

FORMULACIONES

[001] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 62/566,240, presentada el 29 de septiembre de 2017, cuyo contenido se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

[002] Se proporcionan en la presente composiciones de nanopartículas lipídicas (“LNP”) con propiedades mejoradas para la administración de agentes biológicamente activos, en particular ARN, ARNm y ARN guía. Las composiciones de LNP facilitan la administración de agentes de ARN a través de las membranas celulares y, en modalidades particulares, introducen componentes y composiciones para la edición génica dentro de células vivas.

[003] Los agentes biológicamente activos que son particularmente difíciles de suministrar a células son las proteínas, fármacos a base de ácido nucleico y derivados de estos. Las composiciones para administración de tecnologías de edición génica prometedoras en células, tales como para la administración de componentes del sistema CRISPR/Cas9, son de particular interés.

[004] Existe actualmente una cantidad de componentes y sistemas para editar genes en células *in vivo*, que proporcionan un potencial importante para el tratamiento de enfermedades. Los sistemas de edición génica CRISPR/Cas son activos como complejos de ribonucleoproteína en una célula. Una nucleasa dirigida a ARN se une a una secuencia de ADN en una célula y dirige la escisión de esta. La actividad de nucleasa específica del sitio facilita la edición génica a través de los procesos naturales propios de la célula. Por ejemplo, la célula responde a rupturas de cadena doble de ADN (DSB) con un proceso de reparación susceptible a errores conocido como unión de extremos no homólogos (“NHEJ”). Durante NHEJ, la célula puede agregar o eliminar nucleótidos de los extremos de ADN, lo cual da como resultado una secuencia alterada a partir de la secuencia escindida. En otras circunstancias, las células reparan las DSB mediante mecanismos de reparación dirigida por homología (“HDR”) o recombinación homóloga (“HR”), en los cuales una plantilla endógena o exógena se puede utilizar para reparar de forma directa la ruptura. Varios de estos mecanismos de edición aprovechan mecanismos celulares para reparar rupturas de cadena simple (SSB) o DSB.

[005] Se necesitan composiciones para suministrar la proteína y componentes de ácido nucleico de CRISPR/Cas a una célula, tal como una célula en un paciente. En particular, las composiciones para administrar ARNm que codifica el componente de la proteína CRISPR y para administrar ARN guías de

CRISPR son de particular interés. Las composiciones con propiedades útiles para la administración in vitro e in vivo que pueden estabilizar y administrar componentes de ARN también son de particular interés.

[006] Se proporcionan en la presente composiciones a base de nanopartículas lipídicas con propiedades útiles, en particular para administrar componentes de edición génica de CRISPR/Cas.

5 **[007]** En determinadas modalidades, las composiciones de LNP comprenden: un componente de ARN; y un componente lipídico, donde el componente lipídico comprende: (1) alrededor de 50-60 % molar de lípido de amina; (2) alrededor de 8-10 % molar de lípido neutro; y (3) alrededor de 2,5-4 % molar de lípido de PEG, donde el resto del componente lipídico es lípido auxiliar y donde la relación entre N/P de la composición de LNP es de alrededor de 6. En modalidades adicionales, las composiciones de LNP
10 comprenden (1) un componente de ARN; (2) alrededor de 50-60 % molar de lípido de amina; (3) alrededor de 27-39,5 % molar de lípido auxiliar; (4) alrededor de 8-10 % molar de lípido neutro; y (5) alrededor de 2,5-4 % molar de lípido de PEG, donde la relación entre N/P de la composición de LNP es de alrededor de 5-7.

[008] En otras modalidades, las composiciones de LNP comprenden: un componente de ARN; y un
15 componente lipídico, donde el componente lipídico comprende: (1) alrededor de 50-60 % molar de lípido de amina; (2) alrededor de 5-15 % molar de lípido neutro; y (3) alrededor de 2,5-4 % molar de lípido de PEG, donde el resto del componente lipídico es lípido auxiliar y donde la relación entre N/P de la composición de LNP es de alrededor de 3-10. En modalidades adicionales, las composiciones de LNP comprenden un componente lipídico que incluye (1) alrededor de 40-60 % molar de lípido de amina; (2)
20 alrededor de 5-15 % molar de lípido neutro; y (3) alrededor de 2,5-4 % molar de lípido de PEG, donde el resto del componente lipídico es lípido auxiliar y donde la relación entre N/P de la composición de LNP es de alrededor de 6. En otra modalidad, las composiciones de LNP comprenden un componente lipídico que incluye (1) alrededor de 50-60 % molar de lípido de amina; (2) alrededor de 5-15 % molar de lípido neutro; y (3) alrededor de 1,5-10 % molar de lípido de PEG, donde el resto del componente lipídico es
25 lípido auxiliar y donde la relación entre N/P de la composición de LNP es de alrededor de 6.

[009] En algunas modalidades, las composiciones de LNP comprenden: un componente de ARN; y un componente lipídico, donde el componente lipídico comprende: (1) alrededor de 40-60 % molar de lípido de amina; (2) alrededor de 0-5 % molar de lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido; y (3) alrededor de 1,5-10 % molar de lípido de PEG, donde el resto del componente lipídico es lípido auxiliar y donde la
30 relación entre N/P de la composición de LNP es de alrededor de 3-10. En algunas modalidades, las composiciones de LNP comprenden: un componente de ARN; y un componente lipídico, donde el

componente lipídico comprende: (1) alrededor de 40-60 % molar de lípido de amina; (2) menos de alrededor de 1 % molar de lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido; y (3) alrededor de 1,5-10 % molar de lípido de PEG, donde el resto del componente lipídico es lípido auxiliar y donde la relación entre N/P de la composición de LNP es de alrededor de 3-10. En determinadas modalidades, la composición de LNP está esencialmente libre de lípido neutro. En algunas modalidades, las composiciones de LNP comprenden: un componente de ARN; y un componente lipídico, donde el componente lipídico comprende: (1) alrededor de 40-60 % molar de lípido de amina; y (2) alrededor de 1,5-10 % molar de lípido de PEG, donde el resto del componente lipídico es lípido auxiliar, donde la relación entre N/P de la composición de LNP es de alrededor de 3-10 y donde la composición de LNP está libre de lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido. En determinadas modalidades, la composición de LNP está esencialmente libre o libre de fosfolípido neutro. En determinadas modalidades, la composición de LNP está esencialmente libre o libre de lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido.

[010] En determinadas modalidades, el componente de ARN comprende un ARNm, tal como un agente de unión a ADN guiado por ARN (por ejemplo, una nucleasa Cas o una nucleasa Cas clase 2). En determinadas modalidades, el componente de ARN comprende ARNg.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[011] La Fig. 1 muestra el porcentaje de edición génica de TTR lograda en el hígado de ratón después de la administración de ARNm y ARNg de Cas9, componentes de edición génica de CRISPR/Cas, en composiciones de LNP como se indica con una dosis única de 1 mpk (Fig. 1A) o 0,5 mpk (Fig. 1B).

[012] La Fig. 2 muestra los datos de distribución de partículas para composiciones de LNP que comprenden ARNm y ARNg de Cas9.

[013] La Fig. 3 representa las propiedades fisicoquímicas de las composiciones de LNP, que comparan el logaritmo de la masa molar diferencial (Fig. 3A) y las mediciones del peso molecular promedio (Fig. 3B) de las composiciones.

[014] La Fig. 4 muestra cálculos de polidispersidad en la Fig. 4A y análisis de Burchard-Stockmeyer en la Fig. 4B, mediante el análisis de las composiciones de LNP de la Fig. 3.

[015] La Fig. 5 proporciona los resultados de un experimento que evalúa el efecto de las composiciones de LNP con composiciones en aumento de lípido de PEG sobre la atenuación de TTR en suero, la edición génica en el hígado y los niveles de citocina MCP-1 después de la administración de una dosis única en ratas. La Fig. 5A grafica los niveles de TTR en suero; la Fig. 5B grafica el porcentaje de edición en muestras de hígado; y la Fig. 5C proporciona los niveles de MCP-1 en pg/mL.

[016] La Fig. 6 muestra que las composiciones de LNP mantienen la potencia para la edición génica con diversos lípidos de PEG (según se mide mediante los niveles de TTR en suero (Fig. 6A y 6B) y porcentaje de edición (Fig. 6C).

[017] La Fig. 7 muestra que los análogos del lípido A administran de forma eficaz cargas de edición génica en composiciones de LNP según se mide mediante el % de edición en el hígado después de una administración de dosis única en ratones.

[018] La Fig. 8 muestra la curva de respuesta a la dosis del porcentaje de edición con diversas composiciones de LNP en hepatocitos primarios de cynomolgus.

[019] La Fig. 9A y la Fig. 9B muestran los resultados de TTR en suero y porcentaje de edición cuando varía la relación entre ARNg y ARNm, y la Fig. 9C y la Fig. 9D muestran los resultados de TTR en suero y porcentaje de edición en el hígado cuando se mantiene constante la cantidad de ARNm de Cas9 y varía el ARNg después de la administración de una dosis única en ratones.

[020] La Fig. 10A y la Fig. 10B muestran los resultados de TTR en suero y edición en el hígado después de la administración de composiciones de LNP con y sin lípido neutro.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[021] La presente descripción proporciona modalidades de composiciones de nanopartículas lipídicas (LNP) de ARN, que incluyen ARN de componente de CRISPR/Cas (la “carga”) para suministrarlas a una célula y métodos para su uso. Las composiciones de LNP pueden presentar propiedades mejoradas en comparación con las tecnologías de administración previas. La composición de LNP puede contener un componente de ARN y un componente lipídico, tal como se define en la presente. En determinadas modalidades, el componente de ARN incluye una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas de clase 2. En determinadas modalidades, la carga o componente de ARN incluye un ARNm que codifica una nucleasa Cas clase 2 y un ARN guía o ácidos nucleicos que codifican ARN guía. También se proporcionan métodos para la edición génica y métodos para elaborar células modificadas genéticamente.

Carga de CRISPR/Cas

[022] La carga de CRISPR/Cas administrada a través de la formulación de LNP puede incluir una molécula de ARNm que codifica una proteína de interés. Por ejemplo, se incluye un ARNm para expresar una proteína, tal como una proteína fluorescente verde (GFP) y agente de unión a ADN guiado por ARN, o una nucleasa Cas. Se proporcionan composiciones de LNP que incluyen un ARNm de nucleasa Cas, por ejemplo, un ARNm de nucleasa Cas clase 2 que permite la expresión en una célula de una proteína Cas9. Además, la carga puede contener uno o más ARN guía o ácidos nucleicos que codifican ARN guía.

También se puede incluir un ácido nucleico plantilla, por ejemplo, para reparación o recombinación, en la composición o se puede utilizar un ácido nucleico plantilla en los métodos descritos en la presente.

[023] “ARNm” se refiere a un polinucleótido que comprende un marco de lectura abierto que puede traducirse en un polipéptido (es decir, puede servir como un sustrato para la traducción mediante un ribosoma y ARNt aminoacilado). Los ARNm pueden comprender una estructura principal de azúcar fosfato, lo que incluye residuos de ribosa o análogos de esta, por ejemplo, residuos de ribosa 2'-metoxi. En algunas modalidades, los azúcares de una estructura principal de azúcar fosfato de ARNm consisten esencialmente en residuos de ribosa, residuos de ribosa 2'-metoxi o una combinación de estos. En general, los ARNm no contienen una cantidad sustancial de residuos de timina (por ejemplo, 0 residuos o menos que 30, 20, 10, 5, 4, 3 o 2 residuos de timidina; o menos de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,2 % o 0,1 % de contenido de timidina). Un ARNm puede contener uridinas modificadas en algunas o todas sus posiciones de uridina.

Sistemas CRISPR/nucleasa Cas

[024] Un componente de las formulaciones descritas es un ARNm que codifica un agente de unión a ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas.

[025] Tal como se usa en la presente, un “agente de unión a ADN guiado por ARN” significa un polipéptido o complejo de polipéptidos que tienen actividad de unión a ARN y ADN, o una subunidad de unión a ADN de tal complejo, donde la actividad de unión a ADN es específica de la secuencia y depende de la secuencia del ARN. Los agentes de unión a ADN guiados por ARN ilustrativos incluyen cleavasas/nickasas [enzimas de escisión/encimas de corte] Cas y formas inactivadas de estas (“agentes de unión a ADN dCas”). “Nucleasa Cas”, tal como se usa en la presente, abarca cleavasas Cas, nickasas Cas y agentes de unión a ADN dCas. Los agentes de unión de cleavasas/nickasas Cas y ADN dCas incluyen complejo de Csm o Cmr de un sistema CRISPR tipo III, la subunidad Cas10, Csm1 o Cmr2 de este, un complejo de cascada de un sistema CRISPR tipo I, la subunidad Cas3 de este y nucleasas Cas clase 2. Tal como se usa en la presente, una “nucleasa Cas clase 2” es un polipéptido de cadena simple con actividad de unión a ADN guiada por ARN. Las nucleasas Cas clase 2 incluyen cleavasas/nickasas Cas clase 2 (por ejemplo, variantes H840A, D10A o N863A), que tienen, además, actividad de nickasa o cleavasas de ADN guiada por ARN, y agentes de unión de ADN dCas clase 2, en los cuales se inactiva la actividad de cleavasa/nickasa. Las nucleasas Cas clase 2 incluyen, por ejemplo, proteínas Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (por ejemplo, las variantes N497A, R661A, Q695A, Q926A), HypaCas9 (por ejemplo, las 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 de estas. La proteína Cpf1, Zetsche et ál., *Cell*, 163: 1-13 (2015), es homóloga a Cas9, y contiene un dominio de nucleasa tipo RuvC. Las secuencias de Cpf1 de Zetsche se incorporan mediante esta referencia en su totalidad. Véase, por ejemplo, Zetsche, Tablas S1 y S3. Véase, por ejemplo, Makarova et ál., *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et ál., *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015).

[026] En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN es una nucleasa Cas clase 2. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN tiene actividad de cleavasa, que también puede mencionarse como actividad de endonucleasa de cadena doble. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN comprende una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas clase 2 (que puede ser, por ejemplo, una nucleasa Cas tipo II, V o VI). Las nucleasas Cas de Clase 2 incluyen, por ejemplo, proteínas de Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 y C2c3 y modificaciones de estas. Los ejemplos de nucleasas Cas9 incluyen aquellas de los sistemas CRISPR II de *S. pyogenes*, *S. aureus* y otras procariotas (véase, por ejemplo, la lista en el siguiente párrafo) y versiones modificadas de estas (por ejemplo, modificadas genéticamente o mutantes). Véanse, por ejemplo U.S. 2016/0312198 A1; U.S. 2016/0312199 A1. Otros ejemplos de nucleasas Cas incluyen complejo de Csm o Cmr de un sistema CRISPR tipo III, la subunidad Cas10, Csm1 o Cmr2 de este; y un complejo de cascada de un sistema CRISPR tipo I o la subunidad Cas3 de este. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede ser de un sistema tipo IIA, tipo IIB o tipo IIC. Por una discusión de los diversos sistemas CRISPR y nucleasas Cas véase, por ejemplo, Makarova et ál., *Nat. Rev. Microbiol.* 9:467-477 (2011); Makarova et ál., *Nat. Rev. Microbiol*, 13: 722-36 (2015); Shmakov et ál., *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015).

[027] Los ejemplos no taxativos de especies de las que se puede derivar la nucleasa Cas incluyen *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus gasseri*, *Francisella novicida*, *Wolinella succinogenes*, *Sutterella wadsworthensis*, *Gammaproteobacterium*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Fibrobacter succinogene*, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Treponema denticola*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas sp.*, *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus sp.*, *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor*

becscii, Candidatus Desulforudis, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Finegoldia magna, Natranaerobius thermophilus, Pelotomaculum thermopropionicum, Acidithiobacillus caldus, Acidithiobacillus ferrooxidans, Allochromatium vinosum, Marinobacter sp., Nitrosococcus halophilus, Nitrosococcus watsoni, Pseudoalteromonas haloplanktis, Ktedonobacter racemifer, Methanohalobium
 5 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.

10 **[028]** En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Streptococcus thermophilus*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Neisseria meningitidis*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Staphylococcus aureus*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Francisella novicida*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1
 15 de *Acidaminococcus* sp. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de bacteria ND2006 *Lachnospiraceae*. En modalidades adicionales, 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*
 20 *disiens* o *Porphyromonas macacae*. En determinadas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Acidaminococcus* o *Lachnospiraceae*.

[029] La Cas9 de tipo salvaje tiene dos dominios de nucleasa: RuvC y HNH. El dominio RuvC escinde la cadena de ADN no objetivo y el dominio de HNH escinde la cadena objetivo de ADN. En algunas modalidades, la nucleasa Cas9 comprende más de un dominio RuvC y/o más de un dominio HNH.
 25 En algunas modalidades, la nucleasa Cas9 es una Cas9 de tipo salvaje. En algunas modalidades, Cas9 es capaz de inducir una ruptura de cadena doble en el ADN objetivo. En determinadas modalidades, la nucleasa Cas puede escindir ADNcd, puede escindir una cadena de ADNcd o puede no tener actividad de cleavasa o nickasa de ADN. Una secuencia de aminoácidos de Cas9 ilustrativa se proporciona como la SEQ ID NO: 3. Una secuencia de ORF de ARNm de Cas9 ilustrativa, que incluye codones de inicio y
 30 terminación, se proporciona como SEQ ID NO: 4. Una secuencia codificante de ARNm de Cas9 ilustrativa, adecuada para la inclusión en una proteína de fusión, se proporciona como SEQ ID NO: 10.

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

5 **[031]** En otras modalidades, la nucleasa Cas puede ser un sistema CRISPR/Cas tipo I. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede ser un componente del complejo de cascada de un sistema de CRISPR/Cas tipo I. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede ser una proteína Cas3. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede ser de un sistema de CRISPR/Cas tipo III. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede tener una actividad de escisión de ARN.

10 **[032]** En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN tiene actividad de nickasa de cadena simple, es decir, puede cortar una cadena de ADN para producir una ruptura de cadena simple, también conocida como “nick” [mella]. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN comprende una nickasa Cas. Una nickasa es una enzima que crea una mella en el ADNcd, es decir, corta una cadena, pero no la otra, de la doble hélice del ADN. En algunas modalidades, una nickasa Cas
 15 es una versión de una nucleasa Cas (por ejemplo, una nucleasa Cas descrita anteriormente) en la cual se inactiva un sitio activo endonucleolítico, por ejemplo, mediante una o más alteraciones (por ejemplo, mutaciones puntuales) en un dominio catalítico. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8,889,356 por una discusión de las nickasas Cas y alteraciones del dominio catalítico ilustrativas. En algunas modalidades, una nickasa Cas, tal como una nickasa Cas9, tiene un dominio RuvC o HNH
 20 inactivado. Una secuencia de aminoácidos de nickasa Cas9 ilustrativa se proporciona como la SEQ ID NO: 6. Una secuencia de ORF de ARNm de nickasa Cas9 ilustrativa, que incluye codones de inicio y terminación, se proporciona como SEQ ID NO: 7. Una secuencia codificante de ARNm de nickasa Cas9 ilustrativa, adecuada para la inclusión en una proteína de fusión, se proporciona como SEQ ID NO: 11.

[033] En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN se modifica para contener
 25 solamente un dominio de nucleasa funcional. Por ejemplo, la proteína del agente puede modificarse de manera que uno de los dominios de nucleasa mute o se elimine total o parcialmente para reducir su actividad de escisión de ácido nucleico. En algunas modalidades, se utiliza una nickasa que tiene un dominio RuvC con actividad reducida. En algunas modalidades, se utiliza una nickasa que tiene un dominio RuvC inactivo. En algunas modalidades, se utiliza una nickasa que tiene un dominio HNH con
 30 actividad reducida. En algunas modalidades, se utiliza una nickasa que tiene un dominio HNH inactivo.

[034] En algunas modalidades, un aminoácido conservado dentro de un dominio de nucleasa de proteína Cas se sustituye para reducir o alterar una actividad de nucleasa. En algunas modalidades, un nucleasa Cas puede comprender una sustitución de aminoácido en el dominio de nucleasa RuvC o tipo RuvC. Los ejemplos de sustituciones de aminoácido en el dominio de nucleasa RuvC o tipo RuvC incluyen D10A (basada en la proteína Cas9 de *S. pyogenes*). Véase, por ejemplo, Zetsche et ál. (2015) *Cell* oct 22:163(3): 759-771. En algunas modalidades, la nucleasa Cas puede comprender una sustitución de aminoácido en el dominio de nucleasa HNH o tipo HNH. Los ejemplos de sustituciones de aminoácido en el dominio de nucleasa HNH o tipo HNH incluyen E762A, H840A, N863A, H983A y D986A (basadas en la proteína Cas9 de *S. pyogenes*). Véase, por ejemplo, Zetsche et ál. (2015). Los ejemplos adicionales de sustituciones de aminoácido incluyen D917A, E1006A y D1255A (basadas en la secuencia U112 Cpf1 (FnCpf1) de *Francisella novicida* (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN))).

[035] En algunas modalidades, se proporciona un ARNm que codifica una nickasa en combinación con un par de ARN guía que son complementarios a las cadenas sentido y antisentido de la secuencia objetivo, respectivamente. En esta modalidad, los ARN guía dirigen la nickasa hacia una secuencia objetivo y producir una DSB al generar una mella en cadenas opuestas de la secuencia objetivo (es decir, mella doble). En algunas modalidades, el uso de mellas dobles puede mejorar la especificidad y reducir los efectos fuera del objetivo. En algunas modalidades, se utiliza una nickasa junto con dos ARN guía separados dirigidos a cadenas opuestas de ADN para producir una mella doble en el ADN objetivo. En algunas modalidades, se utiliza una nickasa junto con dos ARN guía separados que se seleccionan para que estén cercanos para producir una mella doble en el ADN objetivo.

