nM, 0,13 nM, 0,40 nM, 1,19 nM, 3,58 nM, 10,75 nM y 32,25 nM para PHH y PCH se muestra en la Tabla 13 y la curva de respuesta a la dosis data se ilustra en las Figuras 7A y 7B. Los niveles de proteína KLKB1 secretada de los sgARN determinados por ELISA se muestra en la Tabla 13 y la Figura 7C para PHH y la Figura 7D para PCH.

Tabla 13. Frecuencia de indel y proteína KLKB1 secretada para LNP

dirigidas a *KLKB1* *in vitro*

ID DE GUÍA	PHH					PCH				
	Conc. de guía (nM)	Media de frec. de indel	SD	Media de KLKB1 secretada	SD	Conc. de guía (nM)	Media de frec. de indel	SD	Media de KLKB1 secretada	SD
G012260	32,25	0,88	0,03	-0,07	0,04	32,25	0,97	0,01	-1,42	0,04
	10,75	0,86	0,03	0,05	0,09	10,75	0,98	0,01	-1,32	0,03
	3,58	0,82	0,08	0,03	0,04	3,58	0,95	0,00	-1,41	0,04
	1,19	0,81	0,07	0,06	0,00	1,19	0,68	0,07	-0,08	0,03
	0,40	0,84	0,00	0,14	0,00	0,40	0,26	0,04	14,46	1,24
	0,13	0,79	0,04	0,55	0,01	0,13	0,06	0,01	24,37	0,74
G012267	32,25	0,88	0,05	0,11	0,02	32,25	0,98	0,00	-1,46	0,01
	10,75	0,89	0,04	0,17	0,01	10,75	0,97	0,02	-1,28	0,14
	3,58	0,87	0,05	0,16	0,05	3,58	0,94	0,00	-1,36	0,08
	1,19	0,89	0,04	0,12	0,02	1,19	0,61	0,01	1,06	0,00
	0,40	0,86	0,02	0,23	0,02	0,40	0,20	0,03	15,86	0,74
	0,13	0,87	0,02	0,54	0,00	0,13	0,05	0,00	25,73	1,85
G012293	32,25	0,85	0,03	1,54	0,06	32,25	0,98	0,00	26,39	0,16
	10,75	0,85	0,00	-0,09	0,07	10,75	0,98	0,01	-1,43	0,02
	3,58	0,76	0,15	-0,04	0,01	3,58	0,98	0,01	-1,32	0,06
	1,19	0,78	0,02	0,06	0,08	1,19	0,98	0,00	-1,37	0,07
	0,40	0,85	0,06	0,39	0,30	0,40	0,81	0,01	-0,89	0,04
	0,13	0,74	0,08	0,71	0,01	0,13	0,35	0,03	9,93	0,49
G013901	32,25	0,71	0,02	2,52	0,12	32,25	0,09	0,00	23,26	0,06
	10,75	0,45	0,03	7,55	0,09	10,75	0,02	0,00	25,17	0,05
	3,58	0,31	0,07	9,02	0,05	3,58	0,98	0,00	-1,47	0,02
	1,19	0,31	0,02	8,64	0,30	1,19	0,98	0,00	-1,35	0,04
	0,40	0,26	0,03	11,28	0,62	0,40	0,98	0,00	-1,45	0,03
	0,13	0,19	0,01	12,75	0,42	0,13	0,89	0,02	-1,32	0,09
sin tratar	32,25	0,13	0,02	15,06	0,73	32,25	0,58	0,05	2,65	0,28
	10,75	0,06	0,01	15,61	1,11	10,75	0,23	0,05	15,10	0,22
	3,58	0,04	0,00	16,27	0,46	3,58	0,08	0,00	23,21	0,82
	1,19	0,04	0,00	18,29	1,14	1,19	0,00	0,00	25,96	1,35
	0,40	0,00	0,00	18,29	1,14	0,40	0,00	0,00	25,96	1,35
	0,13	0,00	0,00	18,29	1,14	0,13	0,00	0,00	25,96	1,35

[00653]Para el análisis de proteína KLKB1, los PHH se transfectaron con guía de KLKB1 humana, G012267 y las células se lisaron el día 8 después de la transfección y los extractos de células enteras se sometieron a análisis de transferencia Western como se describe en el Ejemplo 1. Los niveles de proteína KLKB1 humana a lo largo de la curva de respuesta a la dosis de 7 puntos se compararon con el control no tratado y se normalizaron a GAPDH como se muestra en la Figura 7E.

Ejemplo 4 – Análisis secundario de guías de KLKB1

[00654]Se utilizó el método bioquímico descrito en el Ejemplo 1 para determinar los potenciales sitios genómicos secundarios escindidos por Cas9 que se dirige a KLKB1. Las guías seleccionadas en función de los resultados de los experimentos descritos anteriormente se evaluaron en busca de potenciales sitios de escisión genómica secundarios. Se evaluaron dieciséis guías dirigidas a KLKB1 para la escisión genómica secundaria contra el ADN genómico de las células HEK293 a una concentración de 16 nM (ATCC, N.º de cat. #CRL-1573). La guía de KLKB1 G012267 y las guías de control con perfiles secundarios conocidos se incluyeron en los experimentos (G000644 dirigida a EMX1 para la que se detectaron 281 sitios

secundarios, G00045 dirigida a VEGFA para la que se detectaron 6602 sitios secundarios); Frock *et al.*, 2015, Tsai *et al.*, 2015) se evaluaron para detectar la escisión genómica secundaria contra el ADN genómico de PBMC humanas agrupadas a una concentración de 64 nM. La cantidad de potenciales sitios secundarios detectados en el ensayo bioquímico mediante el uso de ADN genómico de células HEK 293 se muestra en la Tabla 14A. La cantidad de potenciales sitios secundarios detectados en el ensayo bioquímico mediante el uso de ADN genómico de PBMCs se muestra en la Tabla 14B. Se indica el porcentaje de sitios secundarios detectados por el ensayo llevado a cabo en la presente en comparación con la cantidad de sitios secundarios indicados en la literatura para la guía de EMX1 y la guía de VEGFA.

Tabla 14A. Análisis bioquímico secundario con ADN genómico de células HEK293

ID de guía	Diana	Concentración de guía (nM)	Sitios secundarios
G012253	KLKB1	16	122
G012259	KLKB1	16	77
G012260	KLKB1	16	153
G012267	KLKB1	16	136
G012278	KLKB1	16	153
G012279	KLKB1	16	0
G012280	KLKB1	16	292
G012293	KLKB1	16	126
G012294	KLKB1	16	132
G012298	KLKB1	16	155
G012303	KLKB1	16	45
G012304	KLKB1	16	42
G012305	KLKB1	16	48
G012308	KLKB1	16	116
G012321	KLKB1	16	107
G012323	KLKB1	16	14

Tabla 14B. Análisis bioquímico secundario con ADN genómico de PBMC humanas

Guía	Diana	Sitios secundarios (porcentaje*)
G012267	KLKB1	61
G000644	EMX1	242/281 (86 %)
G000645	VEGFA	4431/6602 (67 %)

*El porcentaje es relativo al número conocido de sitios secundarios para cada uno de los sitios diana de la guía.

Ejemplo 5. Secuenciación dirigida para validar posibles sitios secundarios

[00655] Las guías de KLKB1 se seleccionaron en función de los experimentos anteriores para una evaluación adicional. El enfoque secundario específico descrito en el Ejemplo 1 se utilizó para evaluar la actividad de indel de la diana para los potenciales sitios secundarios asociados con estas guías. Los sitios secundarios

evaluados analizados en el experimento se identificaron mediante los experimentos de ensayo bioquímico descritos en el Ejemplo 4 o con predicción *in silico* como se describe en el Ejemplo 1.

[00656]En este experimento, se evaluaron 3 sgARN dirigidos a KLKB1 humana. Los PHH se cultivaron y se transfectaron con LNP que comprendían mARN de Cas9 y sgARN de interés (por ejemplo, un sgARN que tiene potenciales sitios secundarios para la evaluación) como se describe en el Ejemplo 1. El ADN genómico se aisló del PHH y se sometió a NGS y análisis secundarios dirigidos como se describe en el Ejemplo 1.

[00657]El número de potenciales sitios secundarios evaluados en el ensayo y de esos sitios, los sitios secundarios que se caracterizaron con éxito por el ensayo seguido de los sitios que se validaron mediante inspección manual como se muestran en la Tabla 15A.

Tabla 15. Análisis secundario dirigido

ID de guía	Sitios secundarios evaluados	Sitios secundarios caracterizados	Sitios secundarios validados
G012260	223	206	5
G012267	181	171	1
G012293	360	347	4

Ejemplo 6. Edición *in vivo* del locus de KLKB1 humanizada en el modelo de ratón Hu KLKB1

[00658]En este estudio se utilizaron ratones humanizados que expresan la proteína KLKB1 humana (modelo de ratón Hu KLKB1). El modelo de ratón Hu KLKB1 comprende un locus de *KLKB1* humanizada en el que la región desde el codón de inicio hasta el codón de terminación de la KLKB1 de ratón se reemplazó con la secuencia genómica humana correspondiente. Los animales se pesaron y se dosificaron en volúmenes específicos para el peso corporal individual. Hubo 5 grupos en total (N = 4 con 2 ratones machos y 2 hembras).

[00659] Las LNP que contenían sgARN modificados (G12260, G12267, G12293, G12303 y G12321) y el mARN de Cas9 se dosificaron a través de la vena lateral de la cola a 0,3 mg/kg en función de la carga total de ARN en un volumen de 10 ml por kilogramo de peso corporal. Los LNP finales se caracterizaron para determinar la eficiencia de encapsulación, el índice de polidispersidad y el tamaño de partícula promedio de acuerdo con los métodos analíticos descritos en el Ejemplo 1. En el día 11 posterior a la administración de LNP, se sacrificaron los ratones y se recolectó

tejido hepático para la extracción de ADN. Los tejidos se lisaron mediante el uso de una gradilla de lisis de microesfera Bashing Zymo Research y el ADN se extrajo mediante el kit de extracción de ADN de Zymo Research de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN extraído se sometió a PCR para enviarse a secuenciación.

[00660]Se recolectó la sangre en tubos separadores de suero y se coaguló durante 2 horas a temperatura ambiente seguido de centrifugación. Se llevó a cabo ELISA en alícuotas de suero y se diluyó en una placa de 96 cavidades.

[00661]La edición observada en los ratones tratados se muestra en la Figura 8A y la Tabla 16A.

Tabla 16A. Edición *in vivo* de datos en el modelo de ratón Hu KLKB1

Guía	% de edición	SD de edición	N
G12260	32,9	10,96	4
G12267	72,83	1,17	4
G12293	43,05	5,59	4
G12303	14,38	5,60	4
G12321	35,53	11,11	4

[00662]Los niveles de proteína KLKB1 humana en suero, antes y después de la dosis, se midieron mediante el ensayo ELISA como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 16B y la Figura 8B.

Tabla 16B. Niveles de proteína KLKB1 secretada en el modelo de ratón Hu KLKB1

Guía	Dosis (mpk)	Antes de la dosis	SD	Después de la dosis	SD	N
G12260	0,3	19,04	6,20	13,10	7,96	4
G12267	0,3	22,48	9,32	1,42	0,41	4
G12293	0,3	18,54	5,41	7,59	2,10	4
G12303	0,3	21,21	9,98	23,11	8,58	4
G12321	0,3	18,07	5,21	11,22	4,51	4

[00663]Los niveles de proteína KLKB1 humana en suero de las muestras se midieron mediante el uso de la matriz basada en electroquimioluminiscencia (MSD) como se describe en el Ejemplo 1 y se compararon con los niveles iniciales. Los resultados se muestran en la Tabla 17 y la Figura 8C.

Tabla 17. Nivel de proteína KLKB1 *in vivo*

Guía	Dosis (mpk)	Antes de la dosis	SD	Después de la dosis	SD	% de KD en suero	N
G12260	0,3	10,44	0,43	6,84	0,09	38	4

Guía	Dosis (mpk)	Antes de la dosis	SD	Después de la dosis	SD	% de KD en suero	N
G12267	0,3	10,59	0,37	BLOD*	-	97**	2
G12293	0,3	10,74	0,24	3,92	0,04	64	4
G12303	0,3	13,86	0,34	7,78	0,35	35**	4
G12321	0,3	8,38	0,1	3,92	0,16	55	4

* Por debajo del límite de detección; ** aproximado

[00664] Los niveles de mRNA de KLKB1 para cada secuencia se midieron mediante PCR cuantitativa como se describe en el Ejemplo 1 y se muestra en la Tabla 18 y la Figura 8D. La reducción de proteínas se confirmó mediante análisis de transferencia Western como se describe en el Ejemplo 1.

Tabla 18. Resultados de qPCR

Guía	Relación de cambio	SD	N
G12260	1,20	0,35	4
G12267	0,51	0,41	4
G12293	0,73	0,22	4
G12303	1,10	0,23	4
G12321	1,18	0,41	4
TSS	1,01	0,17	2

Ejemplo 7. Edición *in vivo* de la actividad de las guías de KLKB1 humana en el modelo de ratón Hu KLKB1

[00665] En este estudio se usaron ratones KLKB1 humanizados descritos en el Ejemplo 6 y se prepararon mediante el uso del mismo protocolo. Hubo 5 grupos en total (N=5 con 2 ratones machos y 3 hembras o viceversa). Las LNP que contenían sgARN modificados y mRNA que codifican la proteína Cas9 se dosificaron a través de la vena lateral de la cola a 0,3 mg/kg y se caracterizaron como se describe en el Ejemplo 6.

[00666] En el día 13 después de la administración de LNP, los ratones se sacrificaron. El tejido hepático y la sangre se procesaron como se describe en el Ejemplo 6 para la secuenciación y el análisis ELISA.

[00667] La Tabla 19 y las Figuras 9A-9D muestran los niveles de edición de KLKB1, proteína de precalicreína sérica (detectada mediante el uso de un ELISA que detecta tanto precalicreína como calicreína) (ug/ml), proteína precalicreína como porcentaje del nivel de proteína KLKB1 en TSS de control en ratones tratados, y la correlación del porcentaje de edición hepática al porcentaje de proteína precalicreína, respectivamente. Se evaluaron las guías G012323 y G012253; sin embargo, no se detectó la edición debido a una falla del método de NGS.

Tabla 19. Porcentaje de edición y precalicreína en suero de ciertas guías en el modelo de ratón Hu-KLKB1

Dosis (mpk)	Guía	Muestra	% de edición	Precalicroína en suero (µg/ml)	Precalicroína en suero (Media del % de TSS)
0	TSS	Media	0,1	19,49	100
		Animal 1	0,1	14,77	76
		Animal 2	0,1	18,29	94
		Animal 3	0,1	14,82	76
		Animal 4	0,1	26,82	138
		Animal 5	0,1	22,76	117
0,3	G012304	Media	21,9	12,4	64
		Animal 1	24,7	9,53	49
		Animal 2	21,0	9,88	51
		Animal 3	29,3	7,94	41
		Animal 4	18,8	20,32	104
		Animal 5	15,9	14,34	74
	G012305	Media	26,0	10,58	54
		Animal 1	20,6	9,09	47
		Animal 2	32,5	8,85	45
		Animal 3	27,9	8,13	42
		Animal 4	22,7	14,08	72
		Animal 5	26,5	12,75	65
	G012259	Media	24,2	10,88	56
		Animal 1	41,0	5,83	30
		Animal 2	20,3	9,96	51
		Animal 3	27,6	7,42	38
		Animal 4	9,4	17,83	91
		Animal 5	22,8	13,36	69
	G012278	Media	24,0	10,91	56
		Animal 1	29,8	7,15	37
		Animal 2	35,2	6,99	36
		Animal 3	28,6	6,16	32
		Animal 4	18,2	17,21	88
		Animal 5	8,0	17,07	88
	G012280	Media	13,8	14,71	75
		Animal 1	21,4	10,70	55
		Animal 2	24,0	8,92	46
		Animal 3	4,8	20,46	105
		Animal 4	8,9	17,34	89
		Animal 5	9,7	16,11	83
	G012294	Media	15,9	15,4	79
		Animal 1	21,1	10,38	53
		Animal 2	15,9	9,69	50
		Animal 3	15,2	15,37	79
		Animal 4	14,9	19,13	98
		Animal 5	12,4	22,44	115
	G012298	Media	36,9	9,05	46
		Animal 1	40,8	4,99	26
		Animal 2	46,6	5,26	27
		Animal 3	44,9	5,38	28
		Animal 4	25,3	15,01	77
		Animal 5	26,9	14,61	75

Ejemplo 8. Respuesta a la dosis *in vivo* de la edición del gen KLKB1 en el modelo de ratón Hu KLKB1

[00668]En este estudio se usaron ratones humanizados descritos en el Ejemplo 6 y se prepararon mediante el uso del mismo protocolo. Hubo 5 grupos en total (N=5 con 2 ratones machos y 3 hembras o viceversa). Las LNP que contenían G12267 y mARN que codifica la proteína Cas9 se dosificaron a 0,3, 0,1, 0,03 y 0,01 mg por kg de peso corporal y se caracterizaron como se describe en el Ejemplo 6.

[00669]En el día 13 después de la administración de LNP, los ratones se sacrificaron.

El tejido hepático se procesó como se describe en el Ejemplo 6 para la secuenciación de ADN. Se procesó la sangre como se describe en el Ejemplo 6 y se midió la precalicreína humana secretada a través de un ELISA, que detecta precalicreína y calicreína (también denominada calicreína total), como se describe en el Ejemplo 1.