[036] En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN carece de actividad de cleavasa y nickasa. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN comprende un polipéptido de unión a ADN dCas. Un polipéptido de dCas tiene actividad de unión al ADN a la vez que carece esencialmente de actividad catalítica (cleavasa/nickasa). En algunas modalidades, el polipéptido dCas es un polipéptido dCas9. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN carece de actividad de cleavasa y nickasa o el polipéptido de unión a ADN dCas es una versión de una nucleasa Cas (por ejemplo, una nucleasa Cas descrita anteriormente) en la cual sus sitios activos endonucleolíticos están inactivados, por ejemplo, mediante una o más alteraciones (por ejemplo, mutaciones puntuales) en sus dominios catalíticos. Véanse, por ejemplo U.S. 2014/0186958 A1; U.S. 2015/0166980 A1. Una secuencia de aminoácidos de dCas9 ilustrativa se proporciona como la SEQ ID NO: 8. Una secuencia de ORF de ARNm de Cas9 ilustrativa, que incluye codones de inicio y terminación, se proporciona como

SEQ ID NO: 9. Una secuencia codificante de ARNm de Cas9 ilustrativa, adecuada para la inclusión en una proteína de fusión, se proporciona como SEQ ID NO: 12.

[037] En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN comprende uno o más sitios funcionales heterólogos (por ejemplo, es o comprende un polipéptido de fusión).

5 **[038]** En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede facilitar el transporte del agente de unión a ADN guiada por ARN al núcleo de una célula. Por ejemplo, el dominio funcional heterólogo puede ser una señal de localización nuclear (NLS). En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con 1-10 NLS. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con 1-5 NLS. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con una NLS. Cuando se utiliza una NLS, la NLS puede unirse en el extremo N o en el extremo C de la secuencia del agente de unión a ADN guiada por ARN. También se puede insertar dentro de la secuencia del agente de unión a ADN guiada por ARN. En otras modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con más de una NLS. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con 2, 3, 4 o 5 NLS. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con dos NLS. En determinadas circunstancias, las dos NLS pueden ser iguales (por ejemplo, dos NLS SV40) o diferentes. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN se fusiona con dos secuencias de NLS de SV40 unidas en el extremo carboxi. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con dos NLS, una unida en el extremo N y una en el extremo C. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con 3 NLS. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN no se fusiona con ninguna NLS. En algunas modalidades, la NLS puede ser una secuencia monopartita, tal como, por ejemplo, NLS SV40, PKKKRKV o PKKKRRV. En algunas modalidades, la NLS puede ser una secuencia bipartita, tal como la NLS de nucleoplasmina, KRPAATKKAGQAKKKK. En una modalidad específica, una única NLS PKKKRKV puede unirse en el extremo C del agente de unión a ADN guiada por ARN. Se incluyen opcionalmente uno o más enlazadores en el sitio de fusión.

[039] En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede modificar la semivida intracelular del agente de unión a ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, la semivida del agente de unión a ADN guiado por ARN puede aumentarse. En algunas modalidades, la semivida del agente de unión a ADN guiado por ARN puede reducirse. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede aumentar la estabilidad del agente de unión a ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, el

dominio funcional heterólogo puede reducir la estabilidad del agente de unión a ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede actuar como un péptido señal para la degradación de proteínas. En algunas modalidades, la degradación de proteínas puede estar mediada por enzimas proteolíticas, tales como, por ejemplo, proteasomas, proteasas lisosomales o proteasas calpaínas.

5 En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede comprender una secuencia PEST. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiado por ARN puede modificarse mediante la adición de una cadena de poliubiquitina o ubiquitina. En algunas modalidades, la ubiquitina puede ser una proteína similar a ubiquitina (UBL). Los ejemplos no taxativos de proteínas similares a ubiquitina incluyen modificador pequeño similar a la ubiquitina (SUMO), proteína de reactividad cruzada con ubiquitina (UCRP, por sus siglas en inglés, también conocida como gen 15 estimulado por interferón (ISG15)), modificador 1 relacionado con ubiquitina (URM1), proteína 8 regulada por disminución del desarrollo expresada en células precursoras neuronales (NEDD8, también llamada Rub1 en *S. cerevisiae*), leucocitos humanos asociados con antígeno F (FAT10), autofagia 8 (ATG8) y 12 (ATG12), proteína similar a ubiquitina Fau (FUB1), UBL anclada a membrana (MUB), modificador del pliegue de ubiquitina 1 (UFM1) y proteína similar a ubiquitina 5 (UBL5).

[040] En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede ser un dominio marcador. Los ejemplos no taxativos de dominios marcadores incluyen proteínas fluorescentes, etiquetas de purificación, etiquetas de epítomos o secuencias de genes reporteros. En algunas modalidades, el dominio marcador puede ser una proteína fluorescente. Los ejemplos 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, Citrino, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), proteínas fluorescentes azules (por ejemplo, EBFP, EBFP2, Azurita, mKalamal, GFPuv, Zafiro, T-zafiro), proteínas fluorescentes cian (por ejemplo, ECFP, Cerúleo, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), proteínas fluorescentes rojas (por ejemplo, mKate, mKate2, mPlum, monómero DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monómero, HcRed-Tándem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred), proteínas fluorescentes naranjas (por ejemplo, mOrange, mKO, Kusabira-Orange, Kusabira-Orange monomérica, mTangerine, tdTomato) o cualquier otra proteína fluorescente adecuada. En otras modalidades, el dominio marcador puede ser una etiqueta de purificación y/o una etiqueta de epítomo. Los ejemplos no taxativos de etiquetas incluyen glutathion-S-transferasa (GST), proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP), tioredoxina (TRX), poli(NANP), etiqueta 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 carboxilo biotina (BCCP), poli-His y calmodulina. Los ejemplos no taxativos de genes reporteros incluyen glutation-S-transferasa (GST), peroxidasa de rábano picante (HRP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, luciferasa o proteínas fluorescentes.

[041] En modalidades adicionales, el dominio funcional heterólogo puede dirigir el agente de unión a ADN guiado por ARN hacia un organelo, tipo celular, tejido u órgano específico. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede dirigir el agente de unión a ADN guiado por ARN hacia la mitocondria.

[042] En modalidades adicionales, el dominio funcional heterólogo puede ser un dominio efector. Cuando el agente de unión a ADN guiado por ARN se dirige hacia su secuencia objetivo, por ejemplo, cuando la nucleasa Cas se dirige hacia una secuencia objetivo mediante un ARNg, el dominio efector puede modificar o afectar la secuencia objetivo. En algunas modalidades, el dominio efector puede elegirse de un dominio de unión a ácido nucleico, un dominio de nucleasa (por ejemplo, un dominio de nucleasa que no sea Cas), un dominio de modificación epigenética, un dominio de activación transcripcional o un dominio represor transcripcional. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo es una nucleasa, tal como una nucleasa FokI. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 9,023,649. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo es un activador o represor transcripcional. Véanse, por ejemplo, Qi et ál., “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression,” *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera et ál., “RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors”, *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali et ál., “CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering”, *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert et ál., “CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes”, *Cell* 154:442-51 (2013). En sí, el agente de unión a ADN guiado por ARN se vuelve esencialmente un factor de transcripción que puede dirigirse para unirse a una secuencia objetivo deseada mediante el uso de ARN guía. En determinadas modalidades, el dominio de modificación del ADN es un dominio de metilación, tal como un dominio de desmetilación o metiltransferasa. En determinadas modalidades, el dominio efector es un dominio de modificación de ADN, tal como un dominio de edición de bases. En modalidades particulares, el dominio de modificación del ADN es un dominio de edición de ácido nucleico que introduce una modificación específica en el ADN, tal como un dominio de desaminasa. Véanse, por ejemplo, WO 2015/089406; U.S. 2016/0304846.

Los dominios de edición de ácido nucleico, dominios de desaminasa y variantes de Cas9 descritos en WO 2015/089406 y U.S. 2016/0304846 se incorporan al a presente mediante esta referencia.

[043] La nucleasa puede comprender al menos un dominio que interactúa con un ARN guía (“ARNg”). De manera adicional, la nucleasa puede dirigirse a una secuencia objetivo mediante ARNg.

En los sistemas de nucleasa Cas clase 2, el ARNg interactúa con la nucleasa, así como con la secuencia objetivo, de manera que dirige la unión a la secuencia objetivo. En algunas modalidades, el ARNg proporciona la especificidad para la escisión dirigida, y la nucleasa puede ser universal y unirse a diferentes ARNg para escindir diferentes secuencias objetivo. La nucleasa Cas clase 2 puede aparearse con una estructura de andamiaje de ARNg de los tipos, ortólogos y especies ilustrativas enumeradas anteriormente.

ARN guía (ARNg)

[044] En algunas modalidades de la presente descripción, la carga de la formulación de LNP incluye al menos un ARNg. El ARNg puede guiar la nucleasa Cas o nucleasa Cas clase 2 a una secuencia objetivo en una molécula de ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, un ARNg se une a una nucleasa Cas Clase 2 y proporciona especificidad de escisión mediante esta. En algunas modalidades, el ARNg y la nucleasa Cas pueden formar una ribonucleoproteína (RNP), por ejemplo, un complejo CRISPR/Cas, tal como un complejo CRISPR/Cas9 que puede administrarse mediante la composición de LNP. En algunas modalidades, el complejo de CRISPR/Cas puede ser un complejo de CRISPR/Cas9 Tipo II. En algunas modalidades, el complejo de CRISPR/Cas puede ser un complejo de CRISPR/Cas de Tipo V, tal como un complejo de Cpf1/ARN guía. Las nucleasas Cas y ARNg cognados pueden aparearse. Las estructuras de andamiaje de ARNg que se aparean con cada nucleasa Cas clase 2 varían con el sistema CRISPR/Cas específico.

[045] “ARN guía”, “ARNg” y simplemente “guía” se utilizan de manera indistinta para referirse ya sea a ARNcr (también conocido como ARN CRISPR) o a la combinación de un ARNcr y un ARNtr (también conocido como ARNtracr). El ARNcr y ARNtr pueden asociarse como una única molécula de ARN (ARN guía simple, ARNgs) o en dos moléculas de ARN separadas (ARN guía dual, ARNgd). “ARN guía” o “ARNg” se refieren a cada tipo. El ARNtr puede ser una secuencia de origen natural, o una secuencia de ARNtr con modificaciones o variaciones en comparación con las secuencias de origen natural.

[046] Tal 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 objetivo y funciona para dirigir un ARN guía a una

secuencia objetivo para la unión o modificación (por ejemplo, escisión) mediante un agente de unión a ADN guiada por ARN. Una “secuencia guía” también puede mencionarse como una “secuencia de direccionamiento” o una “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 ortólogos/homólogos de Cas9 relacionados. También se pueden utilizarse secuencias mayores o menores como guías, por ejemplo, con 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia objetivo está en un gen o en un cromosoma, por ejemplo, y es complementaria a la secuencia guía. En algunas modalidades, el grado de complementariedad o identidad entre una secuencia guía y su secuencia objetivo correspondiente puede ser de alrededor de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas modalidades, la secuencia guía y la región objetivo pueden ser 100 % complementarias o idénticas. En otras modalidades, la secuencia guía y la región objetivo pueden contener al menos un mal apareamiento. Por ejemplo, la secuencia guía y la secuencia objetivo pueden contener 1, 2, 3 o 4 mal apareamientos, donde la longitud total de la secuencia objetivo es de al menos 17, 18, 19, 20 o más pares de bases. En algunas modalidades, la secuencia guía y la región objetivo pueden contener 1-4 mala apareamientos donde la secuencia guía comprende al menos 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia guía y la región objetivo pueden contener 1, 2, 3 o 4 mal apareamientos, donde la secuencia guía comprende 20 nucleótidos.

[047] Las secuencias objetivo para proteínas Cas incluyen las cadenas negativa y positiva del ADN genómico (es decir, la secuencia dada y el complemento inverso de la secuencia), dado que un sustrato de ácido nucleico para una proteína Cas es un ácido nucleico de cadena doble. Por consiguiente, cuando se dice que una secuencia guía es “complementaria a una secuencia objetivo”, se entiende que la secuencia guía puede dirigir un ARN guía para unirse al complemento inverso de la secuencia objetivo. Por lo tanto, en algunas modalidades, cuando la secuencia guía se une al complemento inverso de una secuencia objetivo, la secuencia guía es idéntica a determinados nucleótidos de la secuencia objetivo (por ejemplo, la secuencia objetivo que no incluye el PAM) excepto por la sustitución de U por T en la secuencia guía.

[048] La longitud de la secuencia de direccionamiento puede depender del sistema de CRISPR/Cas y los componentes utilizados. Por ejemplo, diferentes nucleasas Cas clase 2 de diferentes especies de bacterias tienen diversas longitudes de secuencia de direccionamiento óptimas. Por consiguiente, la secuencia de direccionamiento puede comprender una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más de 50 nucleótidos. En algunas modalidades, la longitud de la secuencia objetivo es 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos más larga o más corta que

la secuencia guía de un sistema CRISPR/Cas de origen natural. En determinadas modalidades, el andamiaje de ARNg y nucleasa Cas se derivará del mismo sistema CRISPR/Cas. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento puede comprender o consistir en 18-24 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento puede comprender o consistir en 19-21 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento puede comprender o consistir en 20 nucleótidos.

[049] En algunas modalidades, el ARNgs es un “ARNgs de Cas9” capaz de mediar la escisión de ADN guiada por ARN mediante una proteína Cas9. En algunas modalidades, el ARNgs es un “ARNgs de Cpf1” capaz de mediar la escisión de ADN guiada por ARN mediante una proteína Cpf1. En determinadas modalidades, el ARNg comprende un ARNcr y ARN tracr suficiente para formar un complejo activo con una proteína Cas9 y mediar la escisión de ADN guiada por ARN. En determinadas modalidades, el ARNg comprende un ARNcr suficiente para formar un complejo activo con una proteína Cpf1 y mediar la escisión de ADN guiada por ARN. Véase Zetsche 2015.

[050] Determinadas modalidades de la invención también proporcionan ácidos nucleicos, por ejemplo, casetes de expresión, que codifican el ARNg descrito en la presente. Un “ácido nucleico de ARN guía” se utiliza en la presente para hacer referencia a un ARN guía (por ejemplo, un ARNgs o un ARNgd) en un casete de expresión de ARN guía, que es un ácido nucleico que codifica uno o más ARN guías.

[051] En algunas modalidades, el ácido nucleico puede ser una molécula de ADN. En algunas modalidades, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un ARNcr. En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica el ARNcr codificante una secuencia de direccionamiento flanqueada por la totalidad o parte de una secuencia de repetición de un sistema de CRISPR/Cas de origen natural. En algunas modalidades, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un ARN tracr. En algunas modalidades, el ARNcr y el ARN tracr pueden estar codificados por dos ácidos nucleicos separados. En otras modalidades, el ARNcr y el ARN tracr pueden estar codificados por un único ácido nucleico. En algunas modalidades, el ARNcr y el ARN tracr pueden estar codificados por cadenas opuestas de un único ácido nucleico. En otras modalidades, el ARNcr y el ARN tracr pueden estar codificados por la misma cadena de un único ácido nucleico. En algunas modalidades, el ácido nucleico de ARNg codifica un ARNgs. En algunas modalidades, el ácido nucleico de ARNg codifica una nucleasa Cas9 de ARNgs. En algunas modalidades, el ácido nucleico de ARNg codifica una nucleasa Cpf1 de ARNgs.

[052] La secuencia de nucleótidos que codifica el ARN guía puede estar unida de forma operativa a al menos una secuencia de codificante reguladora o transcripcional, tal como un promotor, una UTR 3’ o

una UTR 5'. En un ejemplo, el promotor puede ser un promotor de ARNt, por ejemplo, ARNt^{Lys3}, o una quimera de ARNt. Véase Mefferd et ál., *RNA*. 2015 21:1683-9; Scherer et ál., *Nucleic Acids Res.* 2007 35: 2620–2628. En determinadas modalidades, el promotor puede ser reconocido por una polimerasa III (Pol III) de ARN. Los ejemplos no taxativos de promotores de Pol III también incluyen promotores de H1 y U6. En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica el ARN guía puede estar unida de forma operativa a un promotor de U6 humano o de ratón. En algunas modalidades, el ácido nucleico de ARNg es un ácido nucleico modificado. En algunas modalidades, el ácido nucleico de ARNg incluye un nucleósido o nucleótido modificado. En algunas modalidades, el ácido nucleico de ARNg incluye una modificación en el extremo 5', por ejemplo, un nucleósido o nucleótido modificado para estabilizar y prevenir la integración del ácido nucleico. En algunas modalidades, el ácido nucleico de ARNg comprende un ADN de cadena doble que tiene una modificación en el extremo 5' de cada cadena. En determinadas modalidades, el ácido nucleico de ARNg incluye un didesoxi-T invertido o un nucleótido o nucleósido no básico invertido como la modificación en el extremo 5'. En algunas modalidades, el ácido nucleico de ARNg incluye una etiqueta, tal como una biotina, destiobioten-TEG, digoxigenina y marcadores fluorescentes, inclusive, por ejemplo, FAM, ROX, TAMRA y AlexaFluor.

[053] En determinadas modalidades, puede utilizarse más de un ácido nucleico de ARNg, tal como un ARNg, con un sistema de CRISPR/nucleasa Cas. Cada ácido nucleico de ARNg puede contener una secuencia de direccionamiento diferente, de manera que el sistema de CRISPR/Cas escinda más de una secuencia objetivo. En algunas modalidades, uno o más ARNg pueden tener propiedades iguales o diferentes, tales como actividad y estabilidad, dentro de un complejo de CRISPR/Cas. Cuando se utiliza más de un ARNg, cada ARNg puede estar codificado en el mismo ácido de ARNg o en uno diferente. Los promotores utilizados para impulsar la expresión de más de un ARNg pueden ser iguales o diferentes.

ARN modificados

[054] En determinadas modalidades, las composiciones de LNP comprenden ARN modificados.

[055] Puede haber presentes nucleósidos o nucleótidos modificados en un ARN, por ejemplo, un ARNg o ARNm. Un ARNg o ARNm que comprende uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados, por ejemplo, se denomina un ARN “modificado” para describir la presencia de una o más configuraciones o componentes de origen natural y/o no natural que se utilizan en lugar o además de los residuos A, G, C y U canónicos. En algunas modalidades, un ARN modificado se sintetiza sin un nucleósido o nucleótido no canónico, llamado aquí “modificado”.

[056] Los nucleósidos o nucleótidos modificados pueden incluir: (i) alteración, por ejemplo, reemplazo, de uno o ambos oxígenos que no son de unión a fosfato y/o uno o más de los oxígenos de unión a fosfato en la unión de estructura principal de fosfodiéster (un ejemplo de modificación a la estructura principal); (ii) alteración, por ejemplo, reemplazo, de un constituyente del azúcar ribosa, por ejemplo, del 2' hidroxilo en el azúcar ribosa (un ejemplo de modificación de azúcar); (iii) reemplazo en conjunto del resto de fosfato con enlazadores “defosfo” (un ejemplo de modificación de la estructura principal); (iv) modificación o reemplazo de una nucleobase de origen natural, inclusive una nucleobase no canónica (un ejemplo de modificación de base); (v) reemplazo o modificación de la estructura principal de ribosa-fosfato (un ejemplo de modificación de estructura principal); (vi) modificación del extremo 3' o el extremo 5' del oligonucleótido, por ejemplo, eliminación, modificación o reemplazo de un grupo fosfato terminal o conjugación de un resto, casquete o enlazador (dichas modificaciones al casquete 3' o 5' pueden comprender una modificación de azúcar y/o estructura principal); y/o (vii) modificación o reemplazo del azúcar (un ejemplo de modificación de azúcar). Determinadas modalidades comprenden una modificación en el extremo 5' a un ARNm, ARNg o ácido nucleico. Determinadas modalidades comprenden una modificación en el extremo 3' a un ARNm, ARNg o ácido nucleico. Un ARN modificado puede contener modificaciones en el extremo 5' y el extremo 3'. Un ARN modificado puede contener uno o más residuos modificados en ubicaciones que no sean los extremos. En determinadas modalidades, un ARNg incluye al menos un residuo modificado. En determinadas modalidades, un ARNm incluye al menos un residuo modificado.

[057] Tal como se usa en la presente, una primera secuencia se considera que “comprende una secuencia con al menos X % de identidad con” una segunda secuencia, si la 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 respecto a la secuencia AAG porque una alineación daría un 100 % de identidad dado que hay coincidencias en las tres posiciones de la segunda secuencia. Las diferencias entre ARN y ADN (en general el cambio de uridina en lugar de timidina y viceversa) y la presencia de análogos de nucleósidos, tales como uridinas modificadas no contribuye a diferencias en la identidad o complementariedad entre polinucleótidos, siempre que los nucleótidos relevantes (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, las cuales tienen guanosina o guanosina modificada como 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 dado que ambas son perfectamente complementarias a la misma secuencia (5'-CAU). Los algoritmos de alineación ilustrativos son los algoritmos de Smith-Waterman y Needleman-Wunsch, que son conocidos en la técnica. Un experto en la técnica entenderá qué elección del algoritmo y configuraciones de parámetros son adecuadas para un par dado de secuencias que se van a alinear; para secuencias de longitud generalmente similar e identidad esperada >50 % para aminoácidos o >75 % para nucleótidos, el algoritmo de Needleman-Wunsch con parámetros por defecto de la interfaz de Needleman-Wunsch proporcionada por el EBI en el servidor web www.ebi.ac.uk es generalmente apropiado.

ARNm

[058] En algunas modalidades, una composición o formulación descrita en la presente comprende un ARNm que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas o una nucleasa Cas clase 2, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, se proporciona, utiliza o administra un ARNm comprende un ORF que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas o nucleasa Cas clase 2. En algunas modalidades, el ORF que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN es un “ORF de agente de unión a ADN guiada por ARN modificado” o simplemente un “ORF modificado”, que se utiliza como abreviación para indicar que el ORF está modificado de una o más de las siguientes maneras: (1) el ORF modificado tiene un contenido de uridina que oscila de su contenido de uridina mínimo a 150 % del contenido mínimo de uridina; (2) el ORF modificado tiene un contenido de dinucleótido de uridina que oscila de su contenido de dinucleótido de uridina mínimo a 150 % del contenido mínimo de dinucleótido de uridina; (3) el ORF modificado tiene al menos 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66; (4) el ORF modificado consiste en un conjunto de codones de los cuales al menos 75 % de los codones son codones de uridina mínima para un aminoácido dado, por ejemplo, los codones con la menor cantidad de uridina (usualmente 0 o 1, excepto para un codón para fenilalanina, donde el codón de uridina mínima tiene 2 uridinas); o (5) el ORF modificado comprende al menos una uridina modificada. En algunas modalidades, el ORF modificado se modifica en al menos dos, tres o cuatro de las formas anteriores. En algunas modalidades, el ORF modificado comprende al menos una uridina modificada y se modifica en al menos una, dos, tres o todas de (1)-(4) anteriores.

[059] “Uridina modificada” se usa en la presente para referirse a un nucleósido que no sea timidina con los mismos aceptores de enlaces de hidrógeno que la uridina y una o más diferencias estructurales de la uridina. En algunas modalidades, una uridina modificada es una uridina sustituida, es decir, una uridina en la cual uno o más sustituyentes que no son protones (por ejemplo, alcoxi, tal como metoxi) toman el lugar de un protón. En algunas modalidades, una uridina modificada es pseudouridina. En algunas modalidades, una uridina modificada es una pseudouridina sustituida, es decir, una pseudouridina en la cual uno o más sustituyentes que no son protones (por ejemplo, alquilo, tal como metilo) toman el lugar de un protón. En algunas modalidades, una uridina es cualquiera de una uridina sustituida, pseudouridina o una pseudouridina sustituida.

[060] “Posición de uridina”, tal como se usa en la presente, se refiere a una posición en un polinucleótido ocupada por una uridina o una uridina modificada. Por lo tanto, por lo tanto, un polinucleótido en el cual “100 %” de las posiciones de uridina son uridinas modificadas contiene una uridina modificada en cada posición que sería una uridina en un ARN convencional (donde todas las bases son bases A, U, C o G estándar) de la misma secuencia. A menos que se indique lo contrario, una U en una secuencia de polinucleótidos de una tabla de secuencias o listado de secuencias en o adjunto a la presente descripción puede ser una uridina o una uridina modificada.

Tabla 1. Codones de uridina mínima.

	Aminoácido	Codones de uridina mínima
A	Alanina	GCA o GCC o GCG
G	Glicina	GGA o GGC o GGG
V	Valina	GUC o GUA o GUG
D	Ácido aspártico	GAC
E	Ácido glutámico	GAA o GAG
I	Isoleucina	AUC o AUA o AUG
T	Treonina	ACA o ACC o ACG
N	Asparagina	AAC
K	Lisina	AAG o AAA
S	Serina	AGC
R	Arginina	AGA o AGG
L	Leucina	CUG o CUA o CUC
P	Prolina	CCG o CCA o CCC

H	Histidina	CAC o CAA o CAG
Q	Glutamina	CAG o CAA
F	Fenilalanina	UUC
Y	Tirosina	UAC
C	Cisteína	UGC
W	Triptófano	UGG
M	Metionina	AUG

[061] En cualquiera de las modalidades anteriores, el ORF modificado puede consistir en un consiste en de codones de los cuales al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de los codones están enumerados en la Tabla de codones de uridina mínima. En cualquiera de las modalidades anteriores, el ORF modificado puede comprender una secuencia con al menos 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66.

[062] En cualquiera de las modalidades anteriores, el ORF modificado puede comprender una secuencia con al menos 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66.

[063] En cualquiera de las modalidades anteriores, el ORF modificado puede tener un contenido de uridina que oscile de su contenido mínimo de uridina a 150 %, 145 %, 140 %, 135 %, 130 %, 125 %, 120 %, 115 %, 110 %, 105 %, 104 %, 103 %, 102 % o 101 % del contenido mínimo de uridina.

[064] En cualquiera de las modalidades anteriores, el ORF modificado puede tener un contenido de dinucleótido de uridina que oscile de su contenido mínimo de dinucleótido de uridina a 150 %, 145 %, 140 %, 135 %, 130 %, 125 %, 120 %, 115 %, 110 %, 105 %, 104 %, 103 %, 102 % o 101 % del contenido mínimo de dinucleótido de uridina.

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

5-yodouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es pseudouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es N1-metil-pseudouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y N1-metil-pseudouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de N1-metil pseudouridina y 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de 5-yodouridina y N1-metil-pseudouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y 5-yodouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de 5-yodouridina y 5-metoxiuridina.

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

[067] En cualquiera de las modalidades anteriores, el ORF modificado puede comprender un contenido de dinucleótido de uridina reducido, tal como el menor contenido de dinucleótido de uridina (UU) posible, por ejemplo, un ORF que (a) utiliza un codón de uridina mínima (tal como se describió

anteriormente) en cada posición y (b) codifica la misma secuencia de aminoácidos que el ORF dado. El contenido de dinucleótido de uridina (UU) puede expresarse en términos absolutos como la enumeración de dinucleótidos UU en un ORF o como relación del porcentaje de posiciones ocupadas por uridinas de los dinucleótidos de uridina (por ejemplo, AUUAU tendría un contenido de dinucleótido de uridina de 40 % porque 2 de las 5 posiciones están ocupadas por uridinas de un dinucleótido de uridina). Los residuos de uridina modificada se consideran equivalentes a uridinas con el fin de evaluar el contenido de dinucleótido de uridina mínimo.

[068] En algunas modalidades, el ARNm comprende al menos una UTR de un ARNm de mamífero expresado, tal como un ARNm expresado de manera constitutiva. Se considera que un ARNm se expresa de manera constitutiva en un mamífero si se transcribe de manera constitutiva en al menos un tejido de un mamífero adulto sano. En algunas modalidades, el ARNm comprende una UTR 5', una UTR 3', o UTR tango 5' como 3' de un ARN de mamífero expresado, tal como un ARNm de mamífero expresado de manera constitutiva. ARNm de actina es un ejemplo de un ARN expresado de manera constitutiva.

[069] En algunas modalidades, el ARNm comprende al menos una UTR de hidroxisteroide 17-beta deshidrogenasa 4 (HSD17B4 o HSD), por ejemplo, una UTR 5' de HSD. En algunas modalidades, el ARNm comprende al menos una UTR de ARNm de globina, por ejemplo, ARNm de alfa globina humana (HBA), ARNm de beta globina humana (HBB) o ARNm de beta globina de *Xenopus laevis* (XBG). En algunas modalidades, el ARNm comprende una UTR 5', una UTR 3', o UTR tango 5' como 3' de un ARNm de globina, tal como HBA, HBB o XBG. En algunas modalidades, el ARNm comprende una UTR 5' de hormona bovina del crecimiento, citomegalovirus (CMV), Hba-a1 de ratón, HSD, un gen de albúmina, HBA, HBB o XBG. En algunas modalidades, el ARNm comprende una UTR 3' de hormona bovina del crecimiento, citomegalovirus, Hba-a1 de ratón, HSD, un gen de albúmina, HBA, HBB o XBG. En algunas modalidades, el ARNm comprende UTR 5' y 3' de hormona bovina del crecimiento, citomegalovirus, Hba-a1 de ratón, HSD, un gen de albúmina, HBA, HBB, XBG, proteína de choque térmico 90 (Hsp90), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), beta-actina, alfa-tubulina, proteína tumoral (p53 o receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

[070] En algunas modalidades, el ARNm comprende UTR 5' y 3' que son de la misma fuente, por ejemplo, un ARNm expresado de manera constitutiva, tal como actina, albúmina o una globina, tal como HBA, HBB o XBG.

[071] En algunas modalidades, el ARNm no comprende una UTR 5', por ejemplo, no hay nucleótidos adicionales entre el casquete 5' y el codón de inicio. En algunas modalidades, el ARNm comprende una

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

[072] En algunas modalidades, el ARNm comprende una secuencia de Kozak. La secuencia de Kozak puede afectar el inicio de la traducción y el rendimiento general de un polipéptido traducido a partir de un ARNm. Una secuencia de Kozak incluye un codón de metionina que puede funcionar como el codón de inicio. Una secuencia de Kozak mínima es NNNRUGN, donde al menos uno de los siguientes se cumple: la primera N es A o G y la segunda N es G. En el contexto de una secuencia de nucleótidos, R significa una purina (A o G). En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es RNNRUGN, NNNRUGG, RNNRUGG, RNNAUGN, NNNAUGG o RNNAUGG. En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es rccRUGg con cero mal apareamientos o con hasta uno o dos mal apareamientos en las posiciones en minúscula. En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es rccAUGg con cero mal apareamientos o con hasta uno o dos mal apareamientos en las posiciones en minúscula. En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es gccRccAUGG con cero mal apareamientos o con hasta uno, dos o tres mal apareamientos en las posiciones en minúscula. En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es gccAccAUG con cero mal apareamientos o con hasta uno, dos, tres o cuatro mal apareamientos en las posiciones en minúscula. En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es GCCACCAUG. En algunas modalidades, la secuencia de Kozak es gccgccRccAUGG con cero mal apareamientos o con hasta uno, dos, tres o cuatro mal apareamientos en las posiciones en minúscula.

[073] En algunas modalidades, el ARNm comprende un ORF que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 43, opcionalmente donde el ORF de la SEQ ID NO: 43 (es decir, SEQ ID NO: 4) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66.

[074] En algunas modalidades, el ARNm comprende un ORF que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 44, opcionalmente donde el ORF de la SEQ ID NO: 44 (es decir, SEQ ID NO: 4) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66.

[075] En algunas modalidades, el ARNm comprende un ORF que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO:

56, opcionalmente donde el ORF de la SEQ ID NO: 56 (es decir, SEQ ID NO: 4) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66.

[076] En algunas modalidades, el ARNm comprende un ORF que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 57, opcionalmente donde el ORF de la SEQ ID NO: 57 (es decir, SEQ ID NO: 4) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66.

[077] En algunas modalidades, el ARNm comprende un ORF que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 58, opcionalmente donde el ORF de la SEQ ID NO: 58 (es decir, SEQ ID NO: 4) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66.

[078] En algunas modalidades, el ARNm comprende un ORF que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 59, opcionalmente donde el ORF de la SEQ ID NO: 59 (es decir, SEQ ID NO: 4) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66.

[079] En algunas modalidades, el ARNm comprende un ORF que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 60, opcionalmente donde el ORF de la SEQ ID NO: 60 (es decir, SEQ ID NO: 4) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66.

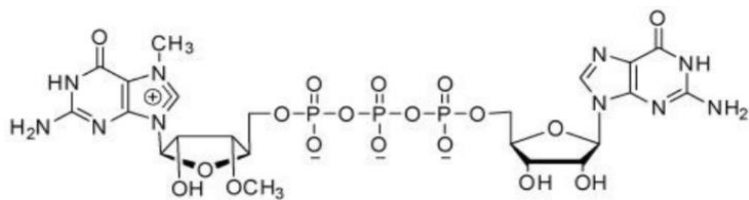
[080] En algunas modalidades, el ARNm comprende un ORF que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN que comprende una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 61, opcionalmente donde el ORF de la SEQ ID NO: 61 (es decir, SEQ ID NO: 4) se sustituye con un ORF alternativo de cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66.

[081] En algunas modalidades, el ARNm comprende un ORF alternativo de cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66.

[082] En algunas modalidades, el grado de identidad con respecto a las secuencias sustituidas opcionalmente de las SEQ ID NO 43, 44 o 56-61 es 95 %. En algunas modalidades, el grado de identidad con respecto a las secuencias sustituidas opcionalmente de las SEQ ID NO 43, 44 o 56-61 es 98 %. En algunas modalidades, el grado de identidad con respecto a las secuencias sustituidas opcionalmente de las SEQ ID NO 43, 44 o 56-61 es 99 %. En algunas modalidades, el grado de identidad con respecto a las secuencias sustituidas opcionalmente de las SEQ ID NO 43, 44 o 56-61 es 100 %.

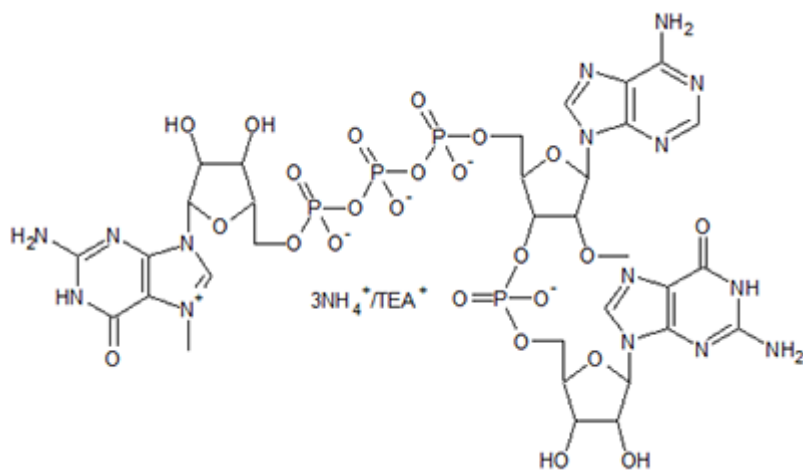
[083] En algunas modalidades, un ARNm descrito en la presente comprende un casquete 5', tal como un Cap0, Cap1 o Cap2. Un casquete 5' es generalmente un ribonucleótido de 7-metilguanina (que puede modificarse adicionalmente como se describe más adelante, por ejemplo, con respecto a ARCA) unido a través de un 5'-trifosfato a la posición 5' del primer nucleótido de la cadena 5' a 3' del ARNm, es decir, el primer nucleótido proximal al casquete. En Cap0, las ribosas del primer y segundo nucleótidos proximales del ARNm comprenden un 2'-hirdoxilo. En Cap1, las ribosas del primer y segundo nucleótidos transcriptos del ARNm comprenden un 2'-metoxi y un 2'-hidroxilo, respectivamente. En Cap2, las ribosas del primer y segundo nucleótidos proximales del ARNm comprenden un 2'-metoxi. Véase, por ejemplo, Katibah et ál. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30; Abbas et ál. (2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115. La mayoría de los ARNm eucariotas superiores endógenos, que incluyen ARNm de mamífero, tales como ARNm humanos, comprenden Cap1 o Cap2. Cap0 y otras estructuras de casquete que difieren de Cap1 y Cap2 pueden ser inmunogénicas en mamíferos, tales como seres humanos, debido a que los componentes del sistema inmunitario innato, tales como IFIT-1 e IFIT-5, las reconocen “no propias”, lo cual puede dar como resultado niveles elevados de citocina, incluido el interferón tipo I. Los componentes del sistema inmunitario innato, tales como IFIT-1 e IFIT-5, también pueden competir con eIF4E por la unión de un ARNm con un casquete que no sea Cap1 o Cap2, lo cual puede inhibir la traducción del ARNm.

[084] Un casquete puede incluirse de forma cotranscripcional. Por ejemplo, ARCA (análogo de casquete anti-inverso; Thermo Fisher Scientific n.º de cat. AM8045) es un análogo de casquete que comprende 3'-metoxi-5'-trifosfato de 7-metilguanina unido a la posición 5' de un ribonucleótido de guanina que puede incorporarse in vitro en un transcripto al inicio. ARCA da como resultado un casquete Cap0 en el cual la posición 2' del primer nucleótido proximal al casquete es hidroxilo. Véase, por ejemplo, Stepinski et ál., (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.



[085] 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) se pueden utilizar para proporcionar la estructura de Cap1 de forma cotranscripcional. Hay disponibles versiones 3'-

5 O-metiladas de CleanCap™ AG y CleanCap™ GG de TriLink Biotechnologies como los n.º de cat. N-7413 y N-7433, respectivamente. La estructura de CleanCap™ AG se muestra a continuación.



[086] De manera alternativa, se puede agregar un casquete a un ARN de manera postranscripcional. Por ejemplo, la enzima de formación de casquetes Vaccinia está disponible en el mercado New England Biolabs n.º de cat. M2080S) y tiene actividades de gualiltransferasa y trifosfatasa de ARN, proporcionadas por su subunidad D1, y guanina metiltransferasa, proporcionada por su subunidad D12. En sí, puede agregar una 7-metilguanina a un ARN, de manera de proporcionar Cap0, en presencia de una S-adenosil metionina y GTP. Véase, 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.

[087] En algunas modalidades, el ARNm comprende, además, una cola poliadenilada (poli-A). En algunas modalidades, la cola poli-A comprende al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 adeninas, opcionalmente hasta 300 adeninas. En algunas modalidades, la cola poli-A comprende 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de adenina. En algunas instancias, la cola poli-A se “interrumpe” con uno o más “anclajes” de nucleótido que no son adenina en una o más ubicaciones dentro de la cola poli-A. Las colas poli-A pueden comprender al menos 8 nucleótidos de adenina consecutivos, pero también comprende uno

o más nucleótidos que no son adenina. Tal como se usa en la presente, “nucleótidos que no son adenina” se refiere a cualquier nucleótido natural o no natural que no comprenda adenina. Los nucleótidos de guanina, timina y citosina son nucleótidos que no son adenina ilustrativos. Por lo tanto, las colas poli-A en el ARNm descrito en la presente pueden comprender nucleótidos de adenina consecutivos ubicados 3’ con respecto a los nucleótidos que codifican un agente de unión a ADN guiada por ARN o una secuencia de interés. En algunas instancias, las colas poli-A en ARNm comprenden nucleótidos de adenina no consecutivos ubicados 3’ con respecto a los nucleótidos que codifican un agente de unión a ADN guiada por ARN o una secuencia de interés, donde los nucleótidos que no son adenina interrumpen los nucleótidos de adenina a intervalos separados de forma regular o irregular.

10 **[088]** En algunas modalidades, el ARNm comprende, además, una cola poliadenilada (poli-A). En algunas modalidades, la cola poli-A comprende al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 adeninas, opcionalmente hasta 300 adeninas. En algunas modalidades, la cola poli-A comprende 95, 96, 97, 98, 99 o 100 nucleótidos de adenina. En algunas instancias, la cola poli-A se “interrumpe” con uno o más “anclajes” de nucleótido que no son adenina en una o más ubicaciones dentro de la cola poli-A. Las colas poli-A pueden comprender al menos 8 nucleótidos de adenina consecutivos, pero también comprende uno o más nucleótidos que no son adenina. Tal como se usa en la presente, “nucleótidos que no son adenina” se refiere a cualquier nucleótido natural o no natural que no comprenda adenina. Los nucleótidos de guanina, timina y citosina son nucleótidos que no son adenina ilustrativos. Por lo tanto, las colas poli-A en el ARNm descrito en la presente pueden comprender nucleótidos de adenina consecutivos ubicados 3’ con respecto a los nucleótidos que codifican un agente de unión a ADN guiada por ARN o una secuencia de interés. En algunas instancias, las colas poli-A en ARNm comprenden nucleótidos de adenina no consecutivos ubicados 3’ con respecto a los nucleótidos que codifican un agente de unión a ADN guiada por ARN o una secuencia de interés, donde los nucleótidos que no son adenina interrumpen los nucleótidos de adenina a intervalos separados de forma regular o irregular.

25 **[089]** En algunas instancias, el o los nucleótidos que no son adenina se ubican para interrumpir los nucleótidos de adenina consecutivos de manera que una proteína de unión poli(A) pueda unirse a una extensión de nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, uno o más nucleótidos que no son adenina se ubican después de al menos 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, el o los nucleótidos que no son adenina se ubican después de al menos 8-50 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, el o los nucleótidos que no son adenina se ubican después de al menos 8-100 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, el

nucleótido que no se adenina está después de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete nucleótidos de adenina y seguido por al menos 8 nucleótidos de adenina consecutivos.

[090] La cola poli-A puede comprender una secuencia de nucleótidos de adenina consecutivos seguidos por al menos uno o más nucleótidos que no son adenina, opcionalmente seguidos por nucleótidos de adenina adicionales.

[091] En algunas modalidades, la cola poli-A comprende o contiene un nucleótido que no se adenina o una extensión consecutiva de 2-10 nucleótidos que no son adenina. En algunas modalidades, los nucleótidos que no son adenina se ubican después de al menos 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas instancias, el o los nucleótidos que no son adenina se ubican después de al menos 8-50 nucleótidos de adenina consecutivos. En algunas modalidades, el o los nucleótidos que no son adenina se ubican después de al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de adenina consecutivos.

[092] En algunas modalidades, el nucleótido que no es adenina es guanina, citosina o timina. En algunas instancias, el nucleótido que no es adenina es un nucleótido de guanina. En algunas modalidades, el nucleótido que no es adenina es un nucleótido de citosina. En algunas modalidades, el nucleótido que no es adenina es un nucleótido de timina. En algunas instancias, cuando hay presentes más de un nucleótido que no es adenina, el nucleótido que no es adenina puede seleccionarse de: a) nucleótidos de guanina y timina; b) nucleótidos de guanina y citosina; c) nucleótidos de timina y citosina; o d) nucleótidos de guanina, timina y citosina. Una poli-A ilustrativa que comprende nucleótidos que no son adenina se proporciona como la SEQ ID NO: 62.

[093] En algunas modalidades, el ARNm está purificado. En algunas modalidades, el ARNm se purifica mediante el uso de un método de precipitación (por ejemplo, precipitación de LiCl, precipitación de alcohol o un método equivalente, por ejemplo, tal como se describe en la presente). En algunas modalidades, el ARNm se purifica mediante el uso de un método a base de cromatografía, tal como método a base de HPLC o un método equivalente (por ejemplo, tal como se describe en la presente). En algunas modalidades, el ARNm se purifica mediante el uso tanto de un método de precipitación (por ejemplo, precipitación de LiCl) como de un método de precipitación basado en HPLC.

[094] En algunas modalidades, se proporciona al menos un ARNg en combinación con un ARNm descrito en la presente. En algunas modalidades, se proporciona un ARNg como una molécula separada

del ARNm. En algunas modalidades, se proporciona un ARNg como parte, tal como parte de una UTR, de un ARNm descrito en la presente.

ARNg modificado químicamente.

[095] En algunas modalidades, el ARNg se encuentra modificado químicamente. Un ARNg que comprende uno o más nucleósidos o nucleótidos se denomina un ARNg “modificado” o ARNg “modificado químicamente”, para describir la presencia de una o más configuraciones o componentes de origen natural y/o no natural que se utilizan en lugar o además de los residuos A, G, C y U canónicos. En algunas modalidades, un ARNg modificado se sintetiza sin un nucleósido o nucleótido no canónico, llamado aquí “modificado”. Los nucleósidos o nucleótidos modificados pueden incluir: (i) alteración, por ejemplo, reemplazo, de uno o ambos oxígenos que no son de unión a fosfato y/o uno o más de los oxígenos de unión a fosfato en la unión de estructura principal de fosfodiéster (un ejemplo de modificación a la estructura principal); (ii) alteración, por ejemplo, reemplazo, de un constituyente del azúcar ribosa, por ejemplo, del 2' hidroxilo en el azúcar ribosa (un ejemplo de modificación de azúcar); (iii) reemplazo en conjunto del resto de fosfato con enlazadores “defosfo” (un ejemplo de modificación de la estructura principal); (iv) modificación o reemplazo de una nucleobase de origen natural, inclusive una nucleobase no canónica (un ejemplo de modificación de base); (v) reemplazo o modificación de la estructura principal de ribosa-fosfato (un ejemplo de modificación de estructura principal); (vi) modificación del extremo 3' o el extremo 5' del oligonucleótido, por ejemplo, eliminación, modificación o reemplazo de un grupo fosfato terminal o conjugación de un resto, casquete o enlazador (dichas modificaciones al casquete 3' o 5' pueden comprender una modificación de azúcar y/o estructura principal); y/o (vii) modificación o reemplazo del azúcar (un ejemplo de modificación de azúcar).