[00670]Para el análisis de ARN, el tejido hepático se lisó mediante el uso de una gradilla de lisis de microesfera Bashing de Zymo Research, y el ARN se extrajo mediante el uso de Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, N.º de cat. 74106) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se cuantificó el ARN con un Nanodrop 8000 (ThermoFisher Scientific, N.º de cat. ND-8000-GL). Las muestras de ARN se almacenaron a -20 °C antes de su uso.

[00671]Se usó SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, N.º de cat. 11732-088) para crear las reacciones de PCR. En las reacciones se utilizaron sondas de PCR cuantitativas dirigidas a Hu *KLKB1* y control interno Ms *PP1B*. El ensayo de PCR cuantitativa se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, se ajustó al volumen de reacción adecuado y se utilizaron las sondas Hu *KLKB1* y Ms *PP1B* especificadas anteriormente. Se utilizó el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, N.º de cat. 4376600) para llevar a cabo la reacción de PCR en tiempo real y la cuantificación de transcritos de acuerdo con el protocolo del fabricante.

[00672]Se cuantificó el *mARN* de Hu *KLKB1* mediante el uso de una curva estándar que comenzaba en 20 ng/μl de *mARN* agrupado del grupo de control con vehículo, con cinco diluciones triples adicionales que terminaban en 0,06 ng/μl. Los valores de Ct se determinaron a partir del sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus. La reducción de la proteína precalicreína humana secretada total para las células tratadas con reactivos *KLKB1* se determinó mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 1.

[00673]La Tabla 20 y la Figura 10 muestran el porcentaje de edición, niveles precalicreína en suero como un porcentaje de los ratones tratados con el control del vehículo de TSS y los niveles de transcripción de *mARN* como un porcentaje de los animales tratados con el control del vehículo de TSS.

Tabla 20 Porcentaje de edición, *mARN* de *KLKB1* (% del nivel inicial) y niveles de proteína precalicreína en suero (% del nivel inicial) en el modelo de ratón Hu

KLKB1

Guía	Dosis (mpk)		% de edición	% de proteína de TSS	% de mARN de TSS	SD
TSS	0	Media	0,1	100	100,5	9,7
		Animal 1	0,1	75,8		
		Animal 2	0,1	93,8		
		Animal 3	0,1	76,0		
		Animal 4	0,1	137,6		
		Animal 5	0,1	116,8		
G12267	0,01	Media	3,9	91,9	100,1	9,5
		Animal 1	4,4	55,3		
		Animal 2	3,8	57,3		
		Animal 3	4,5	126,2		
		Animal 4	4,2	122,2		
		Animal 5	2,6	98,6		
	0,03	Media	19,0	64,2	69,3	13,8
		Animal 1	22,1	38,6		
		Animal 2	0,3	51,0		
		Animal 3	26,9	78,9		
		Animal 4	21,3	80,5		
		Animal 5	24,3	72,2		
	0,1	Media	55,4	23,3	48	11,4
		Animal 1	52,1	17,6		
		Animal 2	52,7	19,6		
		Animal 3	56,5	25,3		
		Animal 4	57,5	25,6		
		Animal 5	58,0	28,3		
	0,3	Media	72,9	3,1	23	13
		Animal 1	73,9	2,7		
		Animal 2	70,4	2,9		
		Animal 3	72,7	3,1		
		Animal 4	73,1	3,4		
		Animal 5	74,3	3,4		

Ejemplo 9. Estudio de fuga vascular

[00674]Se llevó a cabo un estudio para evaluar la edición del gen *KLKB1*, la expresión de proteína calicreína total y la fuga vascular en ratones humanizados. En este estudio se usaron los ratones humanizados descritos en el Ejemplo 1. Hubo 6 grupos en total (N=5 con 2 ratones machos y 3 hembras por grupo). Los animales se pesaron y se dosificaron en volúmenes específicos para el peso corporal individual.

[00675]Las LNP que contenían una *KLKB1* modificada dirigida a sgARN (G12267) y el mARN de Cas9 se dosificaron a través de la vena lateral de la cola a 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, o 0,3 mg/kg en función de la carga de ARN total en un volumen de 10 ml por kilogramo de peso corporal o control de vehículo (TSS).

[00676]Un día antes del estudio de fuga vascular, se recolectó sangre y se procesó como se describe en el Ejemplo 6, y se midió la precalicreína humana secretada a través de un ELISA, que detecta precalicreína y calicreína (también denominada calicreína total), como se describe en el Ejemplo 1.

[00677]El ensayo de fuga vascular se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1. En la necropsia, se recolectó tejido hepático y se extrajo el ADN como se describe en

el Ejemplo 6 para medir la edición de KLKB1. Para la cuantificación del tinte en el modelo de fuga vascular, se recolectó y procesó tejido de colon como se describe en el Ejemplo 1.

[00678] Los resultados para el porcentaje de edición, los niveles de proteína hu KLKB1 en suero y la fuga vascular se muestran en la Tabla 21 y las Figuras 11A-11B.

Tabla 21. Porcentaje de edición, niveles de proteína KLKB1 y fuga vascular en ratones huKLKB1

	Dosis (mg/kg)	% de edición	Precalicerina en suero (µg/ml)	Colon (OD)
TSS-1	0	0,02	100,00	0,07
TSS-2	0	0,06	94,92	0,22
Control	0,3	0,1	92,99	0,30
G012267	0,03	16,48	82,97	0,26
G012267	0,1	40,46	48,97	0,20
G012267	0,3	68,66	13,88	0,09

[00679] Se realizó un estudio separado mediante el uso de métodos similares para evaluar el porcentaje de edición, los niveles de precalicerina sérica y la fuga vascular para determinar la durabilidad durante un período de 9 meses. Los ratones se dosificaron con KLKB1 modificada dirigida a sgARN (G12267) y el mARN de Cas9 o un mARN no dirigido se dosificó a través de la vena lateral de la cola a 0,1 mg/kg o 0,3 mg/kg en función de la carga de ARN total en un volumen de 10 ml por kilogramo de peso corporal. Se observó la durabilidad de la respuesta a la dosis donde se mantuvo el aumento de la edición, la disminución de los niveles de proteína y la disminución de los niveles de fuga vascular durante la duración del estudio.

Ejemplo 10. Pruebas *in vivo* de la edición del gen KLKB1 en primates no humanos (NHP)

[00680] En este ejemplo, se realizó un estudio para evaluar la edición del gen KLKB1 y la expresión de la proteína calicerina total, y los niveles de actividad de calicerina total en *Macaca fascicularis* luego de la administración de nanopartículas lipídicas (LNP) CRISPR/Cas9 con mARN para la proteína Cas9 y varias guías para el gen *KLKB1*. Los *Macaca fascicularis* se trataron en cohortes de n=3. Este estudio se realizó con formulaciones de LNP de acuerdo con Ejemplo 1. Cada formulación de LNP contenía un mARN de Cas9 poliadenilado (que comprende SEQ ID NO: 516) y gARN (G013901, un ARN guía de KLKB1 específico de *Macaca fascicularis*) con una relación mARN:gARN de 2:1 en peso. Los animales recibieron dosis de 1,5, 3 o 6 mg por kg en función de la carga de ARN total. La formación de indel (porcentaje de edición) se midió mediante NGS. La actividad de calicerina total y el nivel de proteína

de calicreína en suero se midieron como se describe en el Ejemplo 1.

[00681] El estudio mostró que la inactivación de KLKB1, que es parte de una vía biológica que da como resultado la liberación de bradiquinina, con G013901 produjo una reducción de hasta el 90 % en la actividad de la calicreína en los grupos de NHP, o más, una respuesta sólida que supera la actividad objetivo mostrada. para lograr un impacto terapéuticamente significativo en las tasas de ataque de HAE (60 % de reducción de la actividad de calicreína; Banerji, 2017). Este estudio mostró una correlación dependiente de la dosis entre el aumento de las tasas de edición, la reducción de los niveles de calicreína en plasma y la reducción de la actividad de calicreína. La respuesta ha sido duradera durante un año en los NHP. Los niveles de proteína y actividad de la calicreína en circulación se proporcionan en las Tablas 22 y 23; y las Figuras 12A-12B.

Tabla 22. Actividad de calicreína (% de actividad basal)

Día	TSS (n=3)		1,5 mpk (n=3)		3 mpk (n=3)		6 mpk (n=3)	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0	100	0	100	0	100	0	100	0
7	108,4	9	67,8	7	42,8	12,4	18,2	10,6
14	101,8	18,3	31,1	3,2	15,9	11	5,3	1,6
28	124,4	7,9	26,8	6,5	10,6	5,4	3,9	1,4
42	117,8	5,8	19,8	11,9	8,6	4,4	3,6	0,4
56	130,3	32,5	8,8	5	3,4	0,6	4,2	2,2
70	109,2	15	6	1,7	3	0,4	3,9	1,6
84	121,3	25,7	10,6	3,8	4,2	2,1	4,7	2,5
105	130,8	15,5	23,3	4,9	6	3,6	4,7	2,5
119	88,2	9,1	12,2	10,2	3,4	0,5	3	0,5
147	101,1	3,3	11,9	6,6	4,5	1,4	3	0,5
161	113,2	13,4	21	1,8	6	2,8	5,6	1,8
180	122,3	8,7	19,2	9,5	4,7	1	5	1,9
238	125,5	27,3	16,6	6,5	4,7	1,4	3,2	0,7
252	122,7	27	19,1	7,3	8,2	4,4	3,1	0,7
266	115	23,3	13,9	3,3	8,9	5,2	2,7	0,6
280	112,2	22,7	17,5	2,3	6,8	3,6	3	1
294	126,3	34,1	17	5,8	7,9	4,1	2,9	0,6
308	122,9	28,9	18,2	2,3	7,4	3,3	3	0,8
326	111,6	23	13,3	5,2	5,5	2,9	3,5	0,4
333	127,3	22,4	15,9	1,8	6,8	2,8	3,3	0,4
347	108,4	11,7	16,9	1	4,1	1,8	2,9	0,3
365	118	2,2	24,1	10,2	10	5,7	3,4	0,7

Tabla 23. Calicreína en plasma niveles de proteína (% de nivel inicial)

Día	TSS (n=3)		1,5 mpk (n=3)		3 mpk (n=3)		6 mpk (n=3)	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0	100	0	100	0	100	0	100	0
14	101,3	14,9	28,8	7,4	27,1	8,2	13,7	3,3
28	117,7	7	32,7	8,5	16,9	6,8	6,6	2,3
42	112,6	23,5	31,5	9,1	16	7	6,3	2,8
56	111	16	30,1	8,8	15,4	6	5,8	2,5
70	112,5	14,1	29,8	8	15,4	5,8	5,8	2,8
84	133,6	9	38,7	11,1	17,1	6,7	6,7	2,5
105	118,2	20,1	47	12,7	22,3	10,3	7,6	3,8
119	96	9,8	31,6	8,7	18,1	7,2	6,4	2,2
147	110,7	12	32,1	8,3	18,3	8,1	6,7	2,2

	TSS (n=3)		1,5 mpk (n=3)		3 mpk (n=3)		6 mpk (n=3)	
161	119,3	6,1	35,8	10,5	7,5	6,8	7,4	3,5
180	131	10,1	33,8	11,4	18	10,1	2,9	1
238	106,2	3,7	27,4	10,8	16,4	9,8	3,7	0,9
252	114,3	21,4	27,9	9,1	15,6	7,1	3,9	0,8
266	117,6	8,7	28,7	9,7	21,8	10,4	3,7	0,5
280	93,4	22,1	33,7	7,1	24,6	9,8	6,3	2,9
294	122,1	23,7	30,4	13,8	24,6	14	7,4	4
308	93,2	12,8	20,6	13,8	27,6	14,2	6,2	3,1
326	N/A		29,7	7,3	23,8	12,5	8	2,8
333	130,2	25,5	30,9	6,4	25,3	12,4	7,8	2,3
347	106,9	15	26	8,2	22,1	11,2	7,3	3,2
365	108,5	41,3	22,7	8	11,4	5,3	4,3	1,6

[00682]En las pruebas de muestras de suero de NHP seleccionadas no se encontró un impacto observado en los biomarcadores de la vía de coagulación con la inactivación de KLKB1 en NHP en las semanas 10 o 15 (en función de la medición de protrombina, APTT y fibrinógeno (todo en la semana 10), y el Factor XII (en la semana 15)) al comparar los grupos de control de amortiguador de TSS con los grupos tratados.

[00683]Se repitió el estudio NHP para evaluar la expresión de la proteína de calicreína total de *KLKB1* y los niveles de actividad de calicreína total en *Macaca fascicularis* mediante el uso de la guía G012267 que incluye una secuencia de guía totalmente complementaria a la *KLKB1* humana. La secuencia guía de G012267 tiene una diferencia de nucleótidos en comparación con G013901 que tiene una secuencia guía totalmente complementaria a *KLKB1* de *Macaca fascicularis*. El protocolo experimental y las formulaciones de LNP en este estudio fueron esencialmente los mismos que se describen en el experimento anterior, excepto que los animales (n=3) solo recibieron una dosis de 3 mg por kg en función de la carga de ARN total. La actividad de calicreína total y los niveles de proteína de calicreína en suero se midieron a través de los métodos descritos en el Ejemplo 1.

[00684]El estudio mostró que la inactivación de *KLKB1* con G012267 produjo una reducción de hasta el 65 % en la actividad de calicreína en los grupos de NHP. La respuesta fue duradera durante 9 meses en los NHP. Los niveles de proteína y actividad de la calicreína en circulación se proporcionan en las Tablas 24 y 25; y las Figuras 13A-13B.

Tabla 24. Actividad de calicreína (% de actividad basal)

Día	TSS (n=3)		3 mpk (n=3)	
	Media	Desv. Est.	Media	Desv. Est.
0	100	N/A	100	N/A
7	90,9	13,7	68,7	11,3
15	87,7	6,6	51,3	18,7
28	90,5	2,5	39,3	24
42	96,5	4,8	31,9	19,5
56	94,5	1,6	34,1	16,7

	TSS (n=3)		3 mpk (n=3)	
70	96,2	7,2	42,3	25,7
91	100,2	11,7	45,3	27,6
106	100,2	6,3	45,7	14,3
120	99,8	7,4	46,5	11,1
134	115,2	8,5	47,5	32,4
148	91,5	2	52,9	34,7
162	86,1	21,1	50,1	43,2
180	97,9	1,8	47,3	22,1
192	87,9	1,9	43	24,6
208	94,4	5,8	48	23
222	97	2,9	34,6	21,1
236	97,2	2,2	43,5	19,1
250	91,8	12	46,5	18,3
264	99,9	10,6	51,3	25,2
278	105,3	13,4	60,8	32,3

Tabla 25. Calicreína en plasma niveles de proteína (% de nivel inicial)

	TSS (n=3)		3 mpk (n=3)	
Día	Media	Desv. Est.	Media	Desv. Est.
0	100	N/A	100	N/A
7	99,6	5,1	72,3	13,3
15	89,7	13,1	50,6	9
28	93,9	5,2	52,8	22,3
42	90,3	8,6	52,7	25,5
56	104,2	17,3	49,9	19,1
70	93,9	5,2	52,8	22,3
91	90,3	8,6	52,7	25,5
106	99,3	21,9	43,1	17,3
120	121,7	12,6	41,1	6,2
134	104,2	12	49,7	5,5
148	93	15,8	47,5	11,8
162	100,3	15,7	56,2	26,7
180	106,8	10,9	44,1	33,2
192	96,5	20,5	52	26,6
208	105,6	25	52,9	28,5
250	103,7	21,5	63,3	17,4
264	101,4	7	67,3	15,4
278	94,3	14,4	62,6	16,7

REIVINDICACIONES

1. Un ARN guía que comprende:
 - a. una secuencia guía que comprende al menos un 95 %, 90 % u 85 % idéntico a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 15, 8 y 41;
 - b. una secuencia guía que comprende al menos 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 15, 8 y 41; o
 - c. una secuencia guía seleccionada de SEQ ID NO: 15, 8 y 41.
2. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 202.
3. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ARN guía comprende además una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 170, 171, 172 y 173, en donde la secuencia de SEQ ID NO: 170, 171, 172, o 173 es 3' de la secuencia guía.
4. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el ARN guía comprende además una cola 3'.
5. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el ARN guía comprende al menos una modificación.
6. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la modificación comprende una modificación del extremo 5'.
7. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde la modificación comprende una modificación del extremo 3'.
8. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el ARN guía comprende una modificación en una región de horquilla.
9. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metil (2'-O-Me).
10. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la modificación comprende un enlace de fosforotioato (PS) entre nucleótidos.
11. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-fluor (2'F).
12. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-11, que comprende además la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 171.
13. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 12, modificado de acuerdo con el patrón de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 405.
14. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-11, que

comprende además la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 173.

15. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 14, modificado de acuerdo con el patrón de SEQ ID NO: 248-255 o 450.

16. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en donde la secuencia guía es SEQ ID NO: 15.

17. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en donde la secuencia guía es SEQ ID NO: 8.

18. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en donde la secuencia guía es SEQ ID NO: 41.

19. El ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-11, en donde el ARN guía se modifica de acuerdo con el patrón de SEQ ID NO: 300, en donde las N son colectivamente la secuencia guía de acuerdo con la reivindicación 1.

20. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 16, en donde cada N en SEQ ID NO: 300 es cualquier nucleótido natural o no natural.

21. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la secuencia guía es SEQ ID NO: 15 y el ARN guía se modifica de acuerdo con mG*mG*mA*UUGCGUAUGGGACACAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU, en donde “mA,” “mC,” “mU,” o “mG” denotan un nucleótido que se ha modificado con 2'-O-Me, un * denota un enlace de fosforotioato y una N es un nucleótido natural.

22. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la secuencia guía es SEQ ID NO: 8 y el ARN guía se modifica de acuerdo con mU*mA*mC*CCGGGAGUUGACUUUGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU, en donde “mA,” “mC,” “mU,” o “mG” denotan un nucleótido que se ha modificado con 2'-O-Me, un * denota un enlace de fosforotioato y N es un nucleótido natural.

23. El ARN guía de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la secuencia guía es SEQ ID NO: 41 y el ARN guía se modifica de acuerdo con mU*mA*mU*UAUCAAUACAUUACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU, en donde “mA,” “mC,” “mU,” o “mG” denotan un nucleótido que se ha modificado con 2'-O-Me, un * denota un enlace de fosforotioato y N es un nucleótido natural.

24. Una composición que comprende un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23.
25. Una composición de acuerdo con la reivindicación 24, que comprende además un agente de fijación a ADN guiado por ARN o un ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN.
26. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el ácido nucleico que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN comprende un mARN que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un agente de fijación a ADN guiado por ARN.
27. La composición de acuerdo con la reivindicación 25 o 26, en donde el agente de fijación a ADN guiado por ARN es Cas9.
28. La composición de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la Cas9 es *S. pyogenes* Cas9.
29. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-28, en donde el ORF es un ORF modificado.
30. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-29, que comprende además un excipiente farmacéutico.
31. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-30, en donde el ARN guía está asociado con una nanopartícula lipídica (LNP).
32. La composición de acuerdo con la reivindicación 31, en donde la LNP comprende un lípido catiónico.
33. La composición de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el lípido catiónico 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)propilo (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato.
34. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31-33, en donde la LNP comprende (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)propilo (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato, DSPC, colesterol, y PEG2k-DMG.
35. Una composición farmacéutica que comprende un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-34.
36. Una composición farmacéutica que comprende o utiliza un ARN guía de

acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-34 para inducir una ruptura bicatenaria o una ruptura monocatenaria dentro de un gen KLKB1 en una célula o reducir la expresión de KLKB1 en una célula.

37. La composición farmacéutica o el uso de acuerdo con la reivindicación 36, para reducir la expresión del gen KLKB1 en una célula o sujeto.

38. Una composición farmacéutica que comprende o utiliza un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-34 para tratar a un sujeto que tiene angioedema hereditario (HAE).

39. La composición farmacéutica o el uso de acuerdo con la reivindicación 38, que comprende reducir la frecuencia y/o la gravedad de los ataques de HAE.

40. Una composición farmacéutica que comprende o utiliza un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-34 para tratar o prevenir el angioedema asociado con HAE, la producción y acumulación de bradiquinina, la hinchazón inducida por bradiquinina, la obstrucción de las vías respiratorias por angioedema o la asfixia.

41. Una composición farmacéutica o el uso de un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-34 para reducir la actividad de calicreína total en plasma o reducir los niveles de precalicreína y/o calicreína en un sujeto.

42. La composición farmacéutica o el uso de acuerdo con la reivindicación 41, en donde la actividad de calicreína total en plasma se reduce en más de 60 %.

43. Un método para inducir una ruptura bicatenaria o una ruptura monocatenaria dentro de un gen KLKB1 en una célula o reducir la expresión de KLKB1 en una célula que comprende poner en contacto una célula con un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-34.

44. El método de acuerdo con la reivindicación 43, en donde la célula está en un sujeto.

45. Un método para tratar un sujeto que tiene angioedema hereditario (HAE) que comprende administrar un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-34 y, de este modo, tratar al sujeto.

46. El método de acuerdo con la reivindicación 45, en donde el tratamiento del

sujeto comprende reducir la frecuencia y/o la gravedad de los ataques de HAE.

47. Un método para tratar o prevenir el angioedema asociado con HAE, la producción y acumulación de bradiquinina, la hinchazón inducida por bradiquinina, obstrucción de las vías respiratorias por angioedema o asfixia que comprende administrar al sujeto un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-34, y, de este modo, tratar o prevenir el angioedema asociado con HAE, la producción y acumulación de bradiquinina, la hinchazón inducida por bradiquinina, la obstrucción de las vías respiratorias por angioedema o la asfixia en el sujeto.

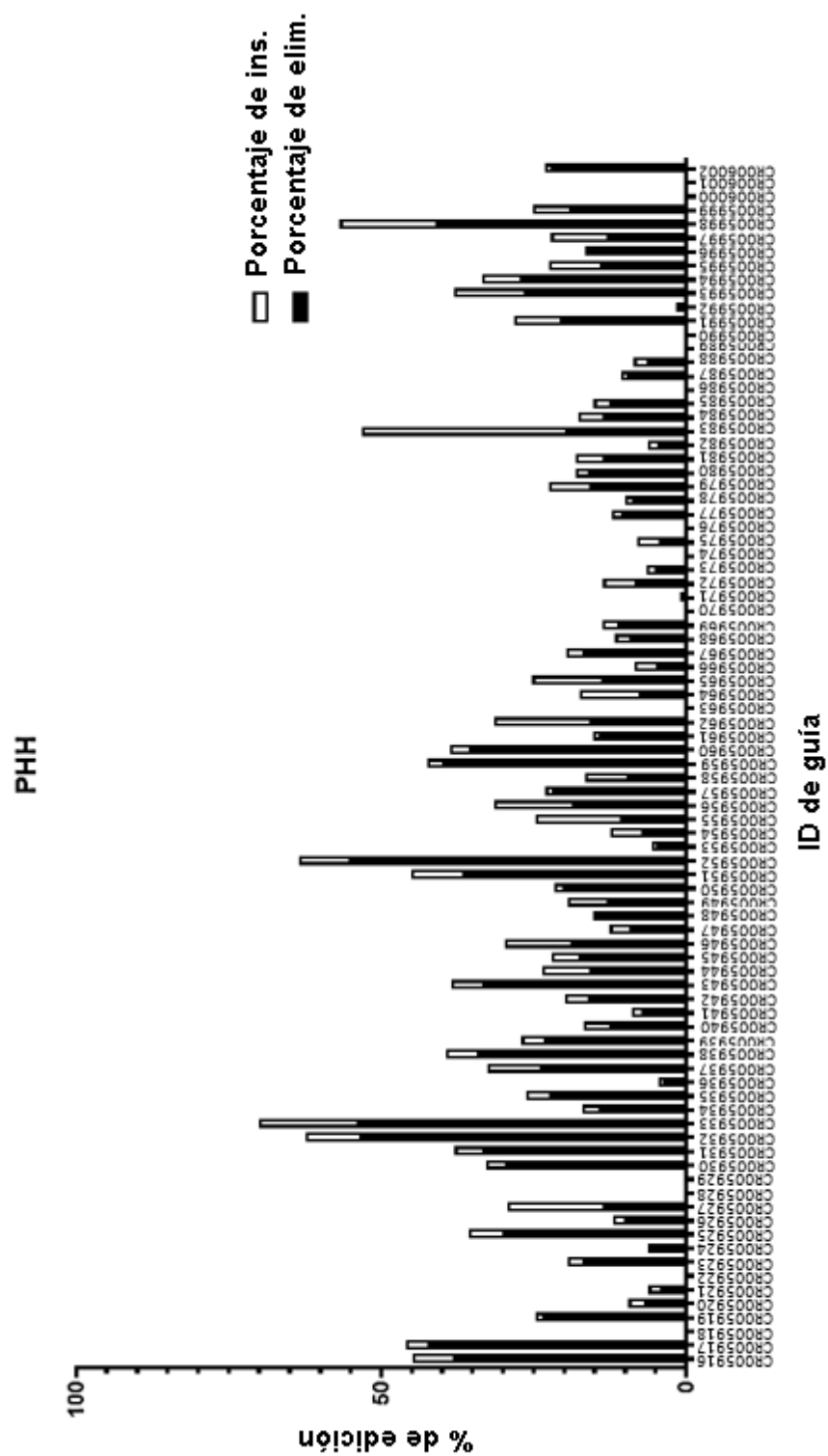
48. Un método para reducir la actividad de calicreína total en plasma en un sujeto que comprende administrar un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-34, y, de este modo, reducir la actividad de calicreína total en plasma en un sujeto.

49. El método de acuerdo con la reivindicación 48, en donde la actividad de calicreína total en plasma se reduce en más de 60 % en el sujeto.

50. El uso de un ARN guía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23 o la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-34 en la preparación de un medicamento para poner en práctica cualquiera de los métodos de acuerdo con las reivindicaciones 43-49.

RESUMEN

Se proporcionan composiciones y métodos para editar, por ejemplo, introducir roturas bicatenarias, dentro del gen *KLKB1*. Se proporcionan composiciones y métodos para tratar sujetos que tienen angioedema hereditario (HAE).