[096] En algunas modalidades, un ARNg comprende una uridina modificada en algunas o todas las posiciones de uridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una uridina modificada en la posición 5, por ejemplo, con un halógeno o alcoxi C1-C6. En algunas modalidades, la uridina modificada es una pseudouridina modificada en la posición 1, por ejemplo, con alquilo C1-C6. La uridina modificada puede ser, por ejemplo, pseudouridina, N1-metil-pseudouridina, 5-metoxiuridina, 5-yodouridina o una combinación de estas. En algunas modalidades, la uridina modificada es 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es 5-yodouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es pseudouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es N1-metil-pseudouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y N1-metil-pseudouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y 5-metoxiuridina. En

algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de N1-metil pseudouridina y 5-metoxiuridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de 5-yodouridina y N1-metil-pseudouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de pseudouridina y 5-yodouridina. En algunas modalidades, la uridina modificada es una combinación de 5-yodoouridina y 5-metoxiuridina.

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

[098] Las modificaciones químicas, tales como las enumeradas anteriormente, pueden combinarse para proporcionar ARNg modificados que comprenden nucleósidos y nucleótidos (de forma colectiva “residuos”) que pueden tener dos, tres, cuatro o más modificaciones. Por ejemplo, un residuo modificado puede tener un azúcar modificado y una nucleobase modificada. En algunas modalidades, cada base de un ARNg está modificada, por ejemplo, todas las bases tienen un grupo fosfato modificado, tal como un grupo fosforotioato. En determinadas modalidades, todos o sustancialmente todos los grupos fosfato de

una molécula de ARNg se reemplazan con grupos fosforotioato. En algunas modalidades, los ARNg modificados comprenden al menos un residuo modificado en el extremo 5' del ARN o cerca de este. En algunas modalidades, los ARNg modificados comprenden al menos un residuo modificado en el extremo 3' del ARN o cerca de este.

5 **[0099]** En algunas modalidades, el ARNg puede comprender uno, dos, tres o más residuos modificados. En algunas modalidades, al menos 5 % (por ejemplo, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 %) de las posiciones en un ARNg modificado
10 son nucleósidos o nucleótidos modificados.

[0100] Los ácidos nucleicos no modificados son susceptibles a la degradación, por ejemplo, mediante nucleasas intracelulares o las que se encuentran en el suero. Por ejemplo, las nucleasas pueden hidrolizar uniones fosfodiéster de ácido nucleico. Por consiguiente, en un aspecto, los ARNg descritos en la presente pueden contener uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados, por ejemplo, para introducir
15 estabilidad a las nucleasas intracelulares o basadas en el suero. En algunas modalidades, las moléculas de ARNg modificado descritas en la presente pueden presentar 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, inclusive ácidos nucleicos de cadena simple, que implica la inducción de liberación y expresión de citocinas, particularmente los
20 interferones, y muerte celular.

[0101] En algunas modalidades de una modificación de estructura principal, el grupo fosfato de un residuo modificado puede modificarse mediante el reemplazo de uno o más de los oxígenos con un sustituyente diferente. Además, el residuo modificado, por ejemplo, residuo modificado presente en un ácido nucleico modificado, puede incluir el reemplazo en conjunto de un residuo de fosfato no modificado
25 con un grupo fosfato modificado, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, la modificación de la estructura principal de fosfato puede incluir alteraciones que den como resultado ya sea un en algunas modalidades no cargado o un enlazador cargado con una distribución de carga asimétrica.

[0102] Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen fosforotioato, fosforoselenatos, borano fosfatos, ésteres de borano fosfato, fosfonatos de hidrógeno, fosforamidatos, fosfonatos de arilo o alquilo
30 y fosfodiésteres. El átomo de fósforo en un grupo fosfato no modificado es quiral. Sin embargo, el

reemplazo de uno de los oxígenos que no forman puentes con uno de los átomos anteriores o grupos de átomos vuelven quiral el átomo de fósforo. El átomo de fósforo estereogénico puede poseer ya sea la configuración “R” (Rp en la presente) o la configuración “S” (Sp en la presente). La estructura principal también puede modificarse mediante el reemplazo de un oxígeno que forma puentes (es decir, el oxígeno que une el fosfato con el nucleósido) con nitrógeno (fosforamidatos puenteados), azufre (fosforotioatos puenteados) y carbono (metilénfosfonatos puenteados). El reemplazo se puede producir en cualquiera de los oxígenos de unión o en ambos oxígenos de unión.

[0103] El grupo fosfato puede reemplazarse mediante conectores que no contienen fósforo, en determinadas modificaciones de la estructura principal. En algunas modalidades, el grupo fosfato cargado puede reemplazarse por un resto neutro. Los ejemplos de restos que pueden reemplazar el grupo fosfato pueden incluir, de modo no taxativo, por ejemplo, fosfonato de metilo, hidroxilamino, siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, enlazador de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilénmetilimino, metilénhidrazo, metiléndimetilhidrazo y metilénoximetilimino.

Plantilla de ácido nucleico

[0104] Las composiciones y métodos descritos en la presente pueden incluir una plantilla de ácido nucleico. La plantilla se puede utilizar para alterar o insertar una secuencia de ácido nucleico en un sitio objetivo para una nucleasa Cas o cerca de este. En algunas modalidades, los métodos comprenden introducir una plantilla en la célula. En algunas modalidades, puede proporcionarse una única plantilla. En otras modalidades, pueden proporcionarse dos o más plantillas, de manera que pueda producirse la edición en dos o más sitios objetivo. Por ejemplo, pueden proporcionarse diferentes plantillas para editar un único gen en una célula, o dos genes diferentes en una célula.

[0105] En algunas modalidades, la plantilla puede utilizarse en recombinación homóloga. En algunas modalidades, la recombinación homóloga puede dar como resultado la integración de la secuencia de plantilla o una parte de la secuencia de plantilla en la molécula de ácido nucleico objetivo. En otras modalidades, la plantilla puede utilizarse en reparación dirigida por homología, que implica la invasión de la cadena de ADN en el sitio de escisión en el ácido nucleico. En algunas modalidades, la reparación dirigida por homología puede dar como resultado la inclusión de la secuencia de plantilla en la molécula de ácido nucleico objetivo editada. En otras modalidades adicionales, la plantilla puede utilizarse en la edición génica mediada por unión de extremos no homólogos. En algunas modalidades, la secuencia de plantilla no tiene similitud con la secuencia de ácido nucleico cerca del sitio de escisión. En algunas

modalidades, se incorpora la plantilla o una parte de la secuencia de plantilla. En algunas modalidades, la plantilla incluye secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) flanqueantes.

[0106] En algunas modalidades, la plantilla puede comprender un primer brazo de homología y un segundo brazo de homología (también llamado primera y segunda secuencia de nucleótidos) que son complementarios a las secuencias ubicadas en posición anterior y posterior al sitio de escisión, respectivamente. Cuando una plantilla contiene dos brazos de homología, cada brazo puede tener la misma longitud o diferente longitud, y la secuencia entre los brazos de homología puede ser sustancialmente similar o idéntica a la secuencia objetivo entre los brazos de homología, o puede no estar relacionada en lo absoluto. En algunas modalidades, el grado de complementariedad o porcentaje de identidad entre la primera secuencia de nucleótidos de la primer y la secuencia anterior al sitio de escisión, y entre la segunda secuencia de nucleótidos de la plantilla y la secuencia posterior al sitio de escisión, puede permitir la recombinación homóloga, tal como, por ejemplo, recombinación homóloga de alta fidelidad, entre la plantilla y la molécula de ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, el grado de complementariedad puede ser de alrededor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas modalidades, el grado de complementariedad puede ser de alrededor de 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas modalidades, el grado de complementariedad puede ser de al menos 98 %, 99 % o 100 %. En algunas modalidades, el grado de complementariedad puede ser del 100 %. En algunas modalidades, el porcentaje de identidad puede ser de alrededor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas modalidades, el porcentaje de identidad puede ser de alrededor de 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas modalidades, el porcentaje de identidad puede ser de al menos 98 %, 99 % o 100 %. En algunas modalidades, el porcentaje de identidad puede ser del 100 %.

[0107] En algunas modalidades, la secuencia de plantilla puede corresponder a, comprender o consistir en una secuencia endógena de una célula objetivo. De manera adicional o alternativa, también puede corresponder a, comprender o consistir en una secuencia exógena de una célula objetivo. Tal como se usa en la presente, el término “secuencia endógena” se refiere a una secuencia que es natural de la célula. La expresión “secuencia exógena” se refiere a una secuencia que no es natural de una célula, o una secuencia cuya ubicación natural en el genoma de la célula es en una ubicación diferente. En algunas modalidades, la secuencia endógena puede ser una secuencia genómica de la célula. En algunas modalidades, la secuencia endógena puede ser una secuencia cromosómica o extracromosómica. En algunas modalidades, la secuencia endógena puede ser una secuencia de plásmidos de la célula. En algunas modalidades, la

secuencia de plantilla puede ser sustancialmente idéntica a una parte de la secuencia endógena en una célula en el sitio de escisión o cerca de este, pero comprender al menos un cambio de nucleótidos. En algunas modalidades, la edición de la molécula de ácido nucleico objetivo escindida con la plantilla puede dar como resultado una mutación que comprende una inserción, delección o sustitución de uno o más nucleótidos de la molécula de ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, la mutación puede dar como resultado uno o más cambios de aminoácidos en una proteína expresada a partir de un gen que comprende la secuencia objetivo. En algunas modalidades, la mutación puede dar como resultado uno o más cambios de nucleótidos en un ARN expresado a partir del gen objetivo. En algunas modalidades, la mutación puede alterar el nivel de expresión del gen objetivo. En algunas modalidades, la mutación puede dar como resultado un aumento o disminución de la expresión del gen objetivo. En algunas modalidades, la mutación puede dar como resultado una atenuación genética. En algunas modalidades, la mutación puede dar como resultado una inactivación genética. En algunas modalidades, la mutación puede dar como resultado la restauración de una función genética. En algunas modalidades, la edición de la molécula de ácido nucleico objetivo escindida con la plantilla puede dar como resultado un cambio en una secuencia de exones, una secuencia de intrones, una secuencia reguladora, una secuencia de control de la transcripción, una secuencia de control de la traducción, un sitio de corte y empalme o una secuencia no codificante de la molécula de ácido nucleico objetivo, tal como ADN.

[0108] En otras modalidades, la secuencia de plantilla puede comprender una secuencia exógena. En algunas modalidades, la secuencia exógena puede comprender una secuencia codificante de ARN o proteína unida de manera operativa a una secuencia promotora exógena, de manera que, al integrar la secuencia exógena en la molécula de ácido nucleico objetivo, la célula es capaz de expresar la proteína o ARN codificado por la secuencia integrada. En otras modalidades, al integrar la secuencia exógena en la molécula de ácido nucleico objetivo, la expresión de la secuencia integrada puede regularse mediante una secuencia promotora exógena. En algunas modalidades, la secuencia exógena puede proporcionar una secuencia de ADNc que codifica una proteína o una parte de una proteína. En otras modalidades adicionales, la secuencia exógena puede comprender o consistir en una secuencia de exones, una secuencia de intrones, una secuencia reguladora, una secuencia de control de la transcripción, una secuencia de control de la traducción, un sitio de corte y empalme o una secuencia no codificante. En algunas modalidades, la integración de la secuencia exógena puede dar como resultado la restauración de una función genética. En algunas modalidades, la integración de la secuencia exógena puede dar como

resultado una inserción genética. En algunas modalidades, la integración de la secuencia exógena puede dar como resultado una inactivación genética.

[0109] La plantilla puede ser de cualquier longitud adecuada. En algunas modalidades, la plantilla puede comprender una longitud de 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000 o más nucleótidos. La plantilla puede ser un ácido nucleico de cadena simple. La plantilla puede ser un ácido nucleico parcialmente de cadena doble o de cadena doble. En determinadas modalidades, la plantilla de cadena simple tiene una longitud de 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 nucleótidos. En algunas modalidades, la plantilla puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una parte de la molécula de ácido nucleico objetivo que comprende la secuencia objetivo (es decir, un “brazo de homología”). En algunas modalidades, la plantilla puede comprender un brazo de homología que sea complementario a la secuencia ubicada en posición anterior o posterior al sitio de escisión en la molécula de ácido nucleico objetivo.

[0110] En algunas modalidades, la plantilla contiene ADNcs o ADNcd que contiene secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) flanqueantes. En algunas modalidades, la plantilla se proporciona como un vector, plásmido, minicírculo o nanocírculo o producto de PCR.

Purificación de ácidos nucleicos

[0111] En algunas modalidades, el ácido nucleico está purificado. En algunas modalidades, el ácido nucleico se purifica mediante el uso de un método de precipitación (por ejemplo, precipitación de LiCl, precipitación de alcohol o un método equivalente, por ejemplo, tal como se describe en la presente). En algunas modalidades, el ácido nucleico se purifica mediante el uso de un método a base de cromatografía, tal como método a base de HPLC o un método equivalente (por ejemplo, tal como se describe en la presente). En algunas modalidades, el ácido nucleico se purifica mediante el uso tanto de un método de precipitación (por ejemplo, precipitación de LiCl) como de un método de precipitación basado en HPLC.

Secuencias objetivo

[0112] En algunas modalidades, un sistema de CRISPR/Cas de la presente descripción puede dirigirse a una secuencia objetivo y escindirla en una molécula de ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, la secuencia objetivo puede ser reconocida o ser escindida por la nucleasa Cas. En determinadas modalidades, una secuencia objetivo para una nucleasa Cas se ubica cerca de la secuencia de PAM cognado de nucleasa. En algunas modalidades, una nucleasa Cas de Clase 2 puede ser dirigida por un ARNg hacia una secuencia objetivo de una molécula de ácido nucleico objetivo, donde el ARNg se hibrida con la secuencia objetivo y esta última se escinde mediante la proteína Cas clase 2. En algunas modalidades, el ARN guía se hibrida

con la secuencia y esta se escinde mediante la nucleasa Cas clase 2, donde la secuencia objetivo es adyacente a o comprende un PAM cognado. En algunas modalidades, la secuencia objetivo puede ser complementaria a la secuencia objetivo del ARN guía. En algunas modalidades, el grado de complementariedad entre una secuencia objetivo de un ARN guía y la parte de la secuencia objetivo correspondiente que se hibrida con el ARN guía puede ser de alrededor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas modalidades, el porcentaje de identidad entre una secuencia objetivo de un ARN guía y la parte de la secuencia objetivo correspondiente que se hibrida con el ARN guía puede ser de alrededor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas modalidades, la región de homología del objetivo es adyacente a una secuencia de PAM cognado. En algunas modalidades, la secuencia objetivo puede comprender una secuencia 100 % complementaria a la secuencia objetivo del ARN guía. En otras modalidades, la secuencia objetivo puede comprender al menos un mal apareamiento, delección o inserción en comparación con la secuencia objetivo del ARN guía.

[0113] La longitud de la secuencia objetivo puede depender del sistema de nucleasa utilizado. Por ejemplo, la secuencia de direccionamiento del ARN guía para un sistema de CRISPR/Cas puede comprender una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más de 50 nucleótidos y la secuencia objetivo correspondiente tiene una longitud correspondiente, objetivo adyacente a una secuencia de PAM. En algunas modalidades, la secuencia objetivo puede comprender una longitud de 15-24 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia objetivo puede comprender una longitud de 17-21 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia objetivo puede comprender una longitud de 20 nucleótidos. Cuando se utilizan nickasas, la secuencia objetivo puede comprender un par de secuencias objetivo reconocidas por un par de nickasas que escinden cadenas opuestas de la molécula de ADN. En algunas modalidades, la secuencia objetivo puede comprender un par de secuencias objetivo reconocidas por un par de nickasas que escinden las mismas cadenas de la molécula de ADN. En algunas modalidades, la secuencia objetivo puede comprender una parte de las secuencias objetivo reconocidas por una o más nucleasas Cas.

[0114] La molécula de ácido nucleico objetivo puede ser una molécula de ADN o ARN que sea endógena o exógena respecto a la célula. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico objetivo puede ser un ADN episomal, un plásmido, un ADN genómico, genoma viral, ADN mitocondrial o un ADN cromosómico de una célula o en la célula. En algunas modalidades, la secuencia objetivo de la

molécula de ácido nucleico puede ser una secuencia genómica de una célula o en una célula, que incluye una célula humana.

[0115] En modalidades adicionales, la secuencia objetivo puede ser una secuencia viral. En modalidades adicionales, la secuencia objetivo puede ser una secuencia patógena. En otras modalidades adicionales, la secuencia objetivo puede ser una secuencia sintetizada. En modalidades adicionales, la secuencia objetivo puede ser una secuencia cromosómica. En determinadas modalidades, la secuencia objetivo puede comprender una unión de translocación, por ejemplo, translocación asociada con un cáncer. En algunas modalidades, la secuencia objetivo puede ser un cromosoma eucariota, tal como un cromosoma humano. En determinadas modalidades, la secuencia objetivo es una secuencia específica hepática, dado que se expresa en células hepáticas.

[0116] En algunas modalidades, la secuencia objetivo puede ubicarse en una secuencia codificante de un gen, una secuencia de intrones de un gen, una secuencia reguladora, una secuencia de control de la transcripción de un gen, una secuencia de control de la traducción de un gen, un sitio de corte y empalme o una secuencia no codificante entre genes. En algunas modalidades, el gen puede ser un gen que codifica proteínas. En algunas modalidades, el gen puede ser un gen no codificante de ARN. En algunas modalidades, la secuencia objetivo puede comprender la totalidad o una parte de un gen asociado con una enfermedad. En algunas modalidades, la secuencia objetivo puede estar ubicada en un sitio funcional no génico en el genoma, por ejemplo, un sitio que controla aspectos de la organización de cromatina, tal como un sitio de estructura o una región de control de locus.

[0117] En modalidades que implican una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas de Clase 2, la secuencia objetivo puede ser adyacente a un motivo adyacente protoespaciador (PAM). En algunas modalidades, el PAM puede ser adyacente al extremo 3' de la secuencia objetivo o estar a 1, 2, 3 o 4 nucleótidos de este. La longitud de la secuencia del PAM puede depender de la proteína Cas utilizada. Por ejemplo, el PAM se puede seleccionar a partir de una secuencia de un PAM en particular o un consenso para una proteína Cas9 u ortólogo de Cas9 específicos, inclusive los que se divulgan en la Figura 1 de Ran et ál., *Nature*, 520: 186-191 (2015), y la Figura S5 de Zetsche 2015, donde la parte relevante de la descripción de cada una se incorpora a la presente mediante esta referencia. En algunas modalidades, el PAM puede tener una longitud de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. En ejemplos no taxativos, la secuencia PAM incluye NGG, NGGNG, NG, NAAAAN, NAAAAAW, NNNNACA, GNNNCNNA, TTN y NNNNGATT (donde N se define como cualquier nucleótido, y W se define como A o T). En algunas modalidades, la secuencia de PAM puede ser NGG. En algunas modalidades, la secuencia de

PAM puede ser NGGNG. En algunas modalidades, la secuencia de PAM puede ser TTN. En algunas modalidades, la secuencia de PAM puede ser NNAAAAW.

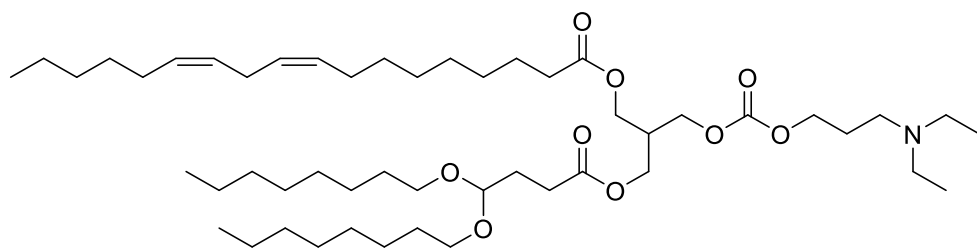
Formulaciones lipídicas

[0118] En la presente se describen diversas modalidades de formulaciones de LNP para ARN, lo que incluye cargas de CRISPR/Cas. Tales formulaciones de LNP incluyen un “lípidio de amina”, junto con un lípidio auxiliar, un lípidio neutro y un lípidio de PEG. En algunas modalidades, tales formulaciones de LNP incluyen un “lípidio de amina”, junto con un lípidio auxiliar y un lípidio de PEG. En algunas modalidades, las formulaciones de LNP incluyen menos que 1 por ciento de fosfolípidio neutro. En algunas modalidades, las formulaciones de LNP incluyen menos que 0,5 por ciento de fosfolípidio neutro. “Nanopartícula lipídica” significa una partícula que comprende una pluralidad de moléculas lipídicas (es decir, más de una) asociadas físicamente entre sí mediante fuerzas intermoleculares.

Lípidos de amina

[0119] Las composiciones de LNP para la administración de agentes biológicamente activos comprenden un “lípidio de amina”, que se define como lípidio A o sus equivalentes, que incluyen análogos de acetal del lípidio A.

[0120] En algunas modalidades, el lípidio de amina es el Lípidio A, el cual es octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo, también llamado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo. El Lípidio A se puede representar de la siguiente manera:



[0121] El Lípidio A se puede sintetizar de acuerdo con WO2015/095340 (por ejemplo, pp. 84-86). En determinadas modalidades, el lípidio de amina es un equivalente al lípidio A.

[0122] En determinadas modalidades, un lípidio de amina es un análogo del lípidio A. En determinadas modalidades, un análogo del lípidio A es un análogo de acetal del lípidio A. En composiciones de LNP particulares, el acetato de acetal es un análogo de acetal C4-C12. En algunas modalidades, el acetato de acetal es un análogo de acetal C5-C12. En modalidades adicionales, el acetato de acetal es un análogo de

acetal C5-C10. En modalidades adicionales, el análogo de acetal se elige de un análogo de acetal C4, C5, C6, C7, C9, C10, C11 y C12.

[0123] Los lípidos de amina adecuados para su uso en las LNP descritas en la presente son biodegradables *in vivo* y adecuados para administrar un agente biológicamente activo, tal como un ARN, a una célula. Los lípidos de amina tienen toxicidad baja (por ejemplo, son tolerados en un modelo animal sin efectos adversos en cantidades mayores o iguales que 10 mg/kg de carga de ARN). En determinadas modalidades, las LNP que comprenden un lípido de amina incluyen las que al menos 75 % del lípido de amina se elimina del plasma en 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7 o 10 días. En determinadas modalidades, las LNP que comprenden un lípido de amina incluyen las que al menos 50 % del ARNm o ARNg se elimina del plasma en 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7 o 10 días. En determinadas modalidades, las LNP que comprenden un lípido de amina incluyen las que al menos 50 % de las LNP se elimina del plasma en 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7 o 10 días, por ejemplo, al medir un componente lipídico (por ejemplo, lípido de amina), ARN (por ejemplo, ARNm) u otro componente. En determinadas modalidades, se mide la proporción de componente de proteína, ARN o ácido nucleico libre de las LNP en relación con estos encapsulados en lípidos.

[0124] La eliminación de lípidos puede medirse de la forma descrita en la bibliografía. Véase Maier, M.A., et ál. Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. *Mol. Ther.* 2013, 21(8), 1570-78 (“Maier”). Por ejemplo, en Maier, se administraron sistemas de LNP de ARNip que contenían ARNip dirigido a luciferasa a ratones C57Bl/6 macho de seis a ocho semanas de edad por medio de inyección intravenosa por bolo de 0,3 mg/kg en la vena lateral de la cola. Se recogieron muestras de sangre, hígado y bazo se recogieron 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 y 168 horas después de la dosis. Se perfundieron los ratones con solución salina antes de recoger el tejido y las muestras de sangre se procesaron para obtener plasma. Todas las muestras se procesaron y analizaron mediante LC-MS. Además, Maier describe un procedimiento para evaluar la toxicidad después de la administración de formulaciones de LNP de ARNip. Por ejemplo, un ARNip dirigido a luciferasa se administró a 0, 1, 3, 5 y 10 mg/kg (5 animales/grupo) por medio de una única inyección intravenosa en bolo con un volumen de dosis de 5 mL/kg a ratas Sprague-Dawley macho. Después de 24 horas, alrededor de 1 mL de sangre se obtuvo de la vena yugular de animales conscientes y se aisló el suero. 72 horas después de la dosis, todos los animales se sacrificaron para realizar la necropsia. Se realizaron evaluaciones de los signos clínicos, peso corporal, química del suero, pesos de los órganos e histopatología. Aunque Maier describe métodos para evaluar las formulaciones de LNP de

ARNip, estos métodos pueden aplicarse para evaluar la eliminación, farmacocinética y toxicidad de la administración de composiciones de LNP de la presente descripción.

[0125] Los lípidos de amina pueden conducir a un aumento de la tasa de eliminación. En algunas modalidades, la tasa de eliminación es una tasa de eliminación de lípidos, por ejemplo, la tasa a la cual se elimina un lípido de la sangre, el suero o el plasma. En algunas modalidades, la tasa de eliminación es una tasa de eliminación de ARN, por ejemplo, la tasa a la cual se elimina un ARNm o un ARNg de la sangre, el suero o el plasma. En algunas modalidades, la tasa de eliminación es la tasa a la cual se elimina una LNP de la sangre, el suero o el plasma. En algunas modalidades, la tasa de eliminación es la tasa a la cual se elimina una LNP de un tejido, tal como tejido hepático o tejido del bazo. En determinadas modalidades, una tasa elevada de eliminación lleva a un perfil de seguridad sin mayores efectos adversos. Los lípidos de amina pueden reducir la acumulación de LNP en la circulación y en tejidos. En algunas modalidades, una reducción en la acumulación de LNP en la circulación y los tejidos lleva a un perfil de seguridad sin mayores efectos adversos.

[0126] Los lípidos de amina de la presente descripción son ionizables (por ejemplo, pueden formar una sal) dependiendo del pH del medio en el que están. Por ejemplo, en un medio ligeramente ácido, los lípidos de amina pueden protonarse y, por lo tanto, poseer una carga positiva. Por el contrario, en un medio ligeramente básico, tal como, por ejemplo, sangre donde el pH es de aproximadamente 7,35, los lípidos de amina pueden no protonarse y, por lo tanto, no tener carga. En algunas modalidades, los lípidos de amina de la presente descripción pueden protonarse en un pH de al menos alrededor de 9. En algunas modalidades, los lípidos de amina de la presente descripción pueden protonarse en un pH de al menos alrededor de 9. En algunas modalidades, los lípidos de amina de la presente descripción pueden protonarse en un pH de al menos alrededor de 10.

[0127] El pH al cual un lípido de amina se encuentra predominantemente protonado se relaciona con su pKa intrínseca. En algunas modalidades, los lípidos de amina de la presente descripción pueden tener independientemente una pKa en el independientemente de alrededor de 5,1 a alrededor de 7,4. En algunas modalidades, los lípidos de amina de la presente descripción pueden tener independientemente una pKa en el independientemente de alrededor de 5,5 a alrededor de 6,6. En algunas modalidades, los lípidos de amina de la presente descripción pueden tener independientemente una pKa en el independientemente de alrededor de 5,6 a alrededor de 6,4. En algunas modalidades, los lípidos de amina de la presente descripción pueden tener independientemente una pKa en el independientemente de alrededor de 5,8 a alrededor de 6,2. Por ejemplo, cada uno de los lípidos de amina de la presente descripción puede tener

independientemente una pKa en el independiente de alrededor de 5,8 a alrededor de 6,5. La pKa de un lípido de amina puede ser una consideración importante en la formulación de las LNP, dado que se halló que los lípidos catiónicos con una pKa que oscila de alrededor de 5,1 a alrededor de 7,4 son eficaces para administrar la carga in vivo, por ejemplo, al hígado. Además, se descubrió que los lípidos catiónicos con pKa en el intervalo de 5,3 a alrededor de 6,4 son eficaces para la administración in vivo, por ejemplo, a tumores. Véase, por ejemplo, WO 2014/136086.

Lípidos adicionales

[0128] Los “lípidos naturales” adecuados para su uso en una composición lipídica de la descripción incluyen, por ejemplo, una variedad de lípidos neutros, sin carga o zwitteriónicos. Los ejemplos de fosfolípidos neutros adecuados para su uso en la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, 5-heptadecilbencen-1,3-diol (resorcinol), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfocolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), fosfatidilcolina (PLPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), dilauriloilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 1-miristoil-2-palmitoil fosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitoil-2-miristoil fosfatidilcolina (PMPC), 1-palmitoil-2-estearoil fosfatidilcolina (PSPC), 1,2-diaracidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DBPC), 1-estearoil-2-palmitoil fosfatidilcolina (SPPC), 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC), palmitoiloleoil fosfatidilcolina (POPC), lisofosfatidil colina, dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), dilinoleoilfosfatidilcolina diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), palmitoiloleoil fosfatidiletanolamina (POPE), lisofosfatidiletanolamina y combinaciones de estas. En una modalidad, el fosfolípido neuro puede seleccionarse del grupo que consiste en diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) y dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPE). En otra modalidad, el fosfolípido neutro puede ser diestearoilfosfatidilcolina (DSPC). En otra modalidad, el fosfolípido neutro puede ser dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

[0129] Los “lípidos auxiliares” incluyen esteroides, esteroleos y resorcinoleos de alquilo. Los lípidos auxiliares adecuados para su uso en la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, colesterol, 5-heptadecilresorcinol y hemisuccinato de colesterol. En una modalidad, el lípido auxiliar puede ser colesterol. En una modalidad, el lípido auxiliar puede ser hemisuccinato de colesterol.

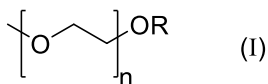
[0130] Los lípidos de PEG son lípidos que alteran la duración temporal en la que pueden existir *in vivo* las nanopartículas (por ejemplo, en la sangre). Los lípidos de PEG pueden asistir en el proceso de formulación, por ejemplo, al reducir la agregación de partículas y controlar el tamaño de partícula. Los

lípidos de PEG utilizados en la presente pueden modular las propiedades farmacocinéticas de las LNP. Típicamente, el lípido de PEG comprende un resto lipídico y un resto de polímero a base de PEG.

[0131] En algunas modalidades, el resto lipídico puede derivar de un diacilglicerol o diacilglicamida, inclusive los que comprenden un grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida que tenga una longitud de cadena de alquilo que comprende independientemente de alquilo C4 a alrededor de C40 átomos de carbono saturados o no saturados, donde la cadena puede comprender cualquier grupo funcional, tal como, por ejemplo, una amida o éster. En algunas modalidades, la cadena de alquilo comprende aproximadamente de C10 a C20. El grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida puede comprender además uno o más grupos alquilo sustituidos. Las longitudes de cadena pueden ser simétricas o asimétricas.

[0132] A menos que se indique lo contrario, el término “PEG”, tal como se usa en la presente, significa cualquier polietilenglicol u otro polímero de éter de polialquileno. En una modalidad, el resto de PEG es un polímero de etilenglicol u óxido de etileno lineal o ramificado opcionalmente sustituido. En determinadas modalidades, el resto de PEG puede estar sustituido, por ejemplo, por uno o más grupos alquilo, alcoxi, acilo, hidroxilo o arilo. En una modalidad, el resto de PEG incluye copolímeros de PEG, tales como PEG-poliuretano o PEG-polipropileno (véase, por ejemplo, J. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992)); de manera alternativa, el resto de PEG no incluye copolímeros de PEG, por ejemplo, puede ser un monopolímero de PEG. En una mod, el PEG tiene un peso molecular de alrededor de 130 a alrededor de 50 000, en una submodalidad, de alrededor de 150 a alrededor de 30.000, en una submodalidad, de alrededor de 150 a alrededor de 20 000, en una submodalidad de alrededor de 150 a alrededor de 15 000, en una submodalidad, de alrededor de 150 a alrededor de 10 000, en una submodalidad, de alrededor de 150 a alrededor de 6000, en una submodalidad, de alrededor de 150 a alrededor de 5000, en una submodalidad, de alrededor de 150 a alrededor de 4000, en una submodalidad, de alrededor de 150 a alrededor de 3000, en una submodalidad, de alrededor de 300 a alrededor de 3000, en una submodalidad, de alrededor de 1000 a alrededor de 3000, y en una submodalidad, de alrededor de 1500 a alrededor de 2500.

[0133] En determinadas modalidades, el PEG (por ejemplo, conjugado con un resto lipídico o lípido, tal como un lípido de ocultación) es un “PEG-2K”, también llamado “PEG 2000”, que tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2000 Dalton. PEG-2K se representa en la presente mediante la fórmula (I), donde n es 45, lo cual significa que el grado promedio de polimerización comprende alrededor



de 45 subunidades. Sin embargo, pueden utilizarse otras modalidades de PEG

conocidas en la técnica, inclusive, por ejemplo, aquellas donde el grado promedio de polimerización comprende alrededor de 23 subunidades ($n=23$) y/o 68 subunidades ($n=68$). En algunas modalidades, n puede oscilar entre alrededor de 30 y alrededor de 60. En algunas modalidades, n puede oscilar entre alrededor de 35 y alrededor de 55. En algunas modalidades, n puede oscilar entre alrededor de 40 y alrededor de 50. En algunas modalidades, n puede oscilar entre alrededor de 42 y alrededor de 48. En algunas modalidades, n puede ser 45. En algunas modalidades, R puede seleccionarse de H , alquilo sustituido y alquilo no sustituido. En algunas modalidades, R puede ser alquilo no sustituido. En algunas modalidades, R puede ser metilo.

[0134] En cualquiera de las modalidades descritas en la presente, el lípido de PEG se puede seleccionar de PEG-dilauroilglicerol, PEG-dimiristoilglicerol (PEG-DMG) (n° de catálogo GM-020 de NOF, Tokio, Japón), PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-distearoilglicerol (PEG-DSPE) (n° de catálogo DSPE-020CN, NOF, Tokio, Japón), PEG-dilaurylglicamida, PEG-dimiristilglicamida, PEG-dipalmitoilglicamida, and PEG-distearoilglicamida, PEG-colesterol (1-[8'-(Colest-5-en-3[beta]-oxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil-[omega]-metil-poli(etilenglicol)), PEG-DMB (éter de 3,4-ditetradecoxilbenzil-[omega]-metil-poli(etileno glicol)), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamine-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DMG) (n° de catálogo 880150P de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EUA), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DSPE) (n° de catálogo 880120C de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EUA), 1,2-distearoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol (PEG2k-DSG; GS-020, NOF Tokio, Japón), poli(etilenglicol)-2000-dimetacrilato (PEG2k-DMA) y 1,2-disteariloxipropil-3-amina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DSA). En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-DMG. En algunas modalidades, el lípido de PEG puede ser PEG2k-DSG. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-DSPE. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-DMA. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C-DMA. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser el compuesto S027, descrito en los párrafos [00240] a [00244] de WO2016/010840. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-DSA. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C11. En algunas modalidades, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C14. En algunas modalidades, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C16. En algunas modalidades, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C18.

Formulaciones de LNP

[0135] Modalidades de la presente descripción proporcionan composiciones lipídicas descritas de acuerdo con las relaciones molares respectivas de los componentes lipídicos en la formulación. En una

modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de alrededor de 30 % molar a alrededor de 60 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de alrededor de 40 % molar a alrededor de 60 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de alrededor de 45 % molar a alrededor de 60 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de alrededor de 50 % molar a alrededor de 60 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de alrededor de 55 % molar a alrededor de 60 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de alrededor de 50 % molar a alrededor de 55 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de alrededor de 50 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido de amina puede ser de alrededor de 55 % molar. En algunas modalidades, el % molar del lípido de amina del lote de LNP será de $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ o $\pm 2,5\%$ del % molar objetivo. En algunas modalidades, el % molar del lípido de amina del lote de LNP será de $\pm 4\%$ molar, $\pm 3\%$ molar, $\pm 2\%$ molar, $\pm 1,5\%$ molar, $\pm 1\%$ molar, $\pm 0,5\%$ molar o $\pm 0,25\%$ molar del % molar objetivo. Todas las cantidades de % molar se proporcionan como una fracción del componente lipídico de las composiciones de LNP. En determinadas modalidades, la variabilidad entre lotes de LNP del % molar del lípido de amina será menor que 15 %, menor que 10 % o menor que 5 %.

[0136] En una modalidad, el % molar del lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro, puede ser de alrededor de 5 % molar a alrededor de 15 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro, puede ser de alrededor de 7 % molar a alrededor de 12 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro, puede ser de alrededor de 0 % molar a alrededor de 5 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro, puede ser de alrededor de 0 % molar a alrededor de 10 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro, puede ser de alrededor de 5 % molar a alrededor de 10 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro, puede ser de alrededor de 8 % molar a alrededor de 10 % molar.

[0137] En una modalidad, el % molar del lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro, puede ser de alrededor de 5 % molar, alrededor de 6 % molar, alrededor de 7 % molar, alrededor de 8 % molar, alrededor de 9 % molar, alrededor de 10 % molar, alrededor de 11 % molar, alrededor de 12 % molar, alrededor de 13 % molar, alrededor de 14 % molar o alrededor de 15 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro, puede ser de alrededor de 9 % molar.

[0138] En una modalidad, el % molar del lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro, puede ser de alrededor de 1 % molar a alrededor de 5 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro puede

ser de alrededor de 0,1 % molar a alrededor de 1 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro, tal como un fosfolípido neutro, puede ser de alrededor de 0,1 % molar, alrededor de 0,2 % molar, alrededor de 0,5 % molar, 1 % molar, alrededor de 1,5 % molar, alrededor de 2 % molar, alrededor de 2,5 % molar, alrededor de 3 % molar, alrededor de 3,5 % molar, alrededor de 4 % molar, alrededor de 4,5 % molar o
5 alrededor de 5 % molar.

[0139] En una modalidad, el % molar del lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro, puede ser menor que alrededor de 1 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro, puede ser menor que alrededor de 0,5 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro, puede ser de alrededor de 0 % molar, alrededor de 0,1 %
10 molar, alrededor de 0,2 % molar, alrededor de 0,3 % molar, alrededor de 0,4 % molar, alrededor de 0,5 % molar, alrededor de 0,6 % molar, alrededor de 0,7 % molar, alrededor de 0,8 % molar, alrededor de 0,9 % molar o alrededor de 1 % molar. En algunas modalidades, las formulaciones descritas en la presente están libres de lípido neutro (es decir, 0 % molar de lípido neutro). En algunas modalidades, las formulaciones descritas en la presente están esencialmente libres de lípido neutro (es decir, alrededor de 0 % molar de
15 lípido neutro). En algunas modalidades, las formulaciones descritas en la presente están libres de fosfolípido neutro (es decir, 0 % molar de fosfolípido neutro). En algunas modalidades, las formulaciones descritas en la presente están esencialmente libres de fosfolípido neutro (es decir, alrededor de 0 % molar de fosfolípido neutro).

[0140] En algunas modalidades, el % molar del lípido neutro del lote de LNP será de ± 30 %, ± 25 %, ± 20 %, ± 15 %, ± 10 %, ± 5 % o $\pm 2,5$ % del % molar objetivo del lípido neutro. En determinadas modalidades, la variabilidad entre lotes de LNP será menor que 15 %, menor que 10 % o menor que 5 %.

[0141] En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar puede ser de alrededor de 20 % molar a alrededor de 60 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar puede ser de alrededor de 25 % molar a alrededor de 55 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar puede ser de alrededor de 25 % molar a alrededor de 50 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar puede ser de alrededor de 25 % molar a alrededor de 40 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar puede ser de alrededor de 30 % molar a alrededor de 50 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar puede ser de alrededor de 30 % molar a alrededor de 40 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar se ajusta basado en las concentraciones del lípido de amina, lípido neutro y lípido de
25 PEG para llevar el componente lipídico al 100 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar se ajusta basado en las concentraciones del lípido de amina y lípido de PEG para llevar el componente
30

lipídico al 100 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido auxiliar se ajusta basado en las concentraciones del lípido de amina y lípido de PEG para llevar el componente lipídico a al menos 99 % molar. En algunas modalidades, el % molar del lípido auxiliar del lote de LNP será de $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ o $\pm 2,5\%$ del % molar objetivo. En determinadas modalidades, la variabilidad entre lotes de LNP será menor que 15 %, menor que 10 % o menor que 5 %.

[0142] En una modalidad, el % molar del lípido PEG puede ser de alrededor de 1 % molar a alrededor de 10 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido PEG puede ser de alrededor de 2 % molar a alrededor de 10 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido PEG puede ser de alrededor de 2 % molar a alrededor de 8 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido PEG puede ser de alrededor de 2 % molar a alrededor de 4 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido PEG puede ser de alrededor de 2,5 % molar a alrededor de 4 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido PEG puede ser de alrededor de 3 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido PEG puede ser de alrededor de 2,5 % molar. En algunas modalidades, el % molar del lípido de PEG del lote de LNP será de $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ o $\pm 2,5\%$ del % molar objetivo del lípido de PEG. En determinadas modalidades, la variabilidad entre lotes de LNP será menor que 15 %, menor que 10 % o menor que 5 %.

[0143] En determinadas modalidades, la carga incluye un ARNm que codifica un agente de unión a ADN guiada por ARN (por ejemplo, una nucleasa Cas, una nucleasa Cas clase 2 o Cas9) y un ARNg o un ácido nucleico que codifica un ARNg, o una combinación de ARNm y ARNg. En una modalidad, la composición de LNP puede comprender un lípido A o sus equivalentes. En algunos aspectos, el lípido de amina es el lípido A. En algunos aspectos, el lípido de amina es un equivalente de lípido A, por ejemplo, un análogo de lípido A. En determinados aspectos, el lípido de amina es un análogo de acetal del lípido A. En diversas modalidades, una composición de LNP comprende un lípido de amina, un lípido neutro, un lípido auxiliar y un lípido de PEG. En determinadas modalidades, el lípido auxiliar es colesterol. En determinadas modalidades, el lípido neutro es DSPC. En modalidades específicas, el lípido de PEG es PEG2k-DMG. En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un lípido A, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En algunas modalidades, una composición de LNP comprende un lípido de amina, DSPC, colesterol y un lípido de PEG. En algunas modalidades, la composición de LNP comprende un lípido de PEG que comprende DMG. En determinadas modalidades, el lípido de amina se selecciona del lípido A y un equivalente del lípido A, que incluye un análogo de acetal del lípido A. En modalidades adicionales, una composición de LNP comprende un lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG.

[0144] En diversas modalidades, una composición de LNP comprende un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En diversas modalidades, una composición de LNP comprende un lípido de amina, un lípido auxiliar, un fosfolípido neutro y un lípido de PEG. En diversas modalidades, una composición de LNP comprende un componente lipídico que consiste en un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En diversas modalidades, una composición de LNP comprende un lípido de amina, un lípido auxiliar y un lípido de PEG. En determinadas modalidades, una composición de LNP no comprende un lípido neutro, tal como un fosfolípido neutro. En diversas modalidades, una composición de LNP comprende un componente lipídico que consiste en un lípido de amina, un lípido auxiliar y un lípido de PEG. En determinadas modalidades, el lípido neutro se selecciona de uno o más de DSPC, DPPC, DAPC, DMPC, DOPC, DOPE y DSPE. En determinadas modalidades, el lípido neutro es DSPC. En determinadas modalidades, el lípido neutro es DPPC. En determinadas modalidades, el lípido neutro es DAPC. En determinadas modalidades, el lípido neutro es DMPC. En determinadas modalidades, el lípido neutro es DOPC. En determinadas modalidades, el lípido neutro es DOPE. En determinadas modalidades, el lípido neutro es DSPE. En determinadas modalidades, el lípido auxiliar es colesterol. En modalidades específicas, el lípido de PEG es PEG2k-DMG. En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un lípido A, un lípido auxiliar y un lípido de PEG. En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un componente lipídico que consiste en el un lípido A, un lípido auxiliar y un lípido de PEG. En algunas modalidades, una composición de LNP comprende un lípido de amina, colesterol y un lípido de PEG. En algunas modalidades, una composición de LNP comprende un componente lipídico que consiste en un lípido de amina, colesterol y un lípido de PEG. En algunas modalidades, la composición de LNP comprende un lípido de PEG que comprende DMG. En determinadas modalidades, el lípido de amina se selecciona del lípido A y un equivalente del lípido A, que incluye un análogo de acetal del lípido A. En determinadas modalidades, el lípido de amina es un análogo de acetal C5-C12 o C4-C12 del lípido A. En modalidades adicionales, una composición de LNP comprende un lípido A, colesterol y PEG2k-DMG.