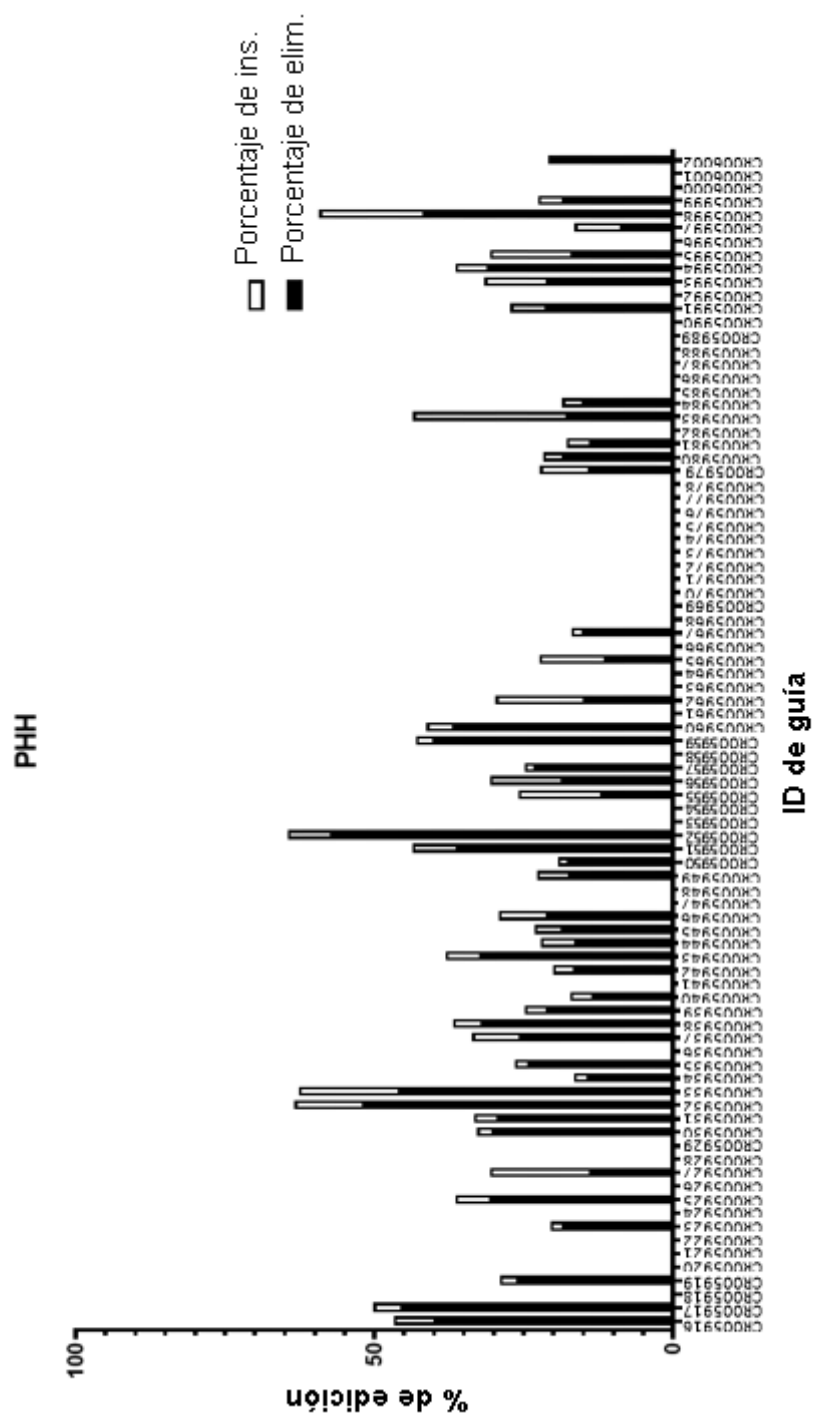


Figura 1B

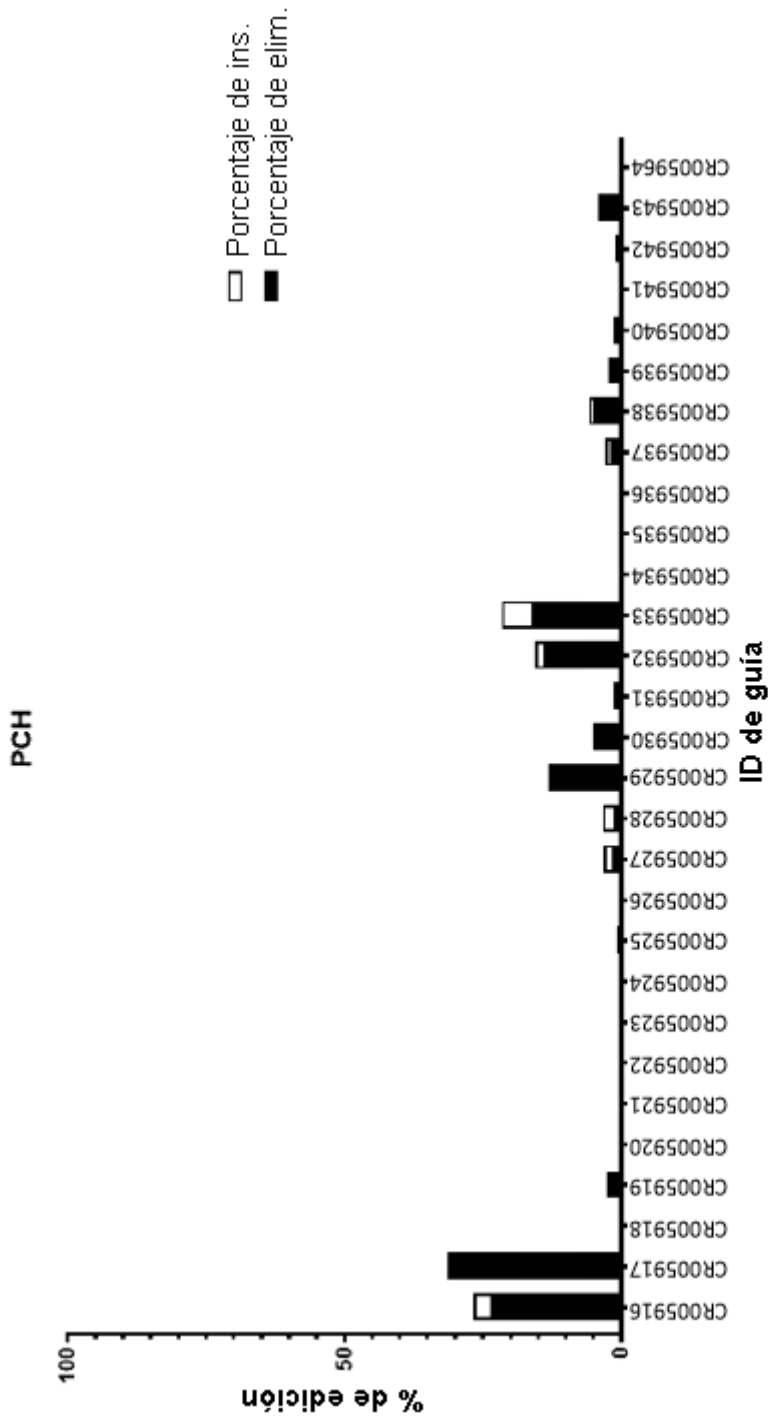


Figura 1C

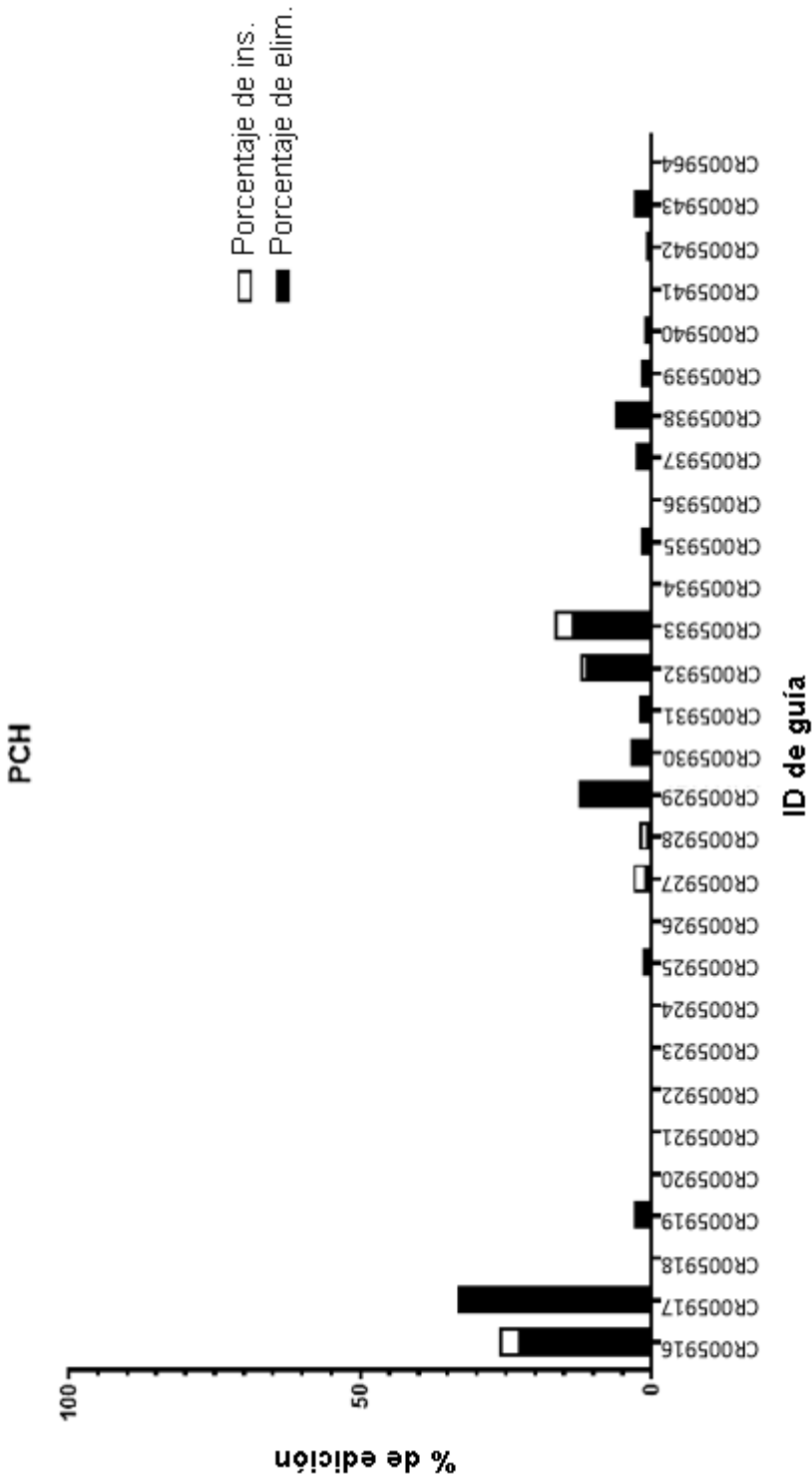
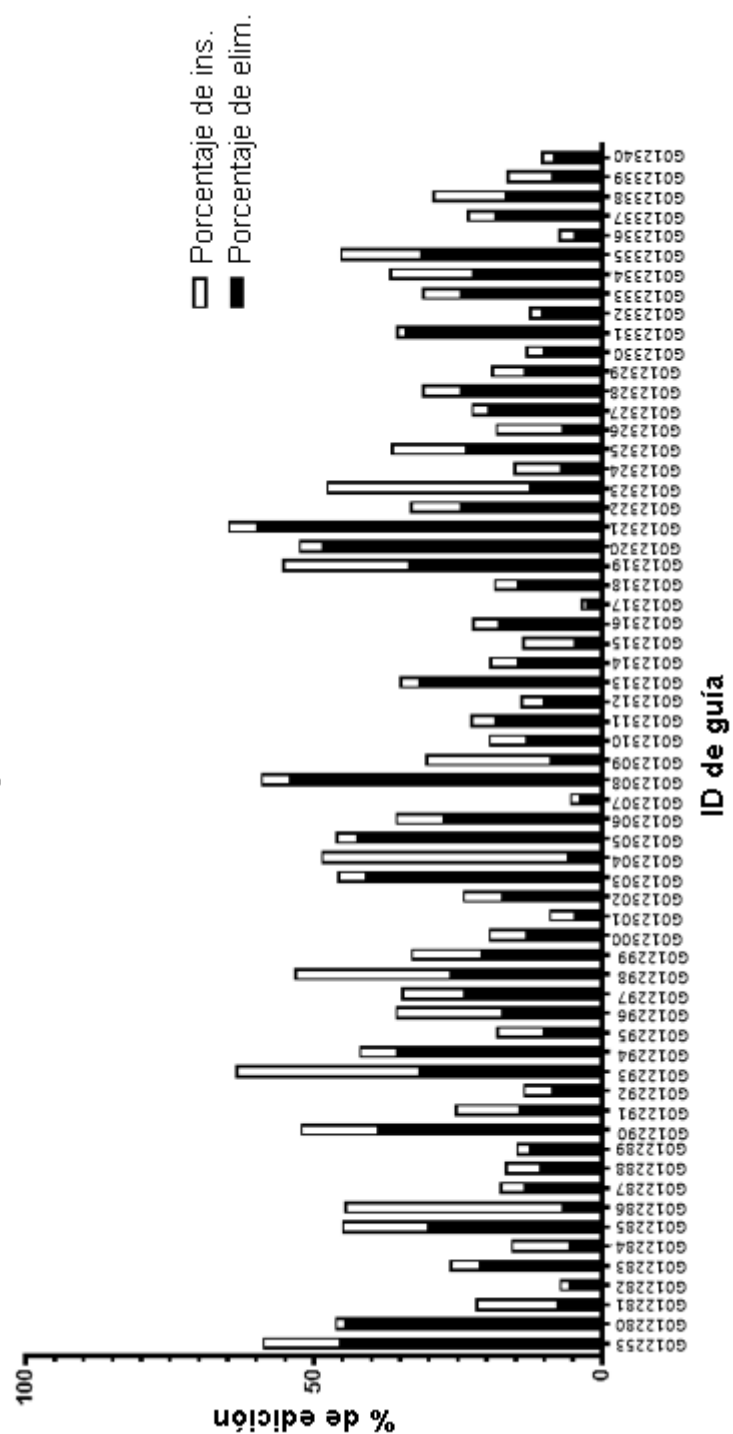