[0145] Modalidades de la presente descripción también proporcionan composiciones lipídicas descritas de acuerdo con la relación molar entre los grupos amino con carga positiva del lípido de amina (N) y los grupos fosfato con carga negativa (P) del ácido nucleico que será encapsulado. Esto se representa matemáticamente mediante la ecuación N/P. En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un componente lipídico que comprende un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG; y un componente de ácido nucleico, donde la relación entre N/P es de alrededor de 3

a 10. En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un componente lipídico que comprende un lípido de amina, un lípido auxiliar y un lípido de PEG; y un componente de ácido nucleico, donde la relación entre N/P es de alrededor de 3 a 10. En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un componente lipídico que comprende un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de auxiliar; y un componente de ARN, donde la relación entre N/P es de alrededor de 3 a 10. En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un componente lipídico que comprende un lípido de amina, un lípido auxiliar y un lípido de PEG; y un componente de ARN, donde la relación entre N/P es de alrededor de 3 a 10. En una modalidad, la relación entre N/P puede ser de alrededor de 5 a 7. En una modalidad, la relación entre N/P puede ser de alrededor de 3 a 7. En una modalidad, la relación entre N/P puede ser de alrededor de 4,5 a 8. En una modalidad, la relación entre N/P puede ser de alrededor de 6. En una modalidad, la relación entre N/P puede ser de 6 ± 1 . En una modalidad, la relación entre N/P puede ser de $6 \pm 0,5$. En algunas modalidades, la relación entre N/P será de $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ o $\pm 2,5\%$ de la relación entre N/P objetivo. En determinadas modalidades, la variabilidad entre lotes de LNP será menor que 15% , menor que 10% o menor que 5% .

15 **[0146]** En algunas modalidades, el componente de ácido nucleico, por ejemplo, un componente de ARN, puede comprender un ARNm, tal como un ARNm que codifica una nucleasa Cas. Un componente de ARN incluye ARN, opcionalmente con ácido nucleico y/o proteína adicionales, por ejemplo, carga RNP. En una modalidad, el ARN comprende un ARNm de Cas9. En algunas composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas, la LNP comprende, además, un ácido nucleico de ARNg, tal como un ARNg. En algunas modalidades, el componente de ARN comprende un ARNm de nucleasa Cas y un ARNg. En algunas modalidades, el componente de ARN comprende un ARNm de nucleasa Cas clase 2 y un ARNg.

20 **[0147]** En determinadas modalidades, una composición de LNP puede comprender un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas clase 2, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En determinadas modalidades, una composición de LNP puede comprender un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas clase 2, un lípido de amina, un lípido auxiliar y un lípido de PEG. En determinadas composiciones de LNP que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas clase 2, el lípido auxiliar es colesterol. En otras composiciones de LNP que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas clase 2, el lípido neutro es DSPC. En modalidades adicionales que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas clase 2, el lípido de PEG es PEG2k-DMG o

25

30

PEG2k-C11. En composiciones específicas que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas clase 2, el lípido de amina se selecciona del lípido A y sus equivalentes, tal como un análogo de acetal de lípido A.

[0148] En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un ARNg. En determinadas modalidades, una composición de LNP puede comprender un lípido de amina, un ARNg, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En determinadas modalidades, una composición de LNP puede comprender un lípido de amina, un ARNg, un lípido auxiliar y un lípido de PEG. En determinadas composiciones de LNP que comprenden un ARNg, el lípido auxiliar es colesterol. En algunas composiciones que comprenden un ARNg, el lípido neutro es DSPC. En modalidades adicionales que comprenden un ARNg, el lípido de PEG es PEG2k-DMG o PEG2k-C11. En determinadas modalidades, el lípido de amina se selecciona del lípido A y sus equivalentes, tal como un análogo de acetal del lípido A.

[0149] En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un ARNgs. En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un ARNgs de Cas9. En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un ARNgs de Cpf1. En algunas composiciones que comprenden un ARNgs, la LNP incluye un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neuro y un lípido de PEG. En algunas composiciones que comprenden un ARNgs, la LNP incluye un lípido de amina, un lípido auxiliar y un lípido de PEG. En determinadas composiciones que comprenden un ARNgs, el lípido auxiliar es colesterol. En otras composiciones que comprenden un ARNgs, el lípido neutro es DSPC. En modalidades adicionales que comprenden un ARNgs, el lípido de PEG es PEG2k-DMG o PEG2k-C11. En determinadas modalidades, el lípido de amina se selecciona del lípido A y sus equivalentes, tales como análogos de acetal del lípido A.

[0150] En determinadas modalidades, una composición de LNP composición un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg, que puede ser un ARNgs. En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un lípido de amina, un ARNm que codifica una nucleasa Cas, un ARNg, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un componente lipídico que consiste en un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG; y un componente de ácido nucleico que consiste en un ARNm que codifica una nucleasa Cas, y un ARNg. En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un componente lipídico que consiste en un lípido de amina, un lípido auxiliar y un lípido de PEG; y un componente de ácido nucleico que consiste en un ARNm que codifica una nucleasa Cas, y un ARNg. En determinadas

composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg, el lípido auxiliar es colesterol. En algunas composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg, el lípido neutro es DSPC. Determinadas composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg comprenden menos que alrededor de 1 % molar de lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro. Determinadas composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg comprenden menos que alrededor de 0,5 % molar de lípido neutro, por ejemplo, fosfolípido neutro. En determinadas composiciones, la LNP no comprende un lípido neutro, por ejemplo, un fosfolípido neutro. En modalidades adicionales que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg, el lípido de PEG es PEG2k-DMG o PEG2k-C11. En determinadas modalidades, el lípido de amina se selecciona del lípido A y sus equivalentes, tales como análogos de acetal del lípido A.

[0151] En determinadas modalidades, las composiciones de LNP incluyen un ARNm de nucleasa Cas, tal como un ARNm de Cas clase 2 y al menos un ARNg. En determinadas modalidades, la composición de LNP incluye una relación de ARNg con respecto a ARNm de nucleasa Cas, tal como ARNm de nucleasa Cas clase 2, de alrededor de 25:1 a alrededor de 1:25. En determinadas modalidades, la formulación de LNP incluye una relación de ARNg con respecto a ARNm de nucleasa Cas, tal como ARNm de nucleasa Cas clase 2, de alrededor de 10:1 a alrededor de 1:10. En determinadas modalidades, la formulación de LNP incluye una relación de ARNg con respecto a ARNm de nucleasa Cas, tal como ARNm de nucleasa Cas clase 2, de alrededor de 8:1 a alrededor de 1:8. Tal como se miden en la presente, las proporciones son en peso. En algunas modalidades, la formulación de LNP incluye una relación de ARNg con respecto a ARNm de nucleasa Cas, tal como ARNm de Cas clase 2, de alrededor de 5:1 a alrededor de 1:5. En algunas modalidades, la relación es de alrededor de 3:1 a 1:3, alrededor de 2:1 a 1:2, alrededor de 5:1 a 1:2, alrededor de 5:1 a 1:1, alrededor de 3:1 a 1:2, alrededor de 3:1 a 1:1, alrededor de 3:1, alrededor de 2:1 a 1:1. En algunas modalidades, la relación entre ARNg y ARNm es de alrededor de 3:1 a alrededor de 2:1. En algunas modalidades, la relación entre ARNg y ARNm de nucleasa Cas, tal como nucleasa Cas clase 2, es de alrededor de 1:1. La relación puede ser de alrededor de 25:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:10 o 1:25.

[0152] Las composiciones de LNP descritas en la presente pueden incluir una plantilla de ácido nucleico. La plantilla de ácido nucleico puede coformularse con un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como un ARNm de nucleasa Cas de Clase 2. En algunas modalidades, la plantilla de ácido nucleico puede coformularse con un ARN guía. En algunas modalidades, la plantilla de ácido nucleico puede coformularse tanto con un ARNm que codifica una nucleasa Cas como con un ARN guía. En algunas

modalidades, la plantilla de ácido nucleico puede formularse por separado a partir de un ARNm que codifica una nucleasa Cas o un ARN guía. El ácido nucleico de plantilla puede administrarse con o por separado de las composiciones de LNP. En algunas modalidades, la plantilla de ácido nucleico puede ser de cadena simple o doble, dependiendo del mecanismo de reparación deseado. La plantilla puede tener regiones de homología respecto al ADN objetivo, o a secuencias adyacentes al ADN objetivo.

[0153] En algunas modalidades, las LNP se forman mediante la mezcla de una solución acuosa de ARN con una solución lipídica a base de solvente, por ejemplo, etanol al 100 %. Los solventes o soluciones adecuadas incluyen o pueden contener: agua, PBS, amortiguador Tris, NaCl, amortiguador de citrato, etanol, cloroformo, dietiléter, ciclohexano, tetrahidrofurano, metanol, isopropanol. Puede utilizarse un amortiguador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, para la administración *in vivo* de LNP. En determinadas modalidades, el amortiguador se utiliza para mantener el pH de la composición que comprende LNP a un pH de 6,5 o por encima de este. En determinadas modalidades, el amortiguador se utiliza para mantener el pH de la composición que comprende LNP a un pH de 7,0 o por encima de este. En determinadas modalidades, la composición tiene un pH que oscila de alrededor de 7,2 a alrededor de 7,7. En modalidades adicionales, la composición tiene un pH que oscila entre alrededor de 7,3 y alrededor de 7,7, o que oscila entre alrededor de 7,4 y alrededor de 7,6. En modalidades adicionales, la composición tiene un pH de alrededor de 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6 o 7,7. El pH de la composición puede medirse con una micro sonda de pH. En determinadas modalidades, se incluye un crioprotector en la composición. Los ejemplos no taxativos de crioprotectores incluyen sacarosa, trehalosa, glicerol, DMSO y etilenglicol. Los ejemplos de composiciones pueden incluir hasta 10 % de crioprotector, tal como, por ejemplo, sacarosa. En determinadas modalidades, la composición de LNP puede incluir alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de crioprotector. En determinadas modalidades, la composición de LNP puede incluir alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de sacarosa. En algunas modalidades, la composición de LNP puede incluir un amortiguador. En algunas modalidades, el amortiguador puede comprender un amortiguador de fosfato (PBS), un amortiguador Tris, un amortiguador de citrato o mezclas de estos. En determinadas modalidades, el amortiguador comprende NaCl. En determinadas modalidades, se omite el NaCl. Los ejemplos de cantidades de NaCl pueden oscilar entre alrededor de 20 mM y alrededor de 45 mM. Los ejemplos de cantidades de NaCl pueden oscilar entre alrededor de 40 mM y alrededor de 50 mM. En algunas modalidades, la cantidad de NaCl es de alrededor de 45 mM. En algunas modalidades, el amortiguador es amortiguador Tris. Los ejemplos de cantidades de Tris pueden oscilar entre alrededor de 20 mM y alrededor de 60 mM. Los ejemplos de cantidades de Tris pueden oscilar entre alrededor de

40 mM y alrededor de 60 mM. En algunas modalidades, la cantidad de Tris es de alrededor de 50 mM. En algunas modalidades, el amortiguador comprende NaCl y Tris. Determinados ejemplos de modalidades de las composiciones de LNP contienen sacarosa al 5 % y NaCl 45 mM en amortiguador Tris. En otros ejemplos de modalidades, las composiciones contienen sacarosa en una cantidad de alrededor de 5 % p/v, NaCl aproximadamente 45 mM y Tris aproximadamente 50 mM a pH 7,5. Las cantidades de sal, amortiguador y crioprotectores pueden variar de manera de mantener la osmolalidad de la formulación en general. Por ejemplo, la osmolalidad final puede mantenerse por debajo de 450 mOsm/L. En modalidades adicionales, la osmolalidad es de entre 350 y 250 mOsm/L. Determinadas modalidades tienen una osmolalidad final de 300 +/- 20 mOsm/L.

10 **[0154]** En algunas modalidades, se utiliza mezclado microfluídico, mezclado T o mezclado cruzado. En determinados aspectos, pueden variar las velocidades de flujo, tamaño de las uniones, geometría de las uniones, forma de las uniones, diámetro del tubo, soluciones y/o concentraciones de ARN y lípidos. Las LNP o composiciones de LNP pueden concentrarse o purificarse, por ejemplo, mediante diálisis, filtración de flujo tangencial o cromatografía. Las LNP pueden almacenarse como una suspensión, una emulsión o un polvo liofilizado, por ejemplo. En algunas modalidades, una composición de LNP se almacena a 2-8 °C, en determinados aspectos, las composiciones de LNP se almacenan a temperatura ambiente. En modalidades adicionales, una composición de LNP se almacena congelada, por ejemplo, a -20 °C u -80 °C. En otras modalidades, una composición de LNP se almacena a una temperatura que oscila entre alrededor de 0 °C y alrededor de -80 °C. Las composiciones de LNP congeladas se pueden descongelar antes del uso, por ejemplo, en hielo, a temperatura ambiente o a 25 °C.

20 **[0155]** Las LNP pueden ser, por ejemplo, microesferas (lo que incluye vesículas unilamelares y multilamelares, por ejemplo, “liposomas” - capas dobles de lípidos en fase lamelar que, en algunas modalidades, son sustancialmente esféricas - y, en modalidades más particulares, pueden comprender un núcleo acuoso, por ejemplo, comprender una parte sustancial de moléculas de ARN), una fase dispersa en una emulsión, micelas o una fase interna en una suspensión.

25 **[0156]** Además, las composiciones de LNP son biodegradables, dado que no acumulan niveles citotóxicos *in vivo* con una dosis terapéuticamente eficaz. En algunas modalidades, las composiciones de LNP no provocan una respuesta inmunitaria innata que lleva a efectos sustancialmente adversos con un nivel de dosis terapéutico. En algunas modalidades, las composiciones de LNP proporcionadas en la presente no provocan toxicidad a un nivel de dosis terapéutico.

[0157] En algunas modalidades, el pdi puede oscilar de alrededor de 0,005 a alrededor de 0,75. En algunas modalidades, el pdi puede oscilar de alrededor de 0,01 a alrededor de 0,5. En algunas modalidades, el pdi puede oscilar entre alrededor de cero y alrededor de 0,4. En algunas modalidades, el pdi puede oscilar entre alrededor de cero y alrededor de 0,35. En algunas modalidades, el pdi puede oscilar entre
 5 alrededor de cero y alrededor de 0,35. En algunas modalidades, el pdi puede oscilar entre alrededor de cero y alrededor de 0,3. En algunas modalidades, el pdi puede oscilar entre alrededor de cero y alrededor de 0,25. En algunas modalidades, el pdi puede oscilar entre alrededor de cero y alrededor de 0,2. En algunas modalidades, el pdi puede ser menor que alrededor de 0,08, 0,1, 0,15, 0,2 o 0,4.

[0158] Las LNP descritas en la presente tienen un tamaño (por ejemplo, diámetro promedio Z) de
 10 alrededor de 1 a alrededor de 250 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 10 a alrededor de 200 nm. En modalidades adicionales, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 20 a alrededor de 150 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 50 a alrededor de 150 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 50 a alrededor de 100 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 50 a alrededor de 120 nm. En algunas
 15 modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 60 a alrededor de 100 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 75 a alrededor de 150 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 75 a alrededor de 120 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 75 a alrededor de 100 nm. A menos que se indique lo contrario, todos los tamaños mencionados en la presente son tamaños (diámetros) promedio de
 20 nanopartículas completamente formadas, tal como se miden mediante dispersión de luz dinámica en un Zetasizer de Malvern. La muestra de nanopartículas se diluye en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), de manera que la tasa sea de aproximadamente 200-400 kcps. Los datos se presentan como promedio ponderado de la medición de intensidad (diámetro promedio Z).

[0159] En algunas modalidades, las LNP se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que
 25 oscila entre 50 % y alrededor de 100 %. En algunas modalidades, las LNP se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que oscila entre 50 % y alrededor de 70 %. En algunas modalidades, las LNP se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que oscila entre 70 % y alrededor de 90 %. En algunas modalidades, las LNP se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que oscila entre 90 % y alrededor de 100 %. En algunas modalidades, las LNP se forman con una eficiencia de
 30 encapsulación promedio que oscila entre 75 % y alrededor de 95 %.

[0160] En algunas modalidades, las LNP se forman con un peso molecular promedio que oscila de alrededor de $1,00\text{E}+05$ g/mol a alrededor de $1,00\text{E}+10$ g/mol. En algunas modalidades, las LNP se forman con un peso molecular promedio que oscila de alrededor de $5,00\text{E}+05$ g/mol a alrededor de $7,00\text{E}+07$ g/mol. En algunas modalidades, las LNP se forman con un peso molecular promedio que oscila de alrededor de $1,00\text{E}+06$ g/mol a alrededor de $1,00\text{E}+10$ g/mol. En algunas modalidades, las LNP se forman con un peso molecular promedio que oscila de alrededor de $1,00\text{E}+07$ g/mol a alrededor de $1,00\text{E}+09$ g/mol. En algunas modalidades, las LNP se forman con un peso molecular promedio que oscila de alrededor de $5,00\text{E}+06$ g/mol a alrededor de $5,00\text{E}+09$ g/mol.

[0161] En algunas modalidades, la polidispersidad (M_w/M_n ; la relación entre la masa molar promedio en peso (M_w) con respecto a la masa molar promedio en número (M_n)) puede oscilar de alrededor de 1,000 a alrededor de 2,000. En algunas modalidades, M_w/M_n puede oscilar de alrededor de 1,00 a alrededor de 1,500. En algunas modalidades, M_w/M_n puede oscilar de alrededor de 1,020 a alrededor de 1,400. En algunas modalidades, M_w/M_n puede oscilar de alrededor de 1,010 a alrededor de 1,100. En algunas modalidades, M_w/M_n puede oscilar de alrededor de 1,100 a alrededor de 1,350.

Métodos para modificar células genéticamente; células modificadas genéticamente

[0162] Las composiciones de LNP descritas en la presente pueden utilizarse en métodos para modificar genéticamente células a través de edición génica, tanto *in vivo* como *in vitro*. En algunas modalidades, los métodos implican poner en contacto una célula con una composición de LNP descrita en la presente.

[0163] En algunas modalidades, los métodos implican poner en contacto una célula en un sujeto, tal como un mamífero, tal como un ser humano. En algunas modalidades, la célula se encuentra en un órgano, tal como el hígado, tal como el hígado de un mamífero, tal como el hígado de un ser humano. En algunas modalidades, la célula es una célula hepática, tal como una célula hepática de mamífero, tal como una célula hepática humana. En algunas modalidades, la célula es un hepatocito, tal como un hepatocito de mamífero, tal como un hepatocito humano. En algunas modalidades, la célula hepática es una célula madre. En algunas modalidades, la célula hepática humana puede ser una célula endotelial sinusoidal hepática (LSEC). En algunas modalidades, la célula hepática puede ser una célula de Kupffer. En algunas modalidades, la célula hepática puede ser una célula estrellada hepática. En algunas modalidades, la célula hepática humana puede ser una célula tumoral. En algunas modalidades, la célula hepática puede ser una célula madre hepática. En modalidades adicionales, la célula comprende receptores de unión a ApoE. En algunas modalidades, la célula hepática, tal como un hepatocito, se encuentra *in situ*. En algunas modalidades, la célula hepática, tal como un hepatocito, está aislada, por ejemplo, en un cultivo, tal como

un cultivo primario. También se proporcionan métodos correspondientes a los usos descritos en la presente, que comprenden administrar las composiciones de LNP descritas en la presente a un sujeto o poner en contacto una célula, tal como las descritas anteriormente, con las composiciones de LNP descritas en la presente.

- 5 **[0164]** En algunas modalidades, se proporcionan células modificadas genéticamente, por ejemplo, una célula modificada genéticamente derivada de cualquier tipo celular del párrafo anterior. Dichas células modificadas genéticamente se producen de acuerdo con los métodos descritos en la presente. En algunas modalidades, la célula modificada genéticamente se encuentra dentro de un tejido u órgano, por ejemplo, el hígado dentro de un sujeto.
- 10 **[0165]** En algunos de los métodos y células descritos en la presente, una célula comprende una modificación, por ejemplo, una inserción o delección (“indel”) o sustitución de nucleótidos en la secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación comprende una inserción de 1, 2, 3, 4 o 5 o más nucleótidos en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación comprende una inserción de ya sea 1 o 2 nucleótidos en una secuencia objetivo. En otras modalidades, la modificación comprende
- 15 una delección de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 o más nucleótidos en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación comprende una delección de ya sea 1 o 2 nucleótidos en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación comprende una indel que da como resultado una mutación de desplazamiento de marco en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación comprende una sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 o más nucleótidos en
- 20 una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación comprende una sustitución de ya sea 1 o 2 nucleótidos en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación comprende una inserción, delección y/o sustitución de nucleótidos que resulta de la incorporación de una plantilla de ácido nucleico, por ejemplo, cualquiera de las plantillas de ácido nucleico descritas en la presente.
- [0166]** En algunas modalidades, se proporciona una población de células que comprende células
- 25 modificadas genéticamente, por ejemplo, una población de células que comprende células modificadas genéticamente de acuerdo con los métodos descritos en la presente. En algunas modalidades, la población comprende células modificadas genéticamente cultivadas *in vitro*. En algunas modalidades, la población se encuentra dentro de un tejido u órgano, por ejemplo, el hígado dentro de un sujeto. En algunas modalidades, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos
- 30 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 % o al menos

95 % o más de las células de la población está modificado genéticamente En determinadas modalidades, un método descrito en la presente da como resultado una eficacia de edición (o “porcentaje de edición”) de 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 % o al menos 95 %, definida como detección de indel. En modalidades otras, un método descrito en la presente da como resultado una eficacia de modificación de ADN de 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 % o al menos 95 %, definida como la detección de un cambio en la secuencia, ya sea una inserción, delección, sustitución o de otro modo. En determinadas modalidades, un método descrito en la presente da como resultado un nivel de eficacia de edición o un nivel de eficacia de modificación de ADN de alrededor de 5 % a alrededor de 100 %, alrededor de 10 % a alrededor de 50 %, alrededor de 20 a alrededor de 100 %, alrededor de 20 a alrededor de 80 %, alrededor de 40 a alrededor de 100 %, o alrededor de 40 a alrededor de 80 % en una población celular.