Figura 1D

Conjunto 1 PHH



ID de guía

Figura 2A

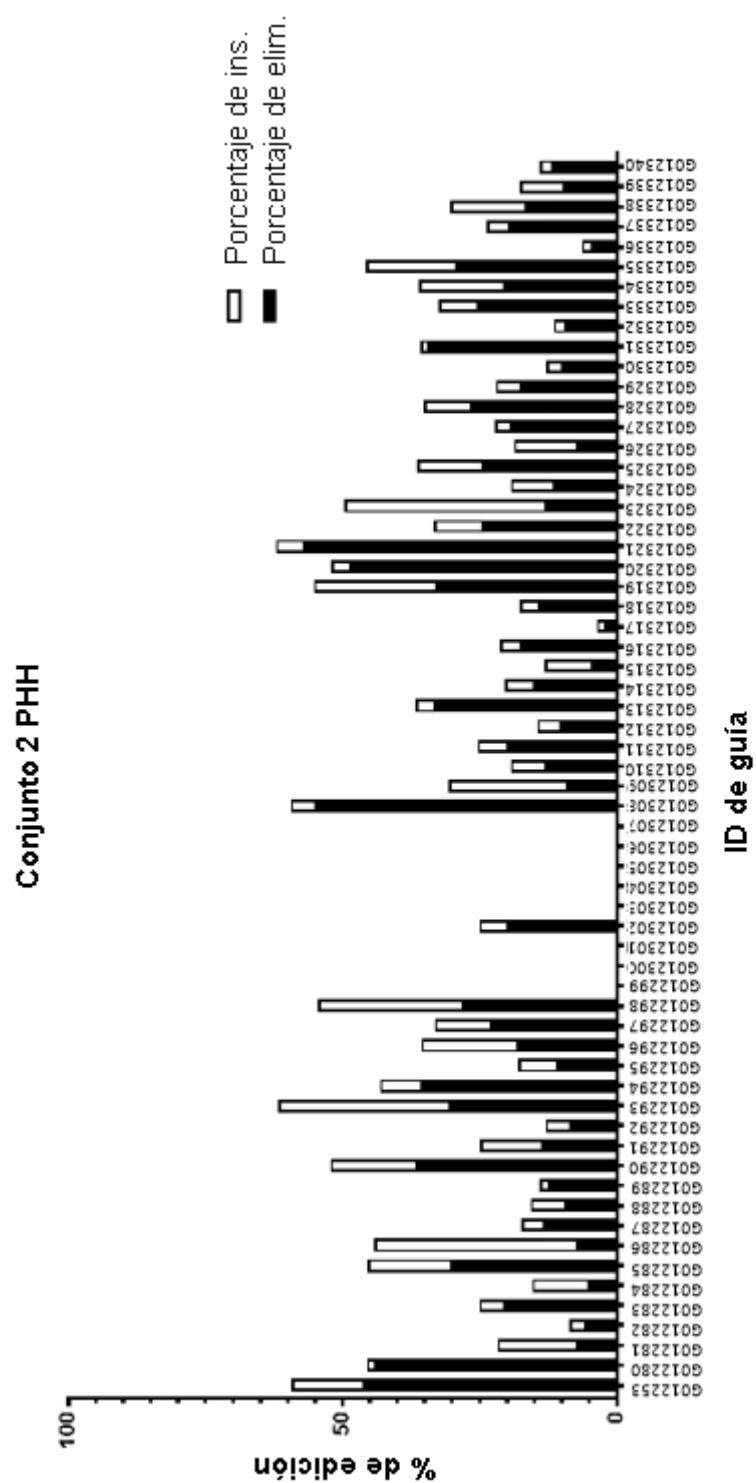


Figura 2B

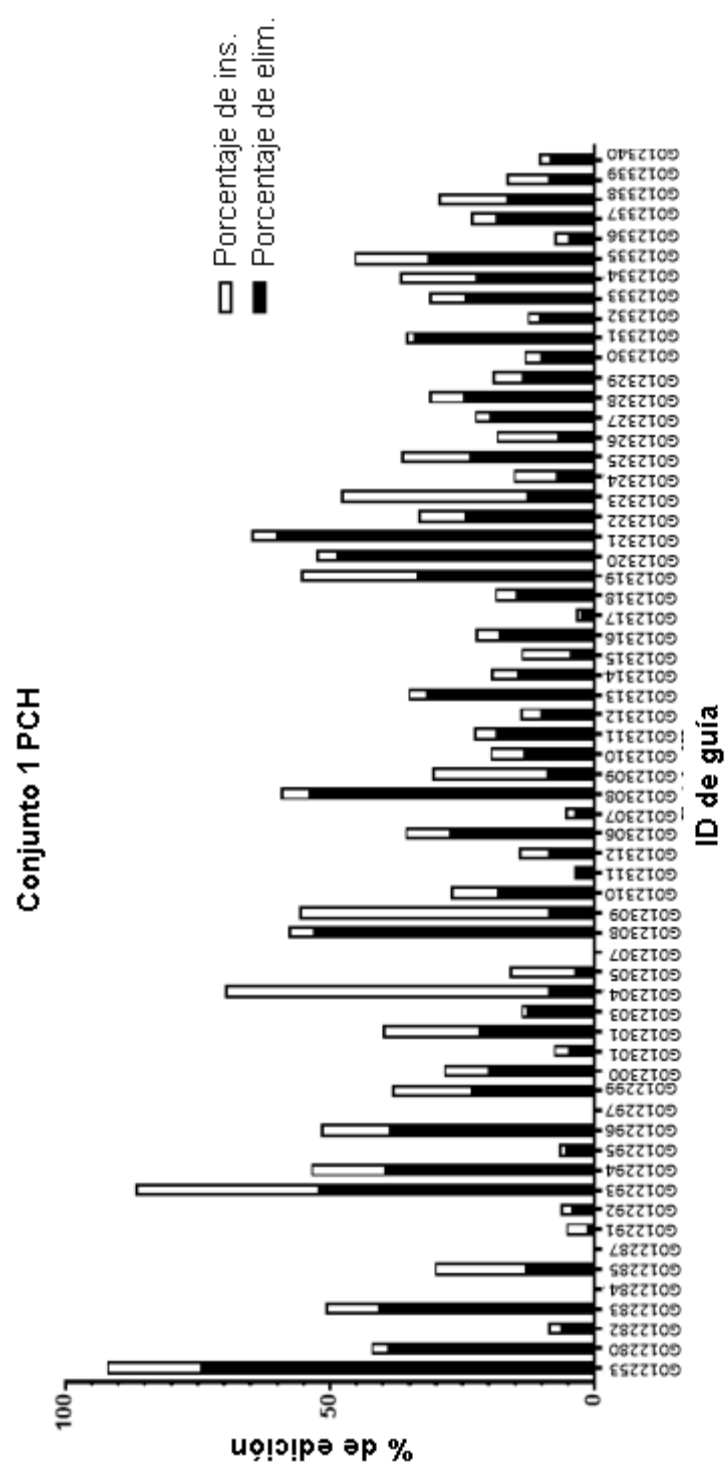


Figura 2C

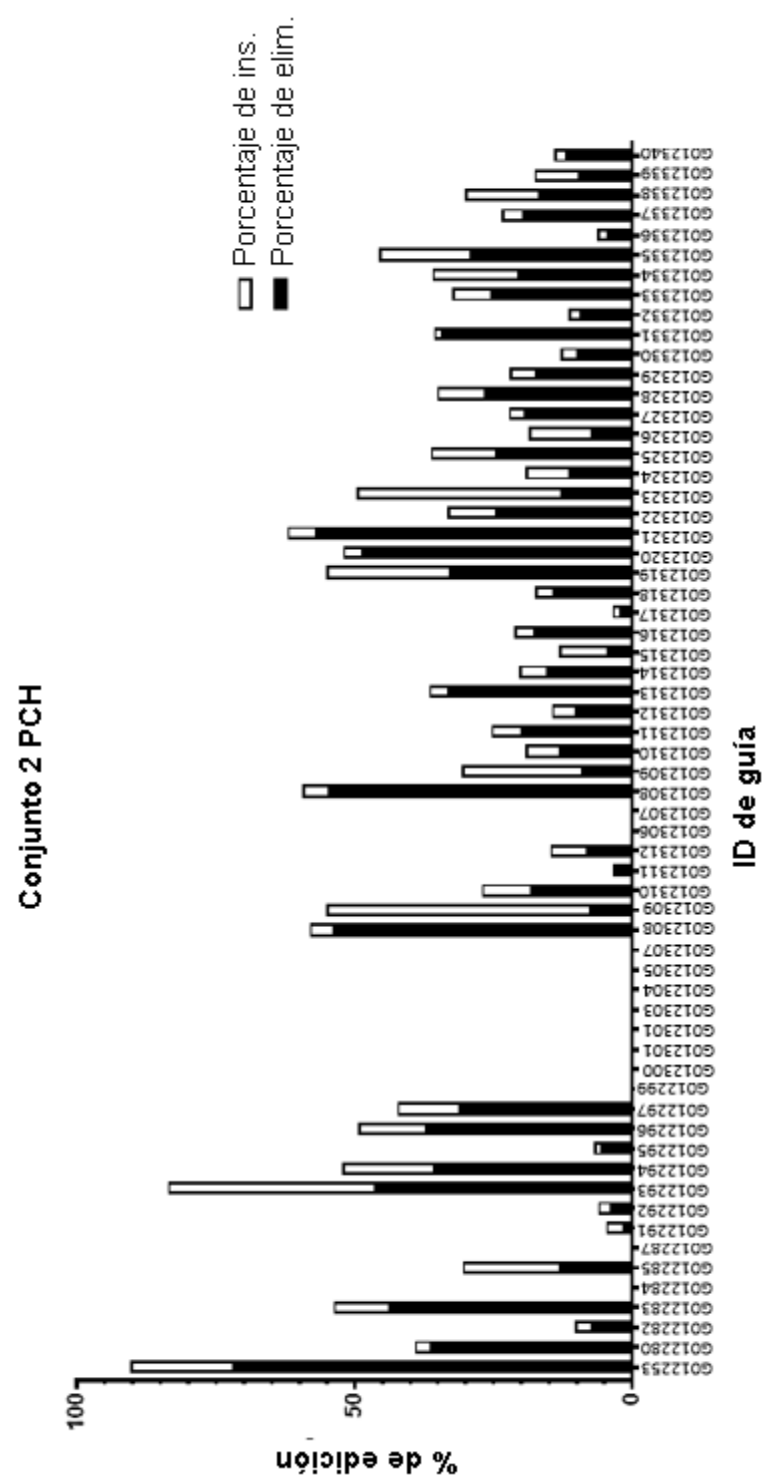


Figura 2D

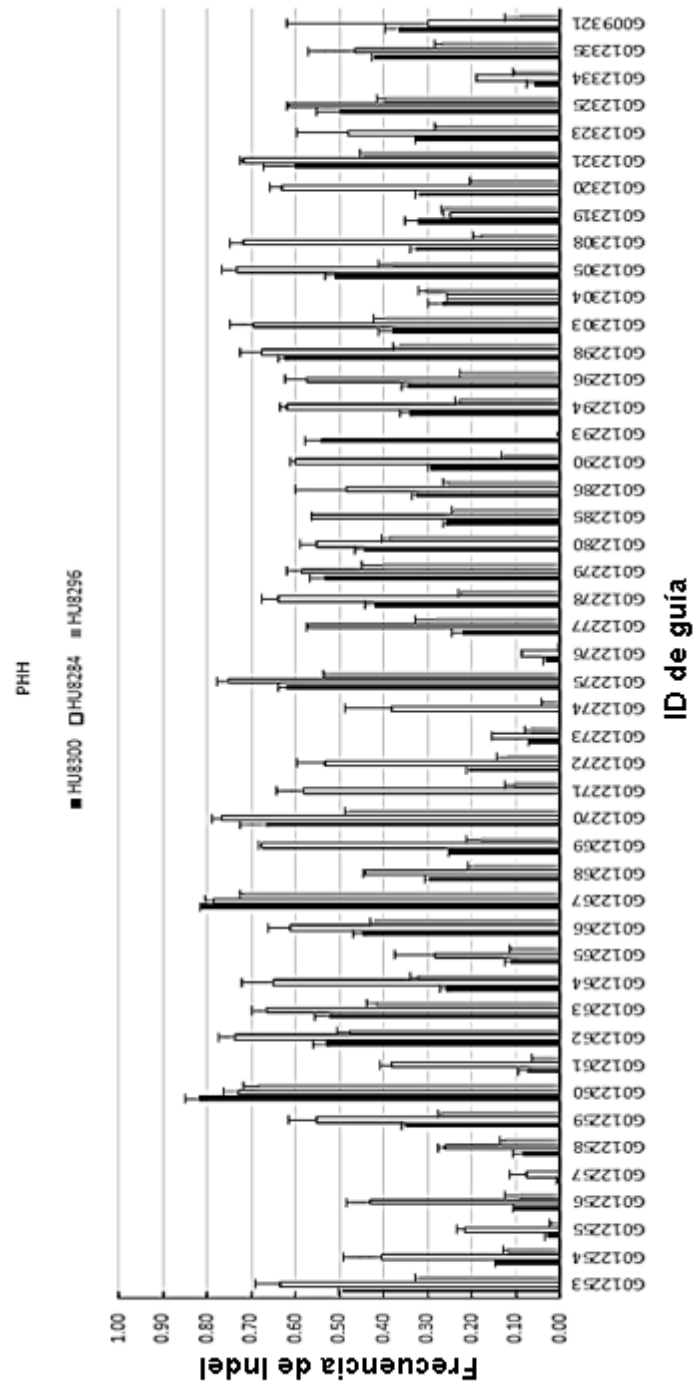


Figura 3A

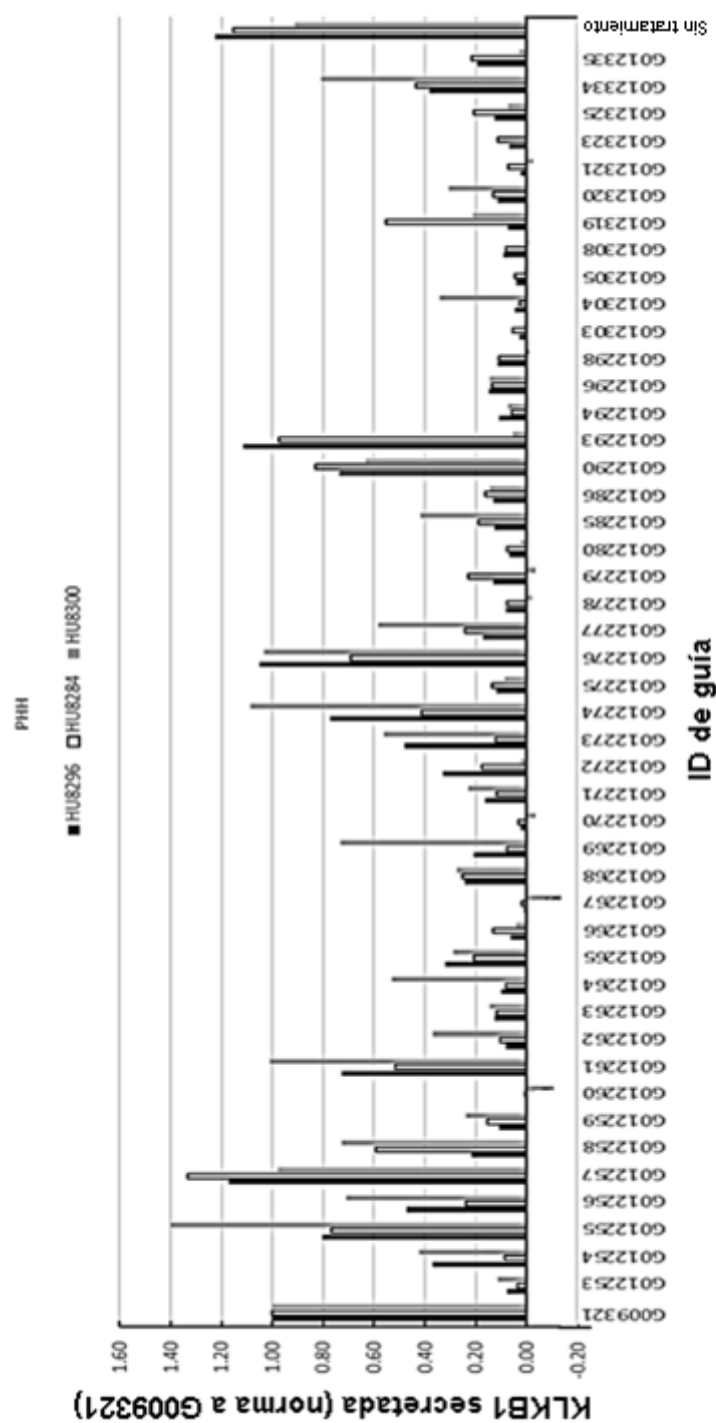


Figura 3B

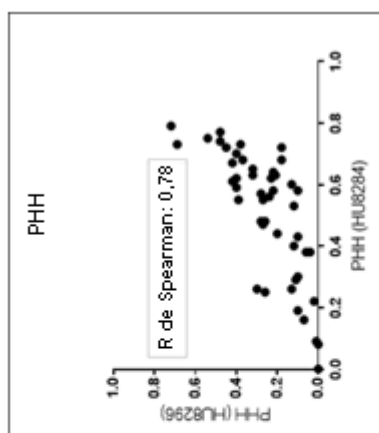


Figura 3E

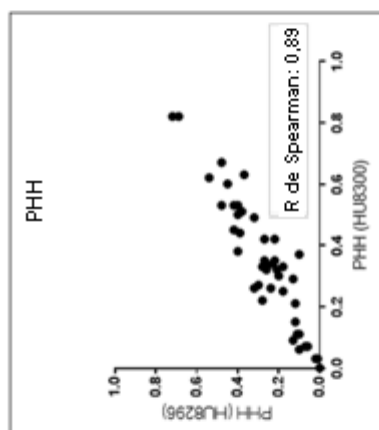


Figura 3D

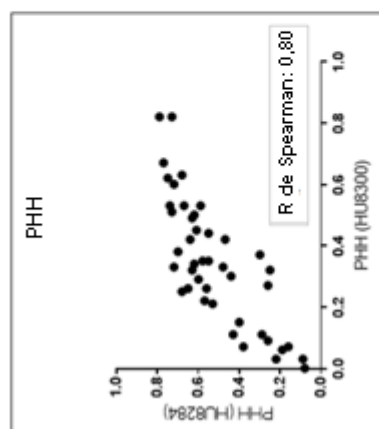


Figura 3C



Figura 4A

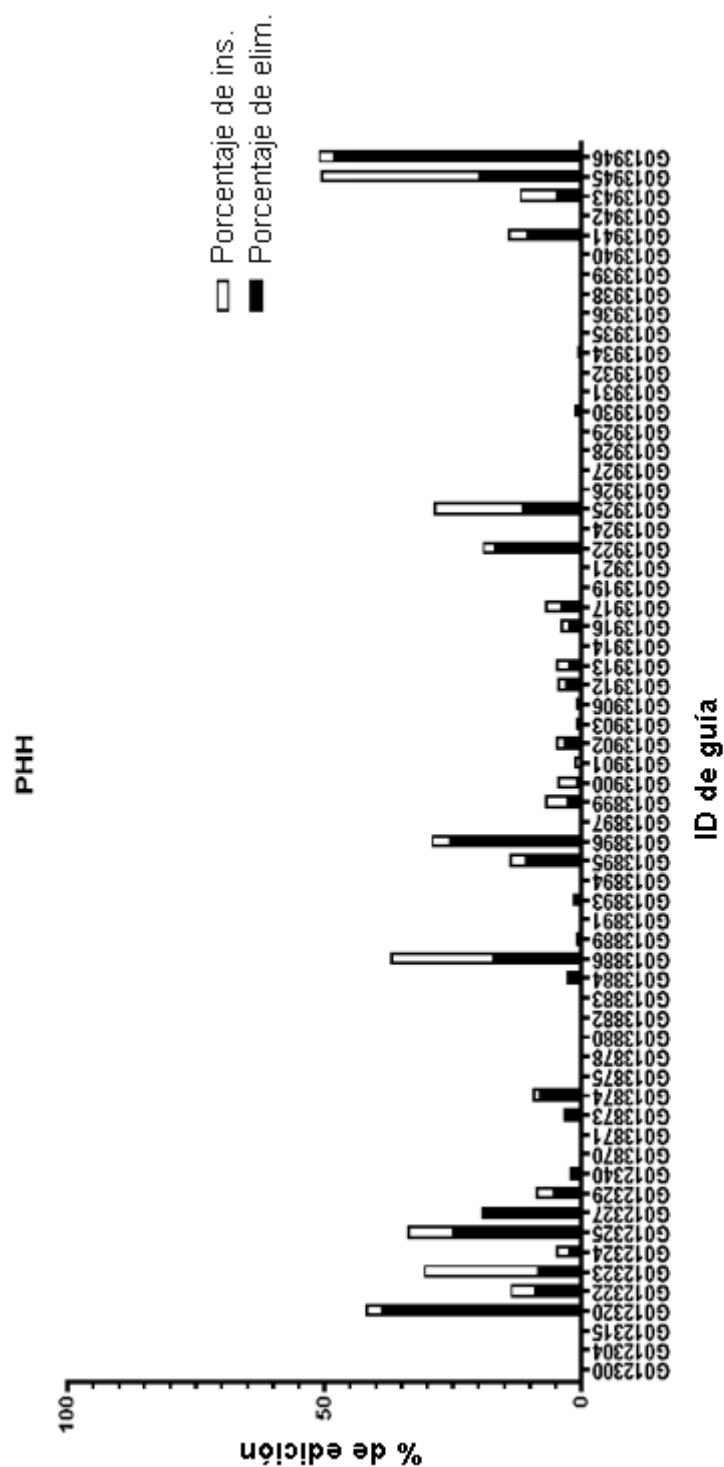
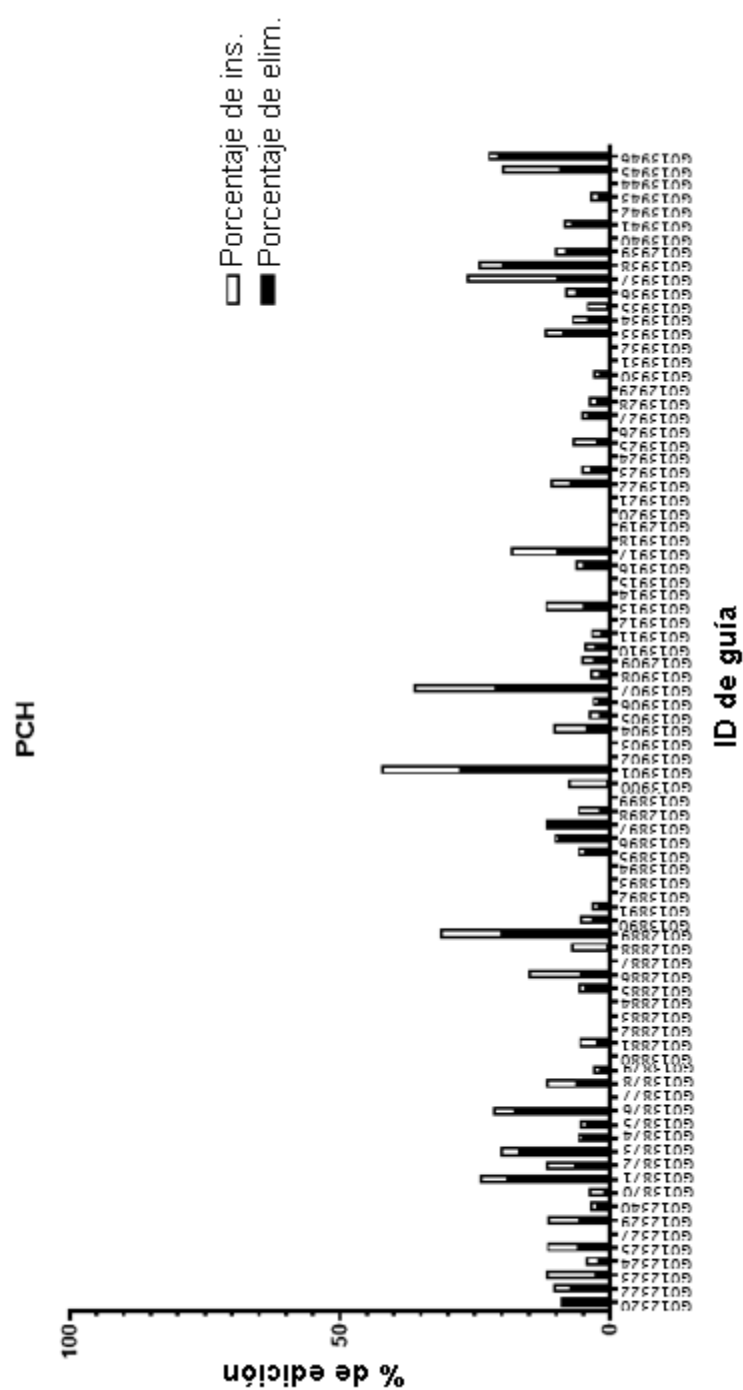