[0167] En algunos de los métodos y células descritos en la presente, las células en una población comprenden una modificación, por ejemplo, una indel o sustitución en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación comprende una inserción de 1, 2, 3, 4 o 5 o más nucleótidos en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación comprende una inserción de ya sea 1 o 2 nucleótidos en una secuencia objetivo. En otras modalidades, la modificación comprende una delección de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 o más nucleótidos en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación comprende una delección de ya sea 1 o 2 nucleótidos en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación da como resultado una mutación de desplazamiento de marco en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación comprende una indel que da como resultado una mutación de desplazamiento de marco en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % o más de las células modificadas genéticamente en la población comprende una mutación de desplazamiento de marco. En algunas modalidades, la modificación comprende una sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 o más nucleótidos en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación comprende una sustitución de ya sea 1 o 2 nucleótidos en una secuencia objetivo. En algunas modalidades, la modificación

comprende una inserción, delección y/o sustitución de nucleótidos que resulta de la incorporación de una plantilla de ácido nucleico, por ejemplo, cualquiera de las plantillas de ácido nucleico descritas en la presente.

Métodos de edición génica

5 **[0168]** Las composiciones de LNP descritas en la presente pueden utilizarse para la edición génica *in vivo* e *in vitro*. En una modalidad, una o más composiciones de LNP descritas en la presente pueden administrarse a un sujeto que lo necesita. En una modalidad, la o las composiciones de LNP descritas en la presente pueden ponerse en contacto con una célula. En una modalidad, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición descrita en la presente puede entrar en contacto con una célula de un sujeto que
10 lo necesita. En una modalidad, una célula modificada genéticamente puede producirse mediante la puesta en contacto de una célula con una composición de LNP descrita en la presente. En diversas modalidades, los métodos comprenden introducir un ácido nucleico de plantilla en una célula o sujeto, tal como se estableció anteriormente.

[0169] En algunas modalidades, los métodos implican administrarle la composición de LNP a una
15 célula asociada con un trastorno hepático. En algunas modalidades, los métodos implican tratar un trastorno hepático. En determinadas modalidades, los métodos implican poner en contacto una célula hepática con la composición de LNP. En determinadas modalidades, los métodos implican poner en contacto un hepatocito con la composición de LNP. En algunas modalidades, los métodos implican poner en contacto una célula de unión a ApoE con la composición de LNP.

20 **[0170]** En una modalidad, una composición de LNP que comprende un ARNm que codifica una nucleasa Cas clase 2 y un ARNg puede administrarse a una célula, tal como una célula de unión a ApoE. En modalidades adicionales, un ácido nucleico de plantilla también se introduce en la célula. En determinadas instancias, una composición de LNP que comprende una nucleasa Cas clase 2 y un ARNg puede suministrarse a una célula, tal como una célula de unión a ApoE. En una modalidad, una
25 composición de LNP que comprende un ARNm que codifica una nucleasa Cas clase 2, un ARNg y una plantilla puede suministrarse a una célula. En determinadas instancias, una composición de LNP que comprende una nucleasa Cas y un ARNg puede suministrarse a una célula hepática. En algunos casos, la célula hepática se encuentra en un sujeto.

[0171] En determinadas modalidades, un sujeto puede recibir una única dosis de una composición de
30 LNP. En otros ejemplos, un sujeto puede recibir múltiples dosis de una composición de LNP. En algunas modalidades, la composición de LNP se administra 2-5 veces. Cuando se administra más de una dosis, las

dosis pueden administrarse con alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 o 28 días de separación; alrededor de 2, 3, 4, 5 o 6 meses de separación; o alrededor de 1, 2, 3, 4 o 5 años de separación. En determinadas modalidades, la edición mejora al volver a administrar una composición de LNP.

[0172] En una modalidad, una composición de LNP que comprende un ARNm que comprende una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas clase 2, se puede administrar a una célula, separada de la administración de una composición que comprende un ARNg. En una modalidad, una composición de LNP que comprende un ARNm que comprende una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas clase 2 y un ARNg, se puede administrar a una célula, separada de la administración de un ácido nucleico de plantilla a la célula. En una modalidad, una composición de LNP que comprende un ARNm que comprende una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas clase 2, se puede administrar a una célula, seguida por la administración secuencial de una composición de LNP que comprende un ARNg y entonces una plantilla a la célula. En modalidades donde la composición de LNP comprende un ARNm que codifica una nucleasa Cas se administra antes de una composición de LNP que comprende un ARNg, la administración puede realizarse con 4, 6, 8, 12 o 24 horas de separación; o 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días de separación.

[0173] En una modalidad, las composiciones de LNP pueden usarse para editar un gen, lo cual da como resultado una inactivación del gen. En una modalidad, las composiciones de LNP pueden utilizarse para editar genes, lo cual da como resultado la atenuación génica en una población de células. En otra modalidad, las composiciones de LNP pueden usarse para editar un gen, lo cual da como resultado una corrección del gen. En una modalidad adicional, las composiciones de LNP pueden usarse para editar una célula, lo cual da como resultado una inserción genética.

[0174] En una modalidad, la administración de la composición de LNP puede dar como resultado una edición génica que dé como resultado una respuesta persistente. Por ejemplo, la administración puede dar como resultado una duración de respuesta de un día, un mes, un año o más. Tal como se usa en la presente, “duración de la respuesta” significa que, después de editar las células mediante el uso de la composición de LNP descrita en la presente, la modificación resultante está todavía presente durante un determinado período de tiempo después de suministrar la composición de LNP. La modificación puede ser detectada mediante la medición de los niveles de proteína objetivo. La modificación puede ser detectada al detectar el ADN objetivo. En algunas modalidades, la duración de la respuesta puede ser de al menos 1 semana. En otras modalidades, la duración de la respuesta puede ser de al menos 2 semanas. En una modalidad, la duración de la respuesta puede ser de al menos 1 mes. En algunas modalidades, la duración de la respuesta puede ser de al menos 2 meses. En una modalidad, la duración de la respuesta puede ser de al menos 4

meses. En una modalidad, la duración de la respuesta puede ser de al menos 6 meses. En determinadas modalidades, la duración de la respuesta puede ser de alrededor de 26 semanas. En algunas modalidades, la duración de la respuesta puede ser de al menos 1 año. En algunas modalidades, la duración de la respuesta puede ser de al menos 5 años. En algunas modalidades, la duración de la respuesta puede ser de al menos 10 años. En algunas modalidades, una respuesta persistente es detectable después de al menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21 o 24 meses, ya sea mediante medición de los niveles de proteína objetivo o mediante la detección del ADN objetivo. En algunas modalidades, una respuesta persistente es detectable después de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 años, ya sea mediante medición de los niveles de proteína objetivo o mediante la detección del ADN objetivo.

[0175] Las composiciones de LNP pueden administrarse por vía parenteral. Las composiciones de LNP de la invención se pueden administrar directamente al torrente sanguíneo, tejido, músculo o un órgano interno. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La administración puede ser local. Los medios adecuados de adecuada incluyen vía intravenosa, intraarterial, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, subretiniana, intravítrea, en la cámara anterior, intramuscular, intrasinovial, intradérmica y subcutánea. Los dispositivos adecuados para la administración incluyen inyectores de aguja (inclusive microaguja), inyectores sin aguja, bombas osmóticas y técnicas de infusión.

[0176] Las composiciones de LNP se administrarán en general, aunque no necesariamente, como una formulación asociada con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término “excipiente” incluye cualquier ingrediente que no sea el compuesto de la descripción, los demás componentes lipídicos ni el agente biológicamente activo. Un excipiente puede proporcionar una característica ya sea funcional (por ejemplo, controlar la tasa de liberación del fármaco) y/o no funcional (por ejemplo, procesar un auxiliar o diluyente) a las formulaciones. La selección de excipiente dependerá en gran medida de factores tales como el modo de administración en particular, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y la estabilidad, y la naturaleza de la forma de dosificación.

[0177] Las formulaciones parenterales son típicamente suspensiones o soluciones acuosas u oleosas. Cuando la formulación es acuosa, los excipientes, tales como azúcares (inclusive, de modo no taxativo, glucosa, manitol, etc.), sales, carbohidratos y agentes amortiguadores (preferentemente a un pH entre 3 y 9), pero, para algunas aplicaciones, se puede formular de forma más adecuada con una solución no acuosa estéril o en forma seca para ser utilizada junto con un vehículo adecuado, tal como agua estéril y libre de pirógenos (WFI).

[0178] Si bien la invención se describe junto con las modalidades ilustradas, se entenderá que no se pretende limitar la invención a tales modalidades. Por el contrario, se pretende que la invención abarque todas las alternativas, modificaciones y equivalentes, incluso equivalentes de características específicas, que puedan incluirse dentro de la invención como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

5 **[0179]** Tanto la descripción general como la descripción detallada que anteceden, así como los ejemplos que siguen a continuación, son ilustrativos y explicativos solamente y no restringen la descripción. Los títulos de las secciones usados en la presente tienen únicamente fines de organización y no debe interpretarse que limiten la materia deseada. En caso de que cualquier documento bibliográfico incorporado mediante referencia contradiga cualquier término definido en la presente memoria
10 descriptiva, la presente memoria descriptiva será la que rija. Todos los intervalos proporcionados en la solicitud abarcan los extremos, a menos que se establezca lo contrario.

[0180] Nótese que, tal como se usa en la presente solicitud, la forma singular “un”, “uno” y “el” incluyen referencias en plural, a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una composición” incluye una pluralidad de composiciones y la referencia a “una
15 célula” incluye una pluralidad de células, y similares. El uso de “o” es inclusivo y significa “y/o”, a menos que se establezca lo contrario.

[0181] Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Los valores medidos y mensurables se entenderá que son aproximados, tomando en cuenta las cifras significativas y el error asociado con la medición. El término “alrededor de” o “aproximadamente” significan un error aceptable
20 para un valor particular determinado por un experto en la técnica, lo que dependerá parcialmente de cómo se mida o determine el valor. El uso de un modificador tal como “alrededor de” antes de un intervalo o antes de una lista de valores modifica cada extremo del intervalo o cada valor en la lista. “Alrededor de” también incluye el valor o extremo. Por ejemplo, “alrededor de 50-55” abarca “de alrededor de 50 a alrededor de 55”. Además, el uso de “comprenden”, “comprende”, “que comprende”, “contienen”,
25 “contiene”, “que contiene”, “incluyen”, “incluye” y “que incluye” no es taxativo.

[0182] A menos que se indique específicamente en la memoria descriptiva que antecede, las modalidades en la memoria descriptiva que mencionan “que consisten en” varios componentes, también se contemplan como “que consiste en” o “que consiste esencialmente en” los componentes mencionados; las modalidades en la memoria descriptiva que mencionan “que comprenden” varios componentes,
30 también se contemplan como “que comprenden” o “que comprenden esencialmente” los componentes mencionados; las modalidades en la memoria descriptiva que mencionan “alrededor de” varios

componentes, también se contemplan como “con” los componentes mencionados”; y las modalidades en la memoria descriptiva que mencionan “que consisten esencialmente en” varios componentes, también se contemplan como que “consisten en” o “que comprenden” los componentes mencionados (esta capacidad de intercambio no se aplica al uso de estos términos en las reivindicaciones).

5 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1 – Composiciones de LNP para edición in vivo en ratones

10 **[0183]** Se prepararon preparaciones a baja escala de diversas composiciones de LNP para investigar sus propiedades. En ensayos para porcentaje de edición en hígado en ratones, se formularon ARNm de Cas9 y ARNgs modificado químicamente dirigidos a una secuencia de TTR de ratón en LNP con diversos % molares de PEG, % molares de lípido A y relaciones entre N:P como se describe en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Composiciones de LNP.

N.º de LNP	% molar del lípido A	% molar de PEG-DMG	Relación entre N:P
(varios)	45	2, 2,5, 3, 4, 5	4,5
(varios)	45	2, 2,5, 3, 4, 5	6
(varios)	50	2, 2,5, 3, 4, 5	4,5
(varios)	50	2, 2,5, 3, 4, 5	6
(varios)	55	2, 2,5, 3, 4, 5	4,5
(varios)	55	2, 2,5, 3, 4, 5	6

15 **[0184]** En la Fig. 1, las formulaciones de LNP se identifican en el eje X basándose en su % molar del lípido A y relaciones entre N:P, marcadas como “ % CL; N:P”. Tal como se indica en la leyenda de la Fig. 1, las concentraciones de PEG-2k-DMG de 2, 2,5, 3, 4 o 5 % molar se formularon con (1) 45 % molar de lípido A; 4,5 N:P (“45; 4,5”); (2) 45 % molar de lípido A; 6 N:P (“45; 6”); (3) 50 % molar de lípido A; 4,5 N:P (“50; 4,5”); (4) 50 % molar de lípido A; 6 N:P (“50; 6”); (5) 55 % molar de lípido A; 4,5 N:P (“55; 4,5”); y (6) 55 % molar de lípido A; 6 N:P (“55; 6”). El % molar de DSPC se mantuvo constante en 20 9 % molar y el % molar de colesterol se agregó para llevar el resto del componente lipídico de cada formulación a 100 % molar. Cada una de las 30 formulaciones se formuló como se describe a continuación y se administraron como una única dosis de 1 mg por kg o dosis de 0,5 mg por kg de ARN total (Fig. 1A y Fig. 1B, respectivamente).

Formulación de LNP - NanoAssemblr

[0185] Los componentes de nanopartículas lipídicas se disolvieron en etanol al 100 % con las relaciones molares del componente lipídico establecidas anteriormente. Las cargas de ARN se disolvieron en amortiguador de citrato 25 mM, NaCl 100 mM, pH 5,0, lo cual dio como resultado una concentración de carga de ARN de aproximadamente 0,45 mg/mL. Las LNP se formularon con una relación molar entre amina lipídica y fosfato ARN (N:P) de alrededor de 4,5 o alrededor de 6, con la relación entre ARNm y ARNg de 1:1 en peso.

[0186] Las LNP se formaron mediante mezclado microfluídico de soluciones de ARN y lípidos mediante el uso del instrumento NanoAssemblr™ Benchtop de Precision Nanosystems, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se mantuvo una proporción 2:1 entre el solvente acuoso y el orgánico durante el mezclado mediante el uso de velocidades de flujo diferenciales. Después de mezclar, las LNP se recogieron, se diluyeron en agua (aproximadamente 1:1 v/v), se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente y se diluyeron adicionalmente en agua (aproximadamente 1:1 v/v) antes del cambio final de amortiguador. El cambio de amortiguador final en Tris 50 mM, NaCl 45 mM, sacarosa al 5 % (p/v), pH 7,5 (TSS) se completó con columnas de desalinización PD-10 (GE). De ser necesario, las formulaciones se concentraron mediante centrifugación con filtro de centrífuga de 100 kDa Amicon (Millipore). La mezcla resultante se filtró entonces mediante el uso de un filtro estéril de 0,2 µm. La LNP final se almacenó a -80 °C hasta su uso posterior.

Analítica de la formulación

[0187] Se utiliza dispersión de luz dinámica (“DLS”) para caracterizar el índice de polidispersidad (“pdi”) y el tamaño de las LNP de la presente descripción. DLS mide la dispersión de luz que resulta de someter una muestra a una fuente de luz. El PDI, tal como se determina mediante las mediciones de DLS, representa la distribución de tamaño de partícula (alrededor del tamaño de partícula promedio) en una población, donde una población perfectamente uniforme tiene un PDI de cero.

[0188] La dispersión de luz electroforética se utiliza para caracterizar la carga superficial de la LNP a un pH específico. La carga superficial, o potencial zeta, es una medida de la magnitud de la repulsión/atracción electrostática entre partículas en la suspensión de LNP.

[0189] El Fraccionamiento del flujo del campo de flujo asimétrico con dispersión de luz multiángulo (AF4-MALS) se utiliza para separar las partículas en la formulación por radio hidrodinámico y luego medir los pesos moleculares, radios hidrodinámicos y radios de la raíz de media cuadrática de las partículas fraccionadas. Esto permite evaluar el peso molecular y las distribuciones de tamaño, así como

características secundarias, tal como la gráfica de Burchard-Stockmeyer (relación entre el radio de la raíz cuadrática media (“rms”) y el radio hidrodinámico en el tiempo, lo que sugiere la densidad interna del núcleo de una partícula) y la gráfica de conformación de rms (logaritmo del de radio rms en función del logaritmo del peso molecular donde la pendiente del ajuste lineal resultante da un grado de compactación en función de la elongación).

[0190] El análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, Malvern Nanosight) se puede utilizar para determinar la distribución del tamaño de las partículas de la formulación, así como la concentración de las partículas. Las muestras de LNP se diluyen adecuadamente y se inyectan en un portaobjetos de microscopio. Una cámara registra la luz dispersada a medida que las partículas se infunden lentamente a través del campo de visión. Una vez capturada la película, el análisis de seguimiento de nanopartículas procesa la película mediante el seguimiento de píxeles y el cálculo de un coeficiente de difusión. Este coeficiente de difusión puede traducirse en el radio hidrodinámico de la partícula. El instrumento también cuenta la cantidad de partículas individuales contadas en el análisis para obtener la concentración de partículas.

[0191] Puede utilizarse microscopía crioelectrónica (“cryo-EM”) para determinar el tamaño de partícula, morfología y características estructurales de una LNP.

[0192] El análisis composicional lipídico de las LNP se puede determinar a partir de cromografía líquida seguida por la detección de aerosol cargados (LC-CAD). Este análisis puede proporcionar una comparación del contenido lipídico real con el contenido lipídico teórico.

[0193] Las formulaciones de LNP se analizan para verificar el tamaño de partícula promedio, el índice de polidispersidad (pdi), contenido total de ARN, eficiencia de encapsulación de ARN y el potencial zeta. Las formulaciones de LNP pueden caracterizarse adicionalmente mediante análisis lipídico, AF4-MALS, NTA y/o cryo-EM. El tamaño de partícula promedio y la polidispersidad se miden mediante dispersión de luz dinámica (DLS) mediante el uso de un instrumento Zetasizer DLS de Malvern. Las muestras de LNP se diluyeron 30X en PBS antes de la medición mediante DLS. El diámetro promedio Z, que es una medición basada en la intensidad del tamaño de partícula promedio, se informó junto con el diámetro promedio en número y pdi. También se utiliza un instrumento Malvern Zetasizer para medir el potencial zeta de la LNP. Las muestras se diluyen 1:17 (50 µL en 800 µL) en PBS 0,1X, pH 7,4 antes de la medición.

[0194] Se utiliza un ensayo basado en fluorescencia (Ribogreen®, ThermoFisher Scientific) para determinar la concentración de ARN total y ARN libre. La eficiencia de encapsulación se calcula como (ARN total - ARN libre)/ARN total. Las muestras de LNP se diluyen adecuadamente 1X amortiguador

TE que contiene Triton-X 100 al 0,2 % para determinar el ARN total o un amortiguador 1x TE para determinar el ARN libre. Las curvas estándar se preparan mediante el uso de la solución de ARN inicial utilizada para hacer las formulaciones y diluidas en 1x amortiguador TE +/- 0,2 % de Triton-X 100. Se agrega entonces tinte RiboGreen® diluido (de acuerdo con las instrucciones del fabricante) a cada uno de los estándares y muestras y se deja incubar durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se utiliza un lector de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices) para leer las muestras longitudes de onda de excitación, corte automático y emisión fijadas en 488 nm, 515 nm y 525 nm, respectivamente. El ARN total y el ARN libre se determinan a partir de las curvas estándar adecuadas.

[0195] La eficiencia de encapsulación se calcula como (ARN total - ARN libre)/ARN total. El mismo procedimiento se puede utilizar para determinar la eficiencia de encapsulación de un componente de la carga a base de ADN o que contiene ácido nucleico. Puede utilizarse tinte Oligogreen para ADN de cadena simple, y tinte Picogreen para ADN de cadena doble.

[0196] AF4-MALS se utiliza para observar las distribuciones de peso y tamaño moleculares, así como las estadísticas secundarias de esos cálculos. Las LNP se diluyen según corresponda y se inyectan en un canal de separación AF4 mediante el uso de un muestreador automático de HPLC donde se enfocan y luego se eluyen con un gradiente exponencial en flujo cruzado a través del canal. Todo el líquido se impulsa mediante una bomba de HPLC y el instrumento Wyatt Eclipse. Las partículas que eluyen del flujo de canal AF4 a través de un detector UV, un detector de dispersión de luz multiángulo, un detector de dispersión de luz cuasi-elástico y un detector de índice de refracción diferencial. Los datos sin procesar se procesan mediante el uso de un modelo Debye para determinar el peso molecular y el radio de rms a partir de las señales del detector.

[0197] Los componentes lipídicos de las LNP se analizan cuantitativamente mediante HPLC acoplada a un detector de aerosol cargado (CAD). La separación cromatográfica de 4 componentes lipídicos se consigue mediante HPLC de fase inversa. El CAD es un detector basado en masa destructivo que detecta todos los compuestos no volátiles y la señal es coherente independientemente de la estructura del analito.