Figura 4B



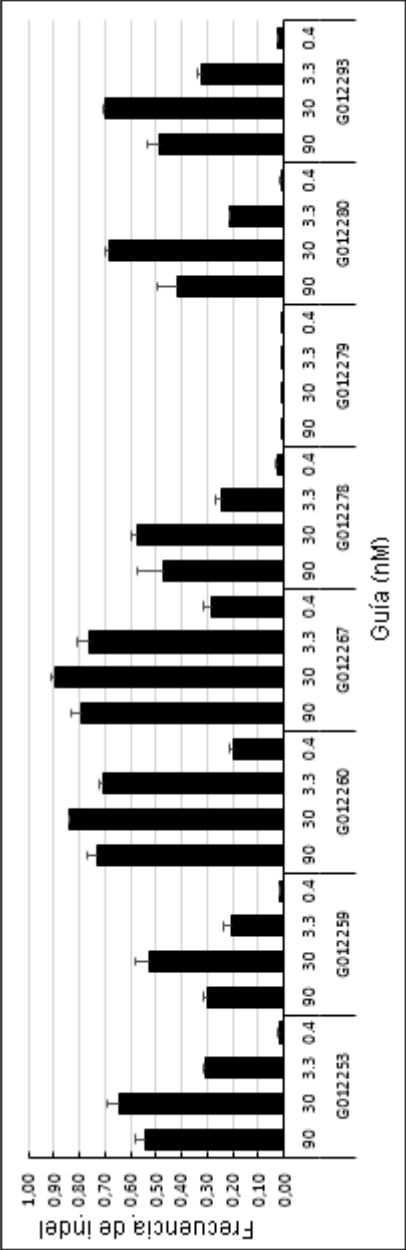


Figura 5A

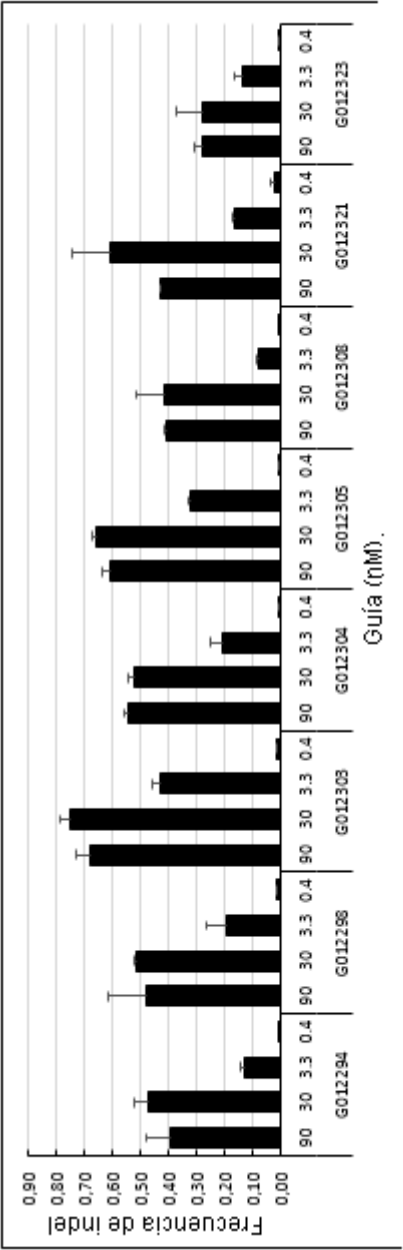


Figura 5B

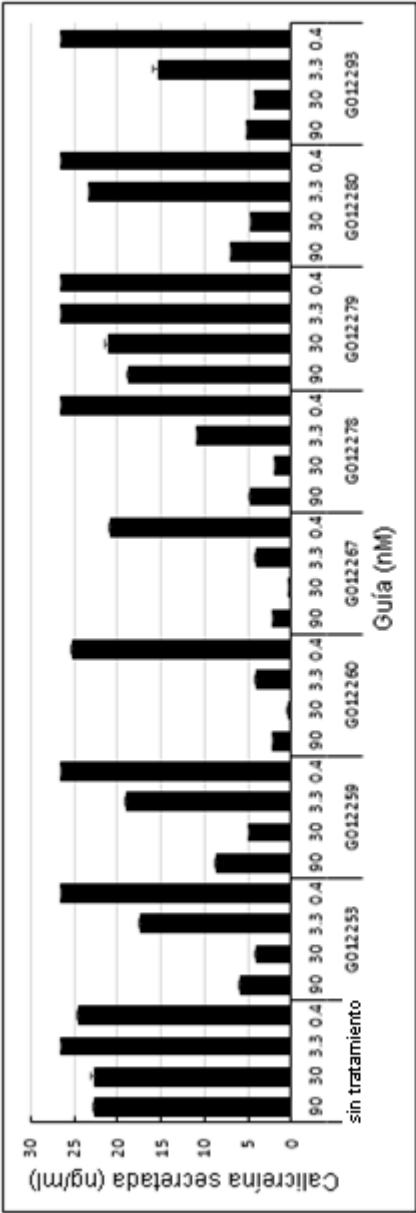


Figura 5C

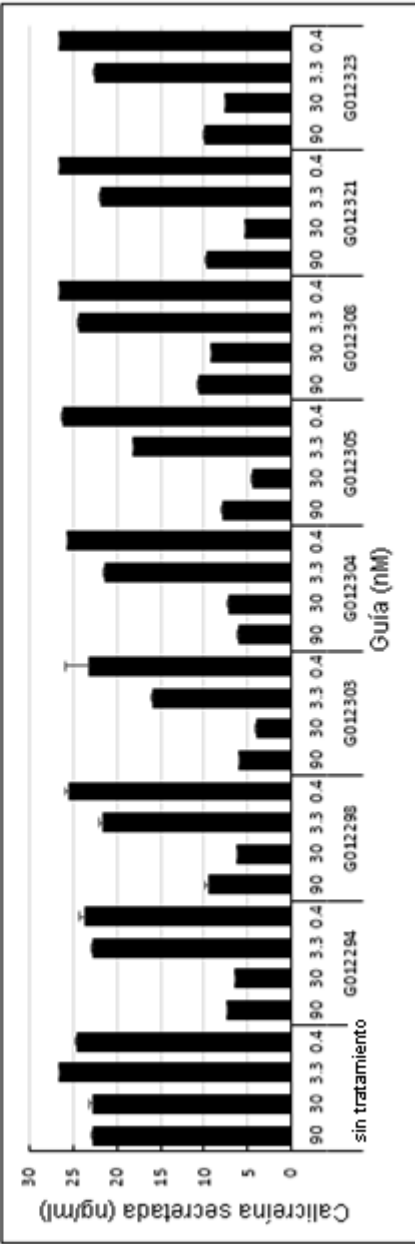


Figura 5D

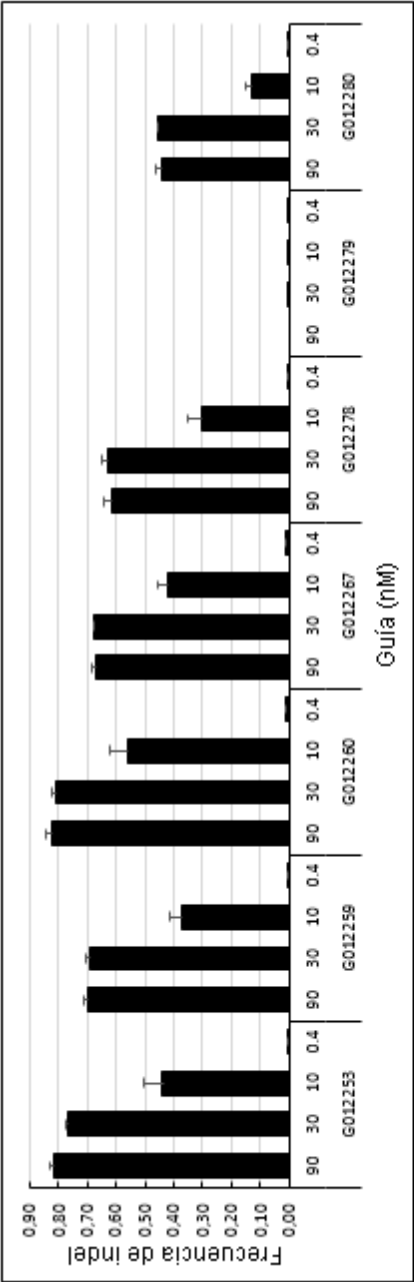


Figura 5E

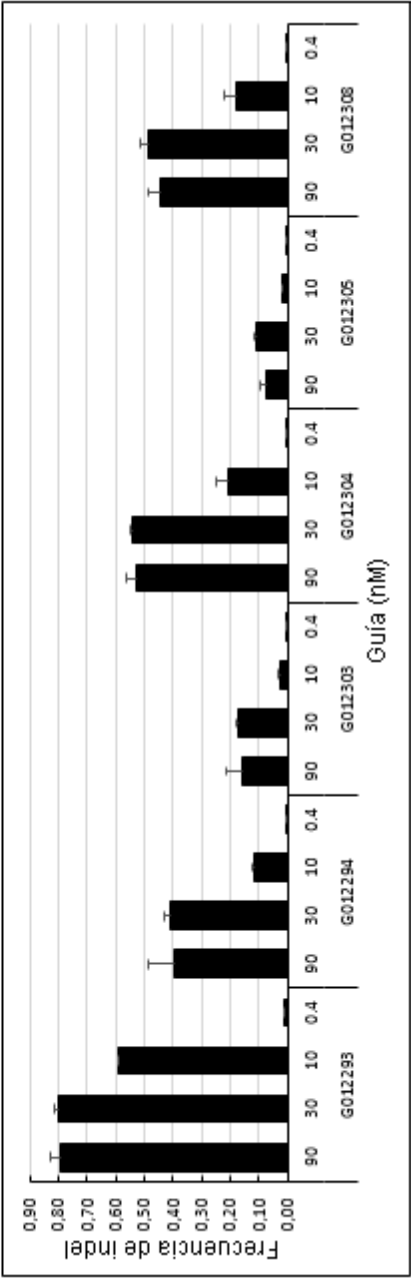


Figura 5F

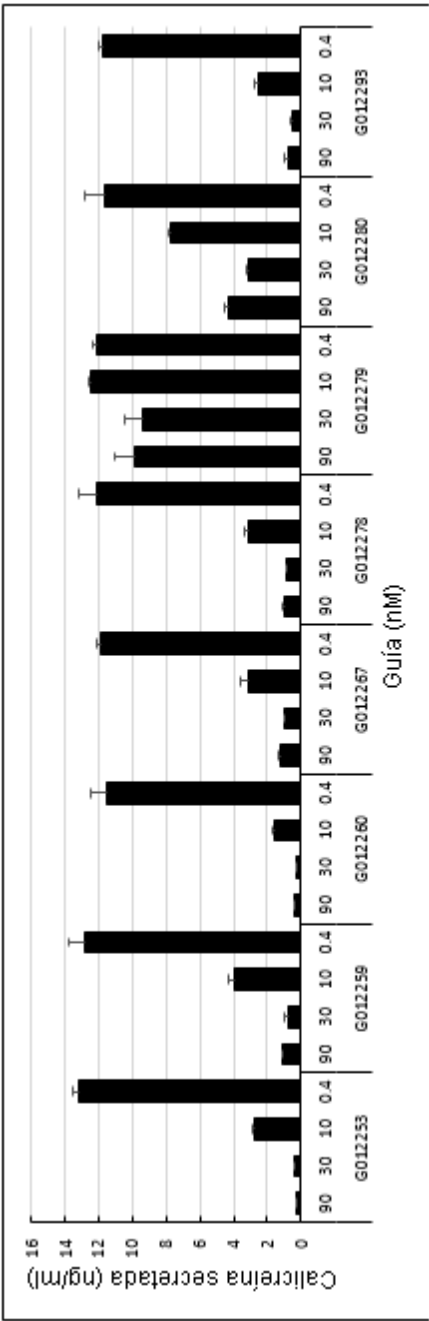


Figura 5G

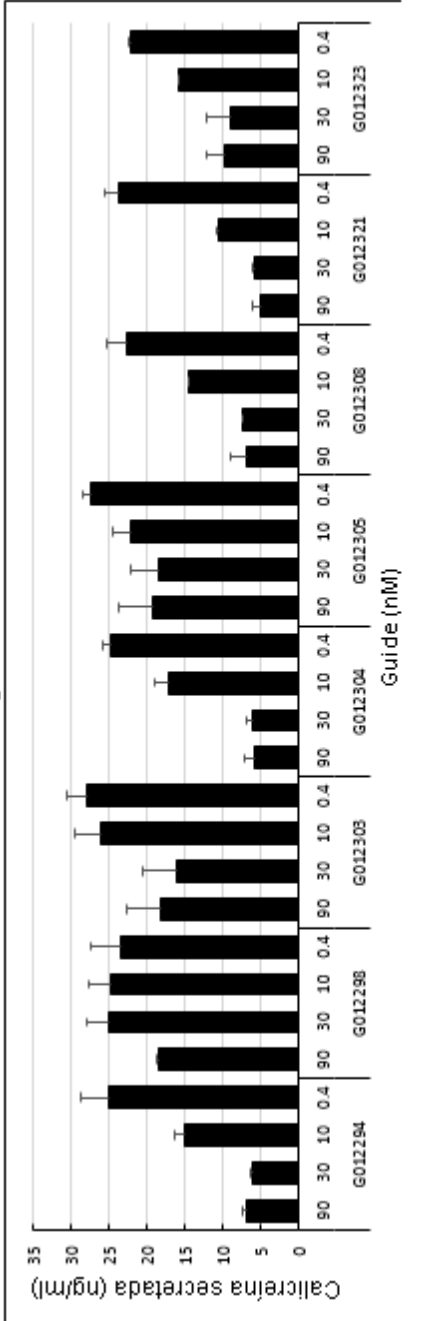


Figura 5H

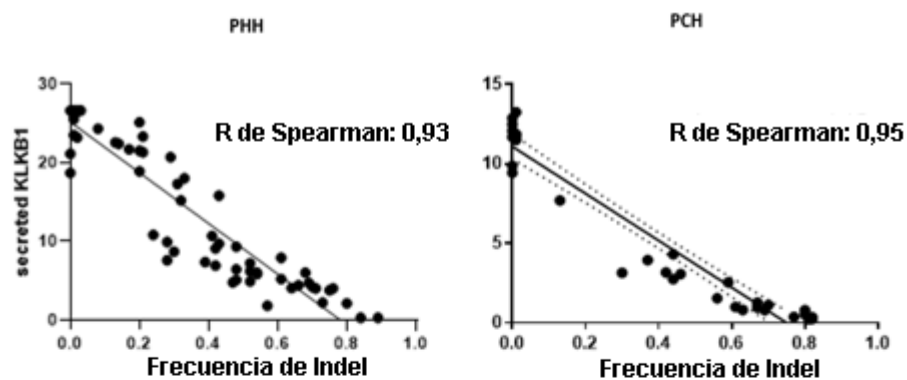


Figura 5I

Figura 5J

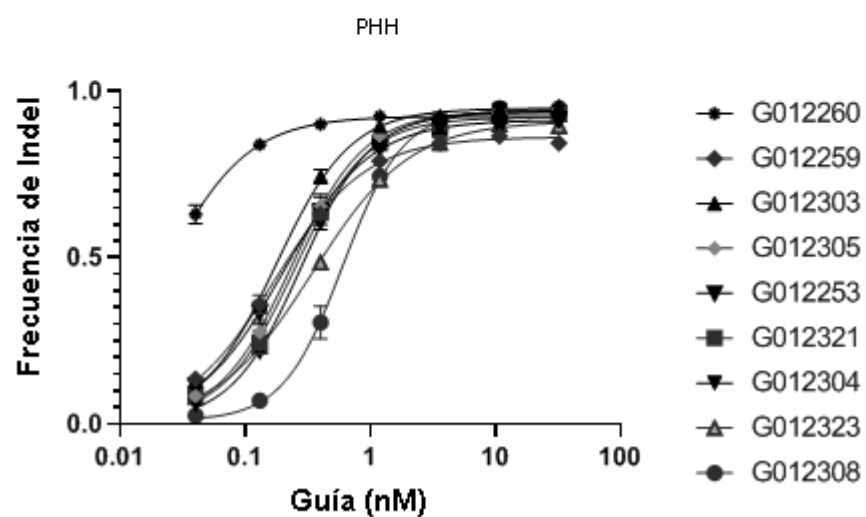


Figura 6A

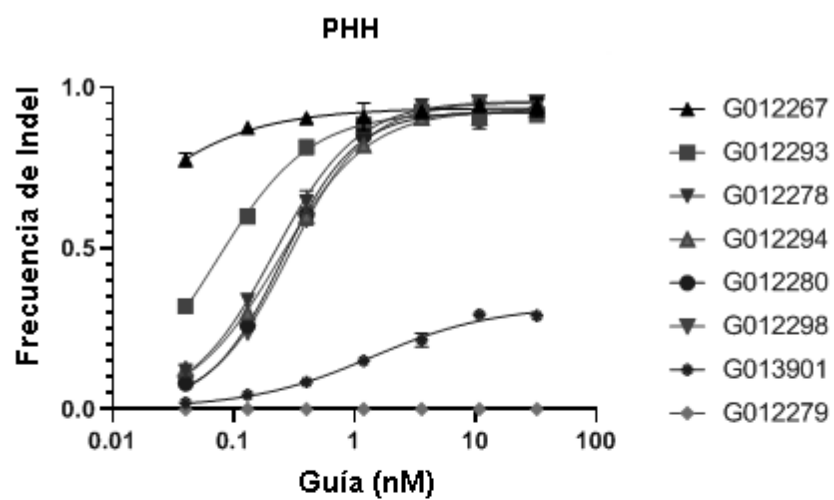


Figura 6B

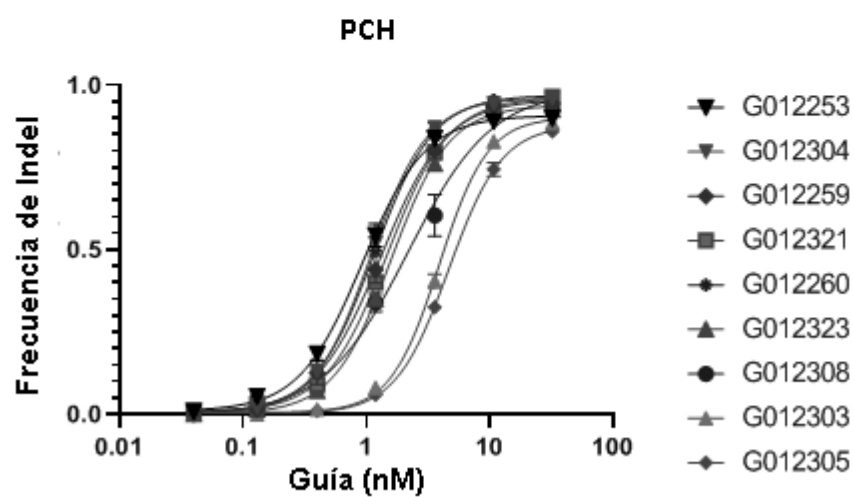
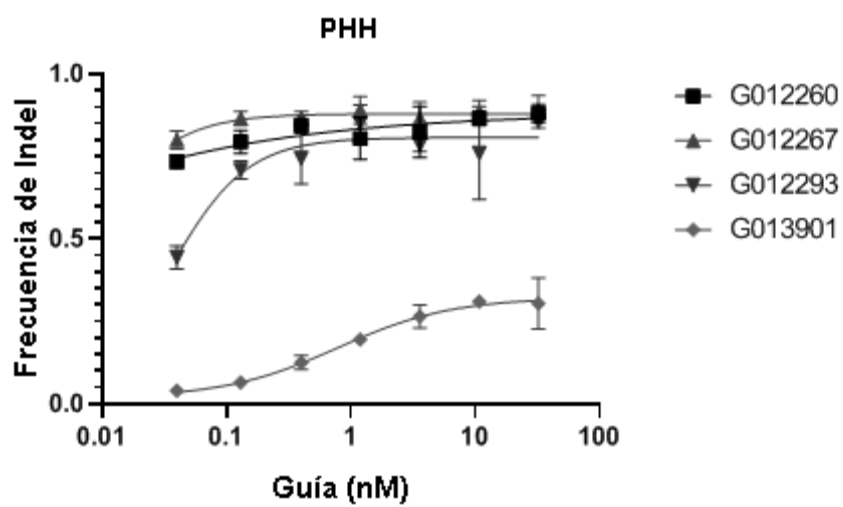
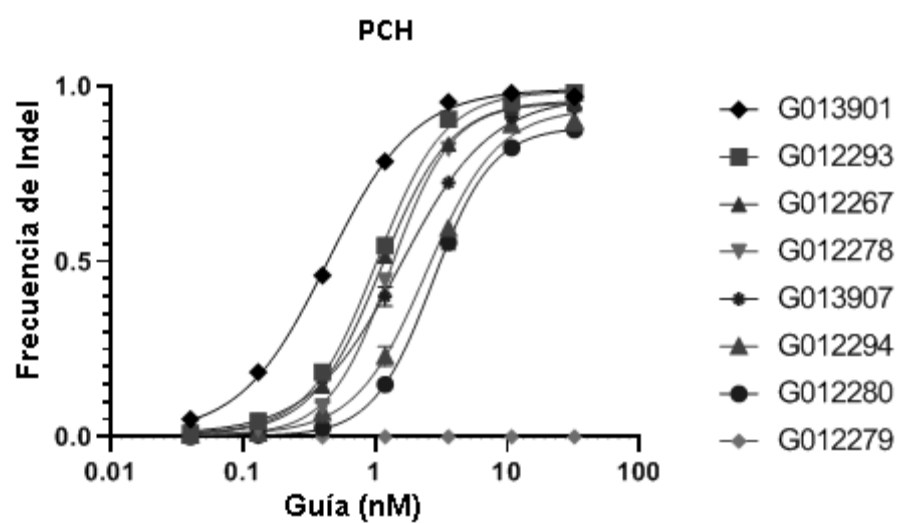


Figura 6C



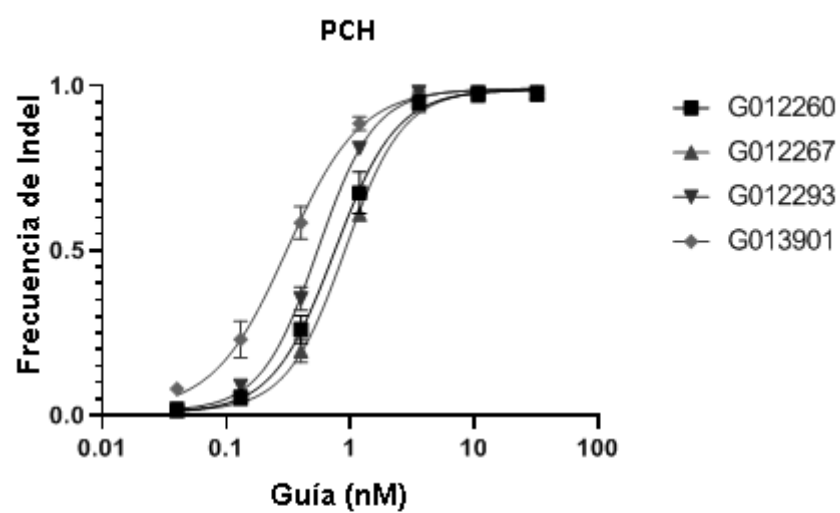


Figura 7B

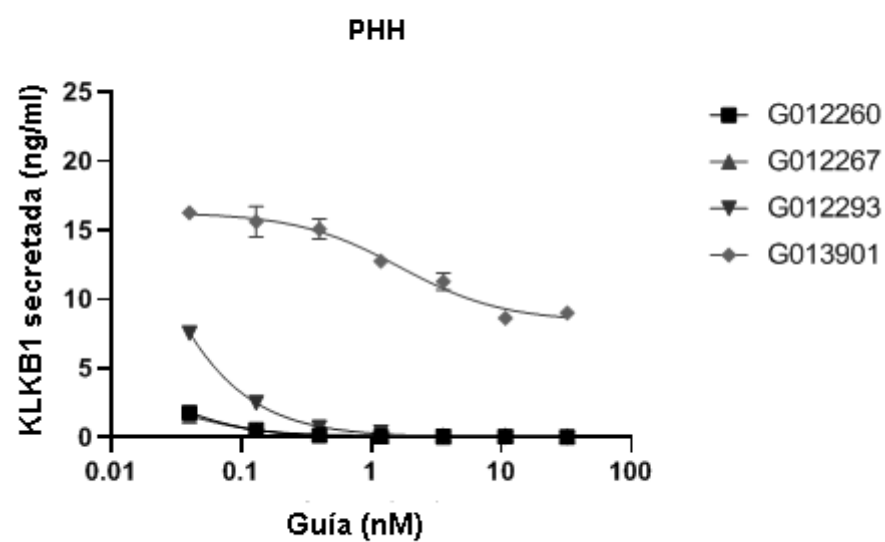


Figura 7C

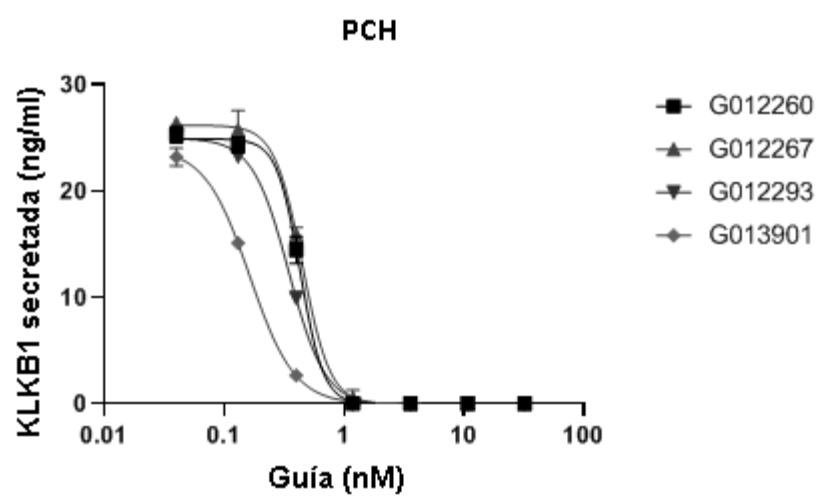


Figura 7D

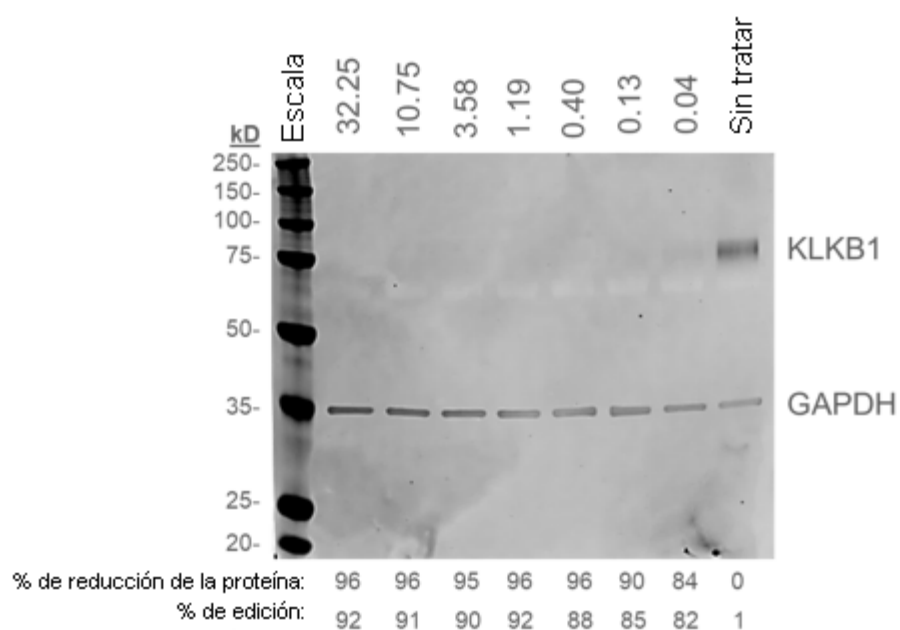


Figura 7E

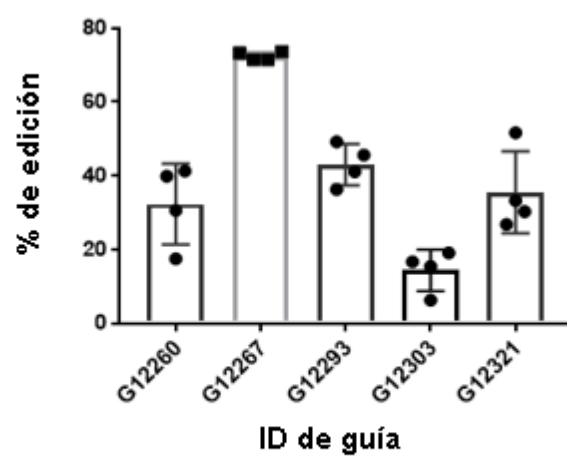


Figura 8A

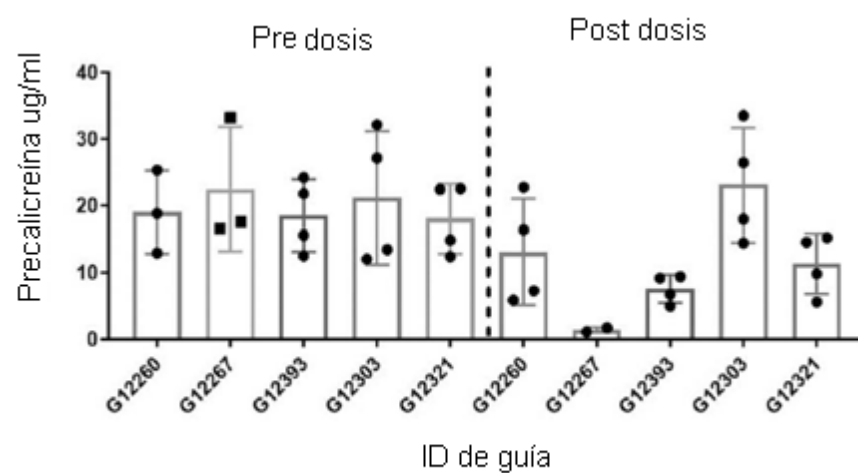


Figura 8B

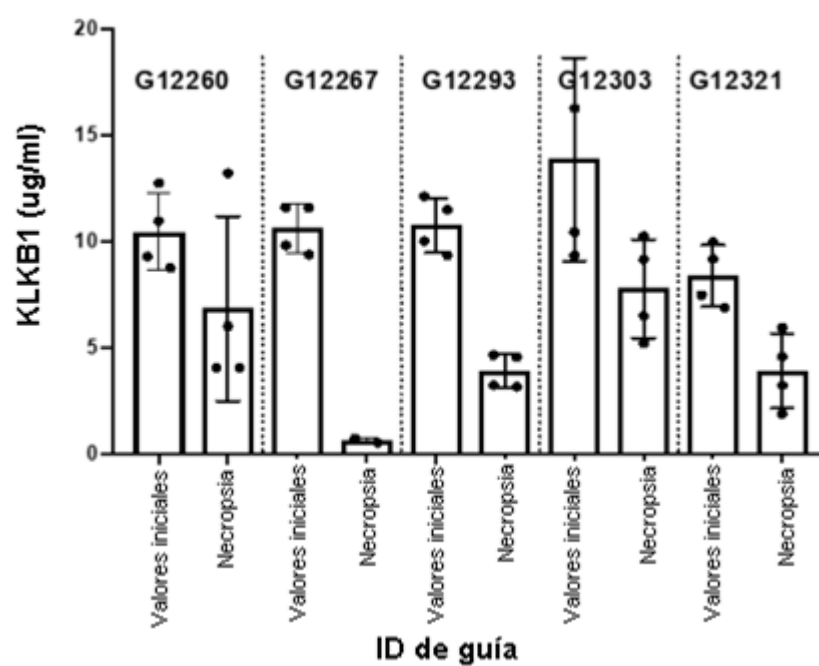


Figura 8C

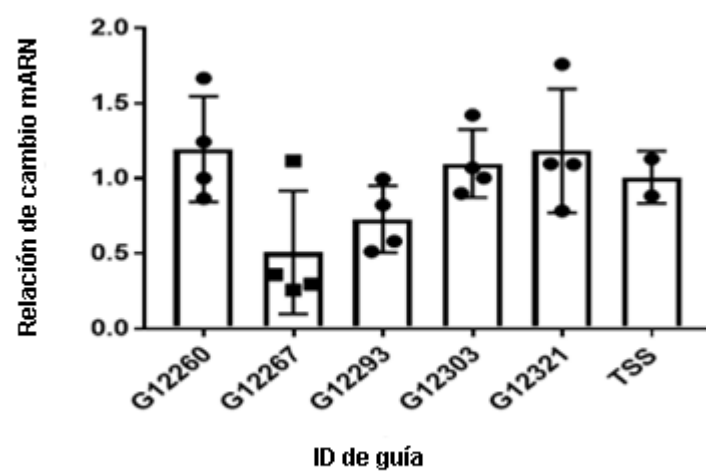


Figura 8D

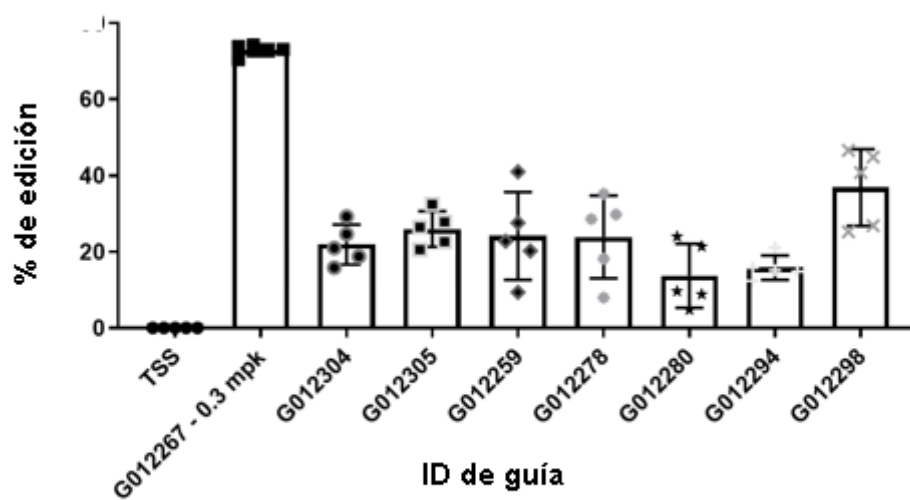


Figura 9A

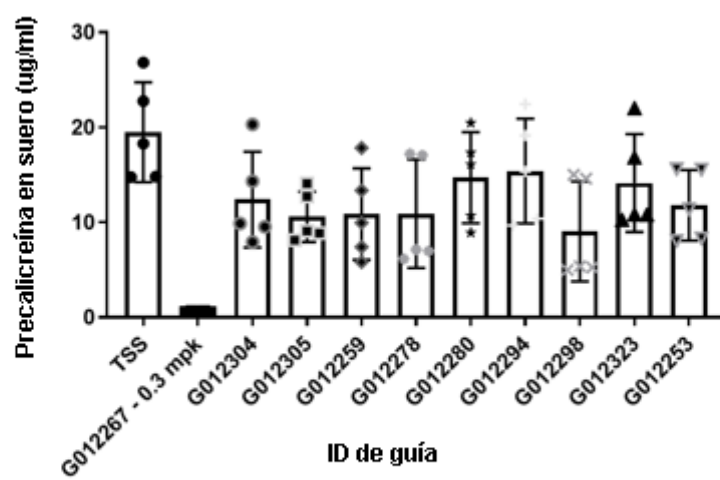


Figura 9B

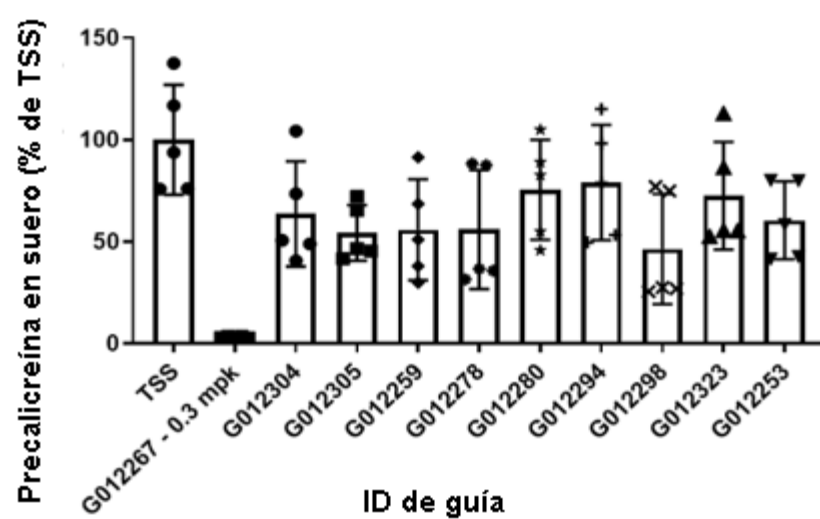


Figura 9C

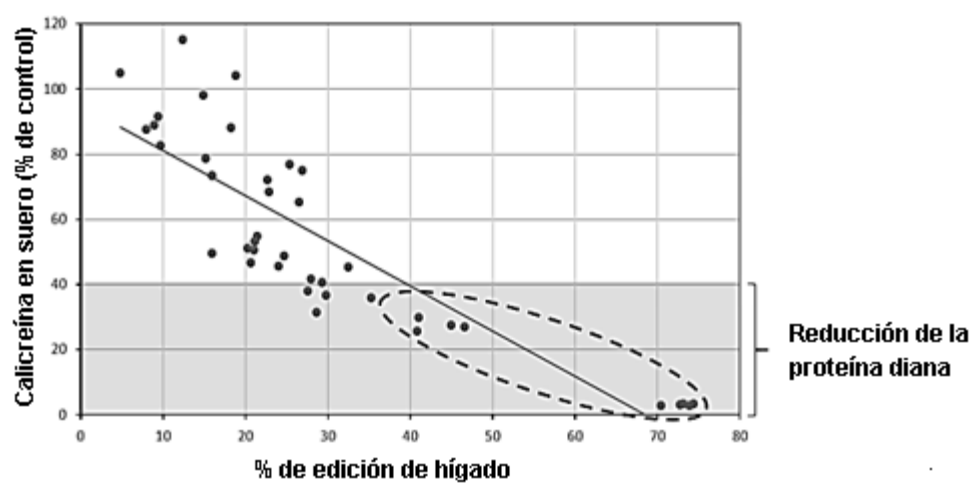


Figura 9D

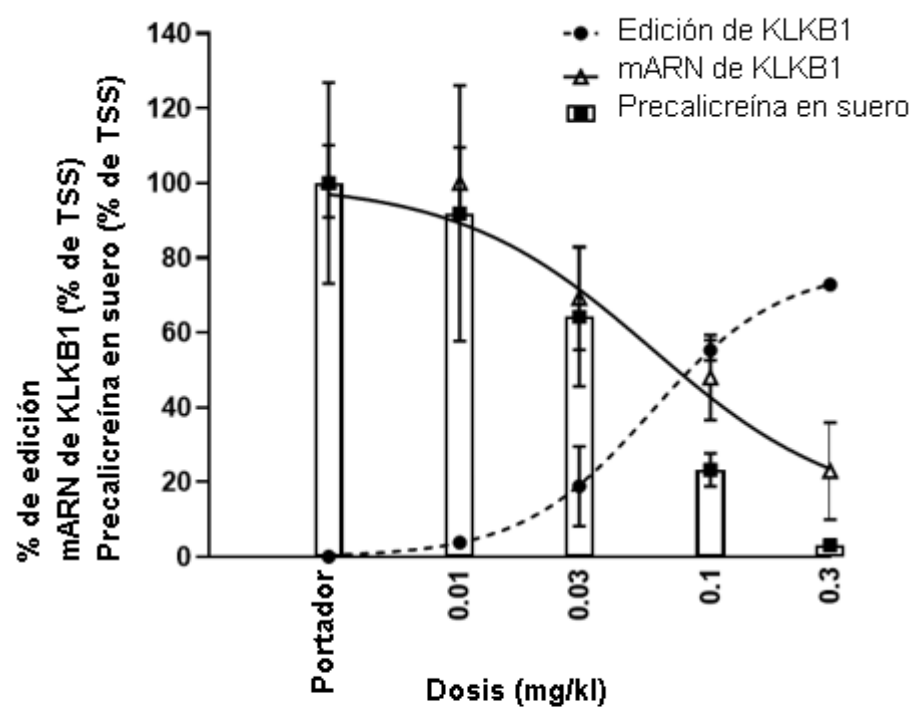


Figura 10

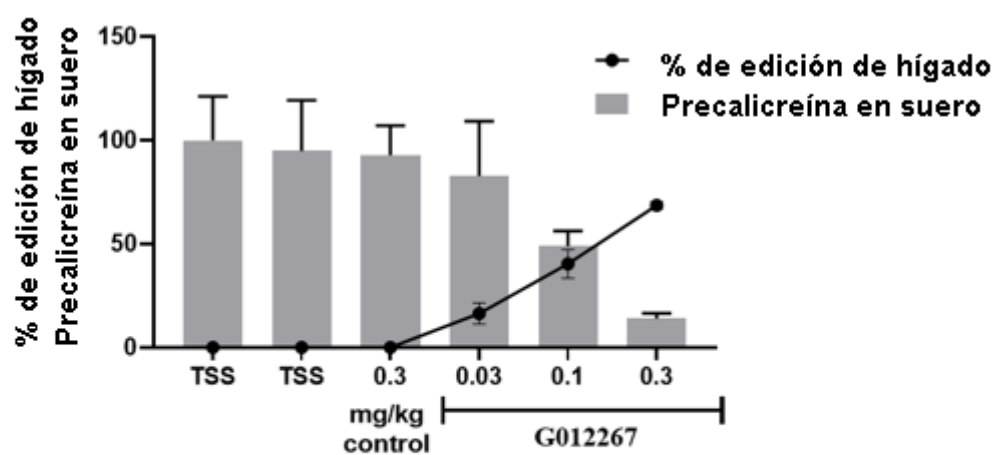


Figura 11A

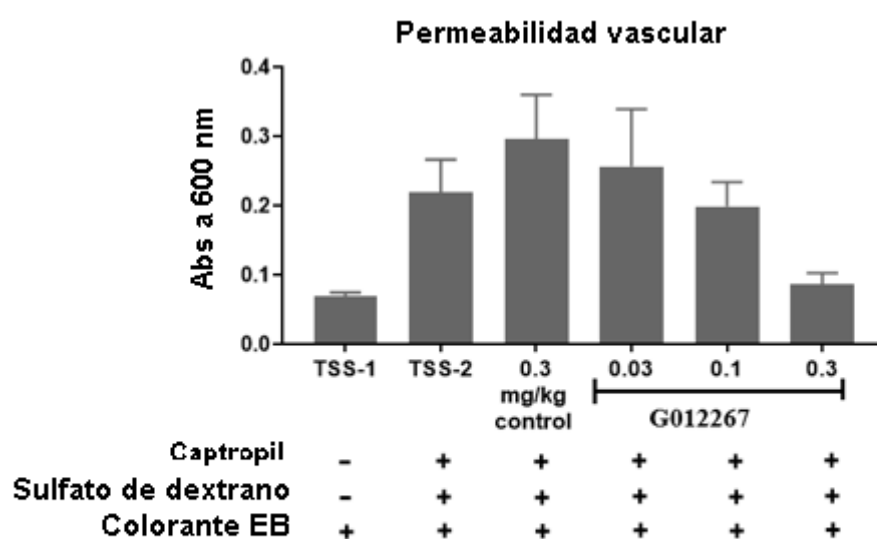


Figura 11B

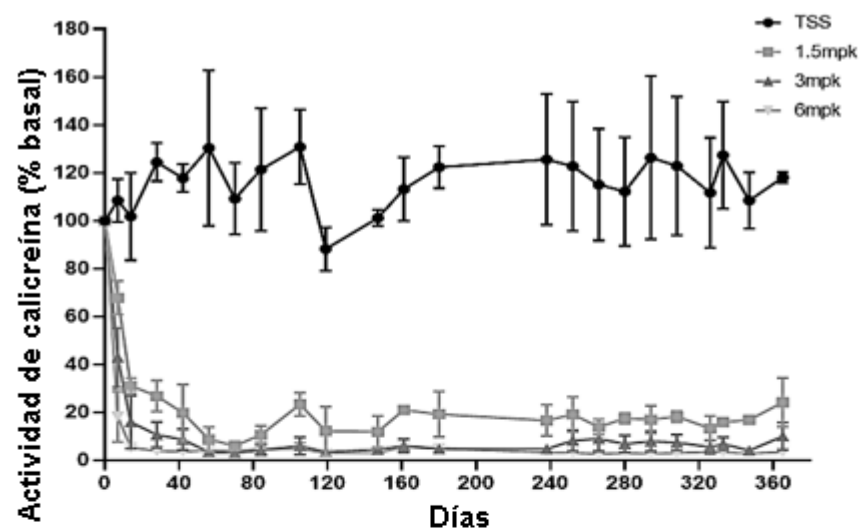


Figura 12A

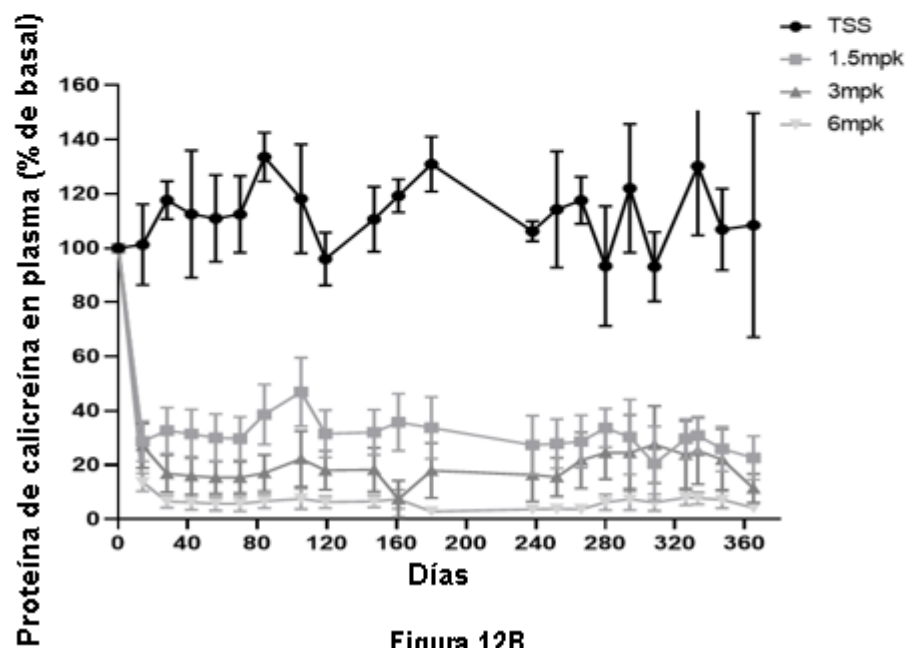


Figura 12B

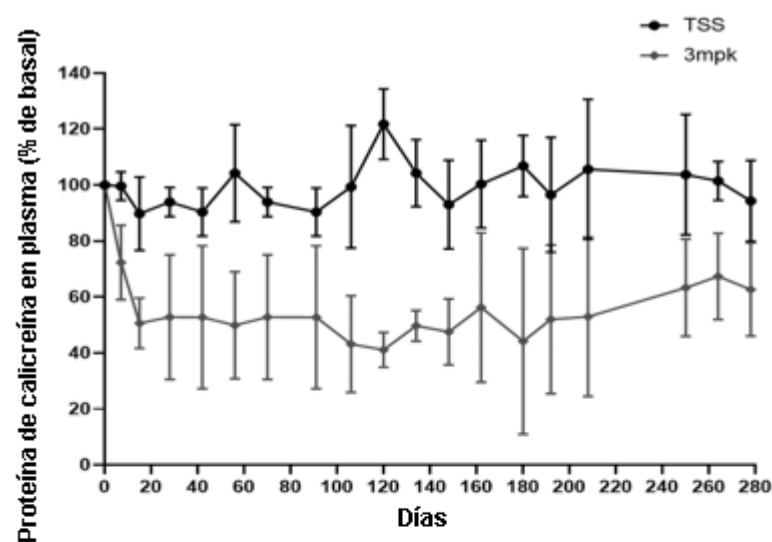


Figura 13A

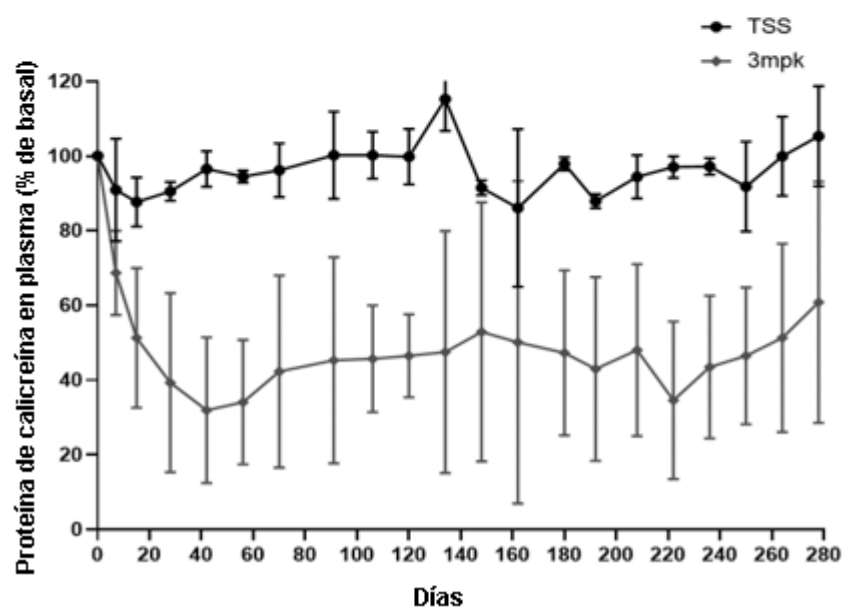


Figura 13B

Armazón Y/A (SEQ ID NO: 201)

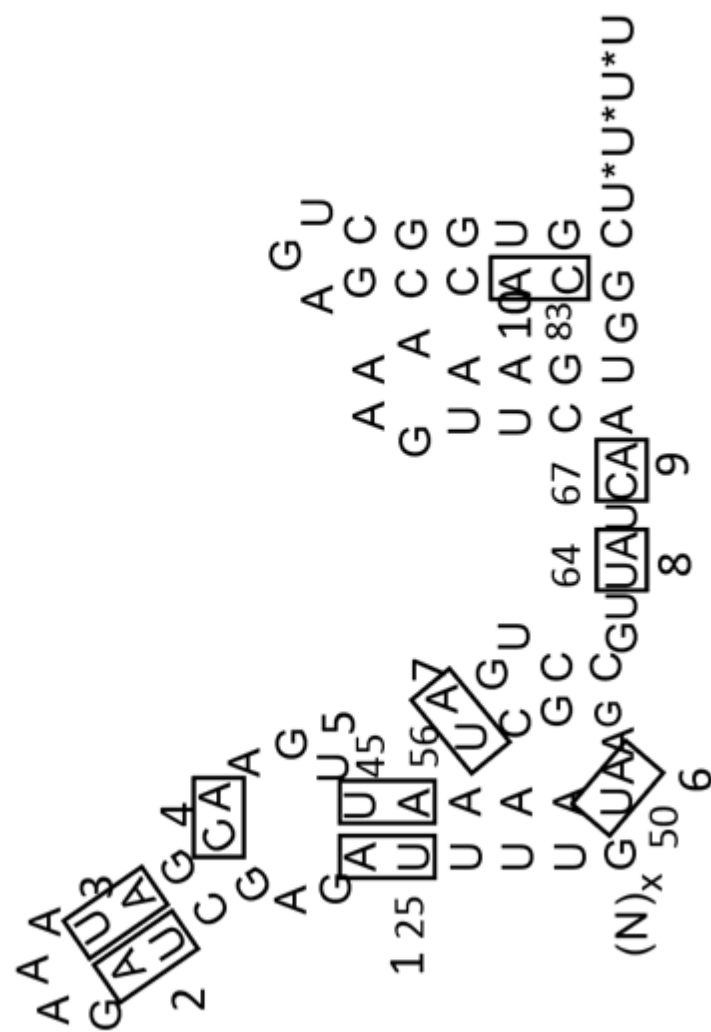


Figura 14

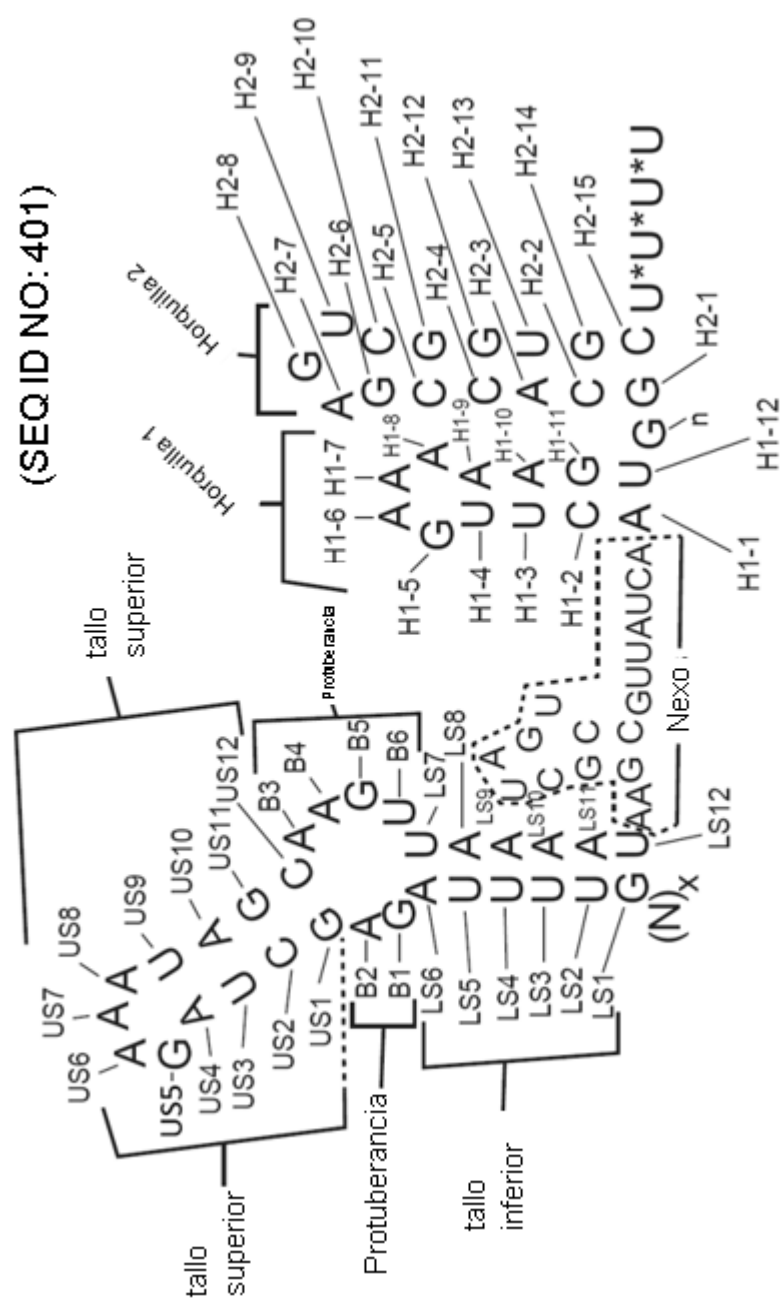


Figura 15