Cargas de ARNg y ARNm de Cas9

[0198] La carga de ARNm de Cas9 se preparó mediante transcripción *in vitro*. ARNm de Cas9 con casquetes y poliadenilado que comprendía 1X NLS (SEQ ID NO:48) se generó mediante transcripción *in vitro* mediante el uso de plantilla de ADN de plásmido y polimerasa de ARN de T7. El ADN de plásmido que contenía un promotor de T7 y una región poli(A/T) de 100 nt se linealizaron mediante incubación a 37 °C durante 2 horas con XbaI con las siguientes condiciones: 200 ng/μL de plásmido, 2 U/μL de XbaI

(NEB), y 1x de amortiguador de reacción. El XbaI se inactivó al calentar la reacción a 65 °C durante 20 minutos. El plásmido linealizado se purificó mediante sales de amortiguador y enzima mediante el uso de una columna de sílice maxi spin (Epoch Life Sciences) y se analizó mediante gel de agarosa para confirmar la linealización. La reacción IVT para generar ARNm modificado de Cas9 se incubó a 37 °C durante 4 horas en las siguientes condiciones: 50 ng/μL de plásmido linealizado; GTP, ATP, CTP y N1-metil pseudo-UTP (Trilink) con una concentración de 2 mM; ARCA 10 mM (Trilink); 5 U/μL de polimerasa de ARN de T7 (NEB); 1 U/μL de inhibidor de RNasa murina (NEB); 0,004 U/μL de pirofosfatasa inorgánica de *E. coli* (NEB); y 1x de amortiguador de reacción. Luego de una incubación de 4 horas, se agregó DNasa TURBO (ThermoFisher) hasta una concentración final de 0,01 U/μL y la reacción se incubó durante otros 30 minutos para eliminar la plantilla de ADN. El ARNm de Cas9 se purificó a partir de enzimas y nucleótidos mediante el uso de un kit de limpieza de transcripción MegClear, según el protocolo del fabricante (ThermoFisher). De manera alternativa, el ARNm de Cas9 se purificó con un método de precipitación de LiCl.

[0199] El ARNs en este ejemplo se sintetizó químicamente y se obtuvo de un proveedor comercial. La secuencia sg282 se proporciona a continuación, con modificaciones en 2'-O-metil y enlaces de fosforotioato como se representa a continuación (m = 2'-OMe; * = fosforotioato):

mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU. (SEQ ID NO:42).

LNP

[0200] Las LNP finales se caracterizaron para determinar la eficiencia de encapsulación, índice de polidispersidad y tamaño de partícula promedio, de acuerdo con los métodos analíticos proporcionados anteriormente.

[0201] Las LNP se administraron a ratones (dosis única de 1 mg/kg o 0,5 mg/kg) y se aisló ADN genómico para análisis de NGS como se describe a continuación.

Administración de LNP in vivo

[0202] Se utilizaron ratones hembra CD-1 de 6 a 10 semanas de edad en cada estudio. Se pesaron y agruparon los animales de acuerdo con el peso corporal para preparar las soluciones de dosificación basándose en el peso promedio grupal. Se dosificaron las LNP por medio de la vena lateral de la cola en un volumen de 0,2 mL por animal (aproximadamente 10 mL por kilogramo de peso corporal). Los animales se observaron durante aproximadamente 6 horas después de la dosis para verificar efectos

adversos. Se midió el peso corporal veinticuatro horas después de la administración y los animales se sacrificaron en diversos momentos mediante desangrado por medio de punción cardíaca bajo anestesia de isoflurano. Se recogió la sangre en tubos separadores de suero y en tubos que contenían citrato de sodio amortiguado para plasma, tal como se describe en la presente. Para estudios que implican la edición in vivo, se recogió tejido hepático del lóbulo medio o de tres lóbulos independientes (por ejemplo, lóbulo medio derecho, medio izquierdo y lateral izquierdo) de cada animal para la extracción de ADN y el análisis.

[0203] Las cohortes de ratones se midieron para la edición en el hígado mediante la secuenciación de próxima generación (NGS) y los niveles de TTR en suero (datos no mostrados).

10 Análisis ELISA de transtiretina (TTR)

[0204] Se recogió sangre y se aisló suero tal como se indica. Los niveles totales de TTR en suero de ratón se determinaron mediante el uso del kit de ELISA de prealbúmina de ratón (transtiretina) (Aviva Systems Biology, OKIA00111). Los niveles de TTR en suero de rata se midieron mediante el uso de un kit ELISA específico de rata (número de catálogo OKIA00159 de Aviva Systems Biology) según el protocolo de fabricación. Brevemente, los sueros se diluyeron en serie con el diluyente de la muestra del kit hasta una dilución final de 10 000 veces. Esta muestra diluida se añadió a las placas de ELISA y el ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones.

Secuenciación de NGS

[0205] Brevemente, para determinar de forma cuantitativa la eficiencia de edición en la ubicación objetivo en el genoma, se aisló ADN genómico y se utilizó secuenciación profunda para identificar la presencia de inserciones y deleciones introducidas mediante edición genética.

[0206] Se diseñaron cebadores de PCR alrededor del sitio objetivo (por ejemplo, TTR) y se amplificó el área genómica de interés. Se proporcionan más adelante secuencias de cebador. Se realizó PCR adicional de acuerdo con los protocolos del fabricante (Illumina) para agregar la química necesaria para la secuenciación. Se secuenciaron los amplicones en un instrumento MiSeq de Illumina. Las lecturas se alinearon con el genoma humano de referencia (por ejemplo, hg38) después de eliminar las que tuvieran bajos puntajes de calidad. Los archivos resultantes de las lecturas se mapearon respecto al genoma de referencia (archivos BAM), donde las lecturas que se superponían con la región de interés se seleccionaron y se calculó la cantidad de lecturas de tipo salvaje en relación con la cantidad de lecturas que contenían una inserción, sustitución o delección.

[0207] El porcentaje de edición (por ejemplo, la “eficiencia de edición” o “porcentaje de edición”) se define como la cantidad total de lecturas de secuencia con inserciones o deleciones respecto a la cantidad total de lecturas de secuencia, inclusive de tipo salvaje.

[0208] La Fig. 1 muestra los porcentajes de edición en el hígado de ratón medidos mediante NGS.

5 Como se muestra en la Fig. 1A, cuando se dosifica 1 mg por kg de ARN, los porcentajes de edición *in vivo* van desde alrededor de 20 % a más de 60 % de edición en el hígado. A una dosis de 0,5 mg por kg, Fig. 1B, se observó una edición en el hígado de 10 % a 60 %. En esta prueba *in vivo* de ratón, todas las composiciones administraron eficazmente ARNm y ARNm de Cas9 a las células hepáticas, con evidencia de actividad de nucleasa CRISPR/Cas activa en el lugar de destino medida por NGS para cada

10 composición de LNP. Las LNP que contenían 5 % de lípido de PEG presentaron un menor encapsulamiento (no se muestran datos) y una potencia algo reducida.

Ejemplo 2 – Analítica de composición de LNP

[0209] La caracterización analítica de LNP muestra parámetros fisicoquímicos mejorados en LNP formuladas con cantidades crecientes de lípido A y lípido de PEG. En la Tabla 3 a continuación se

15 proporcionan los compuestos que comprenden 2 % molar o 3 % molar de lípidos de PEG (PEG2k-DMG).

Tabla 3.

	LNP898	LNP897	LNP966	LNP969
CL/col./DSPC/PEG (% molar teórico)	45/44/9/2	45/43/9/3	50/38/9/3	55/33/9/3
ARNm	Cas9 SEQ ID NO: 48	Cas9 SEQ ID NO: 48	Cas9 U-dep SEQ ID NO: 43	Cas9 U-dep SEQ ID NO: 43
ARNg	G502 SEQ ID NO: 70	G502 SEQ ID NO: 70	G534 SEQ ID NO: 72	G534 SEQ ID NO: 72
N/P	4,5	4,5	6,0	6,0

Formulación de LNP – flujo transversal

[0210] Las LNP se formaron mediante mezcla por chorro de impacto del lípido en etanol con dos volúmenes de soluciones de ARN y un volumen de agua. El lípido en etanol se mezcla mediante una cruz

20 mezcladora con los dos volúmenes de solución de ARN. Una cuarta corriente de agua se mezcla con la

corriente de salida de la cruz a través de una T en línea (véase la Fig. 2 de WO2016010840). Las LNP se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se diluyeron con agua (aproximadamente 1:1 v/v). Las LNP diluidas se concentraron mediante filtración de flujo tangencial en un cartucho de lámina plana (Sartorius, MWCO 100kD) y luego se les cambió el amortiguador mediante diafiltración en Tris 50 mM, NaCl 45 mM, sacarosa al 5 % (p/v), pH 7,5 (TSS). De manera alternativa, el intercambio final de amortiguador en TSS se completó con columnas desalinizadoras PD-10 (GE). De ser necesario, las formulaciones se concentraron mediante centrifugación con filtro de centrífuga de 100 kDa Amicon (Millipore). La mezcla resultante se filtró entonces mediante el uso de un filtro estéril de 0,2 µm. La LNP final se almacenó de 4°C a -80°C hasta su uso posterior.

[0211] El ARNGs y el ARNm de Cas9 se prepararon como en el Ejemplo 1, excepto que se formaron casquetes y el ARNm al que se le agotó U de Cas9 (Cas9 Udep) poliadenilado comprende la SEQ ID N:43. Sg282 se describe en el Ejemplo 1 y la secuencia para sg534 (“G534”) se proporciona a continuación:

mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC
AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm
CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO:72)

[0212] Las formulaciones de LNP se analizaron para verificar el tamaño de partícula promedio, la polidispersidad (pdi), contenido total de ARN y eficiencia de encapsulación de ARN como se describió en el Ejemplo 1.

[0213] El análisis del tamaño promedio de partícula, la polidispersidad (PDI), el contenido total de ARN y la eficacia de encapsulación del ARN se muestran en la Tabla 4. Además de las concentraciones lipídicas teóricas de las composiciones de LNP, el análisis lipídico demostró los niveles de % molar de lípido reales, como se indica en el la Tabla 5 a continuación.

Tabla 4.

LNP N.º de identificador	N/P	Prom. Z (nm)	PDI	Promedio en número (nm)	Conc. de ARN (mg/mL)	Encaps. (%)
LNP898	4,5	87,91	0,030	71,33	1,53	98

LNP897	4,5	74,05	0,036	58,55	1,43	98
LNP966	6,0	82,78	0,010	67,86	2,12	98
LNP969	6,0	92,97	0,042	75,52	2,09	97

Tabla 5.

LNP N.º de identificador	Relación de lípidos (Lípido A/col/ DSPC/PEG) (teórico y real)	mg/mL de lípido A (teórico y real)	mg/mL de col (teórico y real)	mg/mL de DSPC (teórico y real)	mg/mL de PEG (teórico y real)
LNP898	45/44/9/2	18,0	8,0	3,3	2,3
	46,1/42,6/9,2/2	18,3	7,7	3,4	2,4
LNP897	45/43/9/3	18,0	7,8	3,3	3,5
	44,8/42,9/9,2/3,1	17,8	7,7	3,4	3,6
LNP966	50/38/9/3	33,4	11,5	5,6	5,8
	50,0/38,0/8,8/3,1	35,6	12,3	5,8	6,5
LNP969	55/33/9/3	33,4	9,1	5,1	5,3
	54,8/33,2/8,8/3,2	31,6	8,7	4,7	5,4

[0214] Para un análisis más detallado de las propiedades fisicoquímicas, LNP897, LNP898, LNP966 y LNP969 se sometieron a análisis de fraccionamiento de flujo de campo de flujo asimétrico – dispersión de luz multiángulo (AF4-MALS). El instrumento de AF4-MALS mide el tamaño de partícula y las distribuciones de peso molecular, y proporciona información acerca de la conformación y densidad de las partículas.

[0215] Las LNP se inyectan en un canal de separación AF4 mediante el uso de un muestreador automático de HPLC donde se enfocan y luego se eluyen con un gradiente exponencial en flujo cruzado a través del canal. Todo el líquido se impulsa mediante una bomba de HPLC y el instrumento Wyatt Eclipse. Las partículas que eluyen del flujo de canal AF4 a través de un detector UV, un detector de

dispersión de luz multiángulo Wyatt Heleos II, un detector de dispersión de luz cuasi-elástico y un detector de índice de refracción diferencial Wyatt Optilab T-rEX. Los datos sin procesar se procesan en el software Wyatt Astra 7 mediante el uso de un modelo Debye para determinar el peso molecular y el radio de rms a partir de las señales del detector.

- 5 **[0216]** Se proporciona un gráfico de logaritmo de masa molar diferencial para las LNP como Fig. 2A. En resumen, el eje X indica la masa molar (g/mol) y el eje Y indica la fracción numérica diferencial. La gráfica de logaritmo de masa molar diferencial muestra la distribución de los diferentes pesos moleculares medidos para una formulación específica. Esto proporciona datos acerca del modo de los pesos moleculares, así como la distribución general de los pesos moleculares dentro de la formulación, lo que
- 10 proporciona una mejor imagen de la heterogeneidad de las partículas que el peso molecular promedio. **[0217]** La heterogeneidad de las diferentes formulaciones de LNP se determina al medir los diferentes momentos de masa molar y calcular la relación entre la masa molar promedio en peso (M_w) y la masa molar promedio en número (M_n) para proporcionar una polidispersidad de M_w/M_n . La gráfica de la polidispersidad para estas diferentes formulaciones se proporciona en la Fig. 2B.
- 15 **[0218]** Los datos indican distribuciones de partículas más ajustadas con PEG al 3 % molar, y con lípido A al 50 y 55 % molar con N/P 6,0 como se muestra en la Fig. 2A. Esto se refleja en una polidispersidad estricta como se muestra en la Fig. 2B.

Ejemplo 3 – datos de AF4 MALS – formulaciones adicionales

- [0219]** La caracterización analítica de LNP muestra parámetros fisicoquímicos mejorados en LNP
- 20 formuladas con cantidades crecientes de lípido A. En la Tabla 6 se proporcionan composiciones que comprenden ya sea 55 % molar, 50 % molar o 45 % molar de lípido A con dos ARNg diferentes.

Tabla 6.

	LNP1021	LNP1022	LNP1023	LNP1024	LNP1025
CL/col./DSPC/PEG (% molar teórico)	50/38/9/3	55/33/9/3	45/43/9/3	50/38/9/3	55/33/9/3
ARNm	Cas9 Udep SEQ ID NO: 43	Cas9 Udep SEQ ID NO: 43	Cas9 Udep SEQ ID NO: 43	Cas9 Udep SEQ ID NO: 43	Cas9 Udep SEQ ID NO: 43
ARNg	G502	G502	G502	G509	G509

	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 71
N/P	6,0	6,0	4,5	6,0	6,0

[0220] Las LNP se formaron como se describe en el Ejemplo 2.

[0221] El ARNGs y ARNm de Cas9 se prepararon como se describió anteriormente.

[0222] Las composiciones de LNP se caracterizaron para determinar la eficiencia de encapsulación, índice de polidispersidad y tamaño de partícula promedio, tal como se describe en el Ejemplo 1.

[0223] El análisis del tamaño promedio de partícula, la polidispersidad (PDI), el contenido total de ARN y la eficacia de encapsulación del ARN se muestran en la Tabla 7. Además de las concentraciones lipídicas teóricas de las composiciones de LNP, el análisis lipídico demostró los niveles de % molar de lípido reales, como se indica en el la Tabla 8 a continuación.

10 **Tabla 7.**

LNP N.º de identificador	N/P	Prom. Z (nm)	PDI	Promedio en número (nm)	Conc. de ARN (mg/mL)	Encaps. (%)
LNP1021	6,0	83,18	0,027	67,15	1,63	98
LNP1022	6,0	94,08	0,005	78,28	1,60	97
LNP1023	4,5	74,01	0,017	61,11	1,61	97
LNP1024	6,0	85,37	0,002	70,42	1,59	97
LNP1025	6,0	94,47	0,018	77,71	1,60	98

Tabla 8.

LNP N.º de identificador	Relación de lípidos (Lípido A/col/ DSPC/PEG) (teórico y real)	mg/mL de lípido A (teórico y real)	mg/mL de col. (teórico y real)	mg/mL de DSPC (teórico y real)	mg/mL de PEG (teórico y real)
LNP1021	50/38/9/3	23,6	8,1	3,9	4,1
	50,9/37,4/8,6/3,1	21,6	7,2	3,4	3,8
LNP1022	55/33/9/3	23,6	6,4	3,6	3,7
	55,2/33,0/8,7/3,1	20,4	5,5	3,0	3,4
LNP1023	45/43/9/3	17,7	7,7	3,3	3,4
	45,9/42,4/8,6/3,1	15,3	6,4	2,7	3,0
LNP1024	50/38/9/3	23,6	8,1	3,9	4,1
	50,5/37,9/8,5/3,0	22,4	7,6	3,5	3,9
LNP1024	55/33/9/3	23,6	6,4	3,6	3,7
	55,5/33,1/8,5/3,0	21,3	5,8	3,0	3,4

[0224] Para un análisis más detallado de las propiedades fisicoquímicas, LNP1021, LNP1022, LNP1023, LNP1024 y LNP1025 se sometieron a análisis de fraccionamiento de flujo de campo de flujo asimétrico – dispersión de luz multiángulo (AF4-MALS). El instrumento de AF4-MALS mide el tamaño de partícula y las distribuciones de peso molecular, y proporciona información acerca de la conformación y densidad de las partículas.

[0225] Las LNP se corrieron en AF4-MALS como se describe en el Ejemplo 1.

[0226] Se proporciona un gráfico de logaritmo de masa molar diferencial para las LNP como Fig. 3A. En resumen, el eje X indica la masa molar (g/mol) y el eje Y indica la fracción numérica diferencial. La gráfica de logaritmo de masa molar diferencial muestra la distribución de los diferentes pesos moleculares calculados para una formulación específica. Esto proporciona datos acerca del modo de los pesos moleculares, así como la distribución general de los pesos moleculares dentro de la formulación, lo que proporciona una mejor imagen de la heterogeneidad de las partículas que el peso molecular promedio.

[0227] El peso molecular promedio se grafica en la Fig. 3B. El peso molecular promedio es el promedio de toda la distribución, pero no da información acerca de la forma de esa distribución. LNP1022 y LNP1025 tienen el mismo peso molecular promedio, pero LNP1022 tiene una distribución ligeramente más amplia.

5 **[0228]** La heterogeneidad de las diferentes formulaciones de LNP se calcula al fijarse en los diferentes momentos de masa molar y calcular la relación entre la masa molar promedio en peso (M_w) y la masa molar promedio en número (M_n) para proporcionar una polidispersidad de M_w/M_n . La gráfica de la polidispersidad para estas diferentes formulaciones se proporciona en la Fig. 4A.

10 **[0229]** Además, se proporciona una gráfica de Burchard-Stockmeyer de las formulaciones de LNP como Fig. 4B. La gráfica de Burchard-Stockmeyer muestra la relación entre el radio de rms y el radio hidrodinámico a través de la elución de la formulación a partir del canal de AF4. Esto proporciona información acerca de la densidad interna de una nanopartícula lipídica. La figura 4B muestra que LNP1021, LNP1022 y LNP1023 tienen perfiles diferentes en esta medición.

15 **Ejemplo 4 – el aumento del lípido de PEG mantiene la potencia con una reducción de la respuesta de citocina**

[0230] En otro estudio, se comparó el lípido de PEG DMG en formulaciones de LNP que comprendían 2 % molar o 3 % molar de lípido de PEG. En la Tabla 9 a continuación se proporcionan los compuestos que comprenden 2 % molar o 3 % molar de PEG DMG.

Tabla 9.

	LNP809	LNP810
CL/col./DSPC/PEG (% molar teórico)	45/44/9/2	45/43/9/3
ARNm	Cas9 SEQ ID NO: 48	Cas9 SEQ ID NO: 48
ARNg	G390 SEQ ID NO: 69	G390 SEQ ID NO: 69
N/P	4,5	4,5

20

[0231] Las LNP se formaron mediante el proceso descrito en el Ejemplo 2.

[0232] El ARNGs y el ARNm de Cas9 se prepararon como en el Ejemplo 1, con la secuencia de sg390 (“G390”) que se proporciona a continuación:

**mG*mC*mC*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAm
GmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU
mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO:69).**

[0233] Las formulaciones de LNP se analizaron para verificar el tamaño de partícula promedio, la polidispersidad (pdi), contenido total de ARN y eficiencia de encapsulación de ARN como se describió en el Ejemplo 1.

[0234] El análisis del tamaño promedio de partícula, la polidispersidad (PDI), el contenido total de ARN y la eficacia de encapsulación del ARN se muestran en la Tabla 10. Además de las concentraciones lipídicas teóricas de las composiciones de LNP, el análisis lipídico demostró los niveles % molar de lípido reales, como se indica en el la Tabla 11 a continuación.

Tabla 10.

LNP N.º de identificador	N/P	Prom. Z (nm)	PDI	Promedio en número (nm)	Conc. de ARN (mg/mL)	Encaps. (%)
LNP809	4,5	89,85	0,060	72,10	2,45	97
LNP810	4,5	75,26	0,025	61,17	2,14	97

Tabla 11.

LNP N.º de identificador	Relación de lípidos (Lípido A/col/ DSPC/PEG) (teórico y real)	mg/mL de lípido A (teórico y real)	mg/mL de col. (teórico y real)	mg/mL de DSPC (teórico y real)	mg/mL de PEG (teórico y real)
LNP809	45/44/9/2	28,6	12,7	5,3	3,7
	45,7/43,3/9,0/2,1	30,5	13,1	5,6	4,0
LNP810	45/43/9/3	25,2	10,9	4,7	4,9
	45,0/42,3/9,7/3,0	24,7	10,5	4,9	4,7

[0235] Las citocinas en suero de rata se evaluaron mediante un ensayo multiplexado de microesferas magnéticas Luminex (ensayo de microesferas magnéticas Milliplex MAP de Millipore Sigma, número de catálogo RECYTMAG-65K), al analizar MCP-1, IL-6, TNF-alfa e IFN-gamma. Las microesferas de ensayo se leyeron en el BioRad Bioplex-200 y las concentraciones de citocinas se calcularon a partir de una curva estándar mediante el uso de un ajuste logístico de 4 parámetros con el software Bioplex Manager versión 6,1. Los datos se grafican en la Fig. 5. Véase la Fig. 5A (TTR en suero), Fig. 5B (edición en el hígado) y Fig. 5C (citocina p MCP1).

[0236] Los niveles de TTR en suero de rata se midieron mediante el uso de un kit ELISA específico de rata (número de catálogo OKIA00159 de Aviva Systems Biology) según el protocolo de fabricación. Brevemente, los sueros se diluyeron en serie con el diluyente de la muestra del kit hasta una dilución final de 10 000 veces. Esta muestra diluida se añadió a las placas de ELISA y el ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones.

[0237] El ADN genómico se aisló a partir de alrededor de 10 mg de tejido hepático y se analizó mediante el uso de NGS como se describió anteriormente. A continuación, se describen las secuencias de cebador de PCR para amplificación.

[0238] La Fig. 5A y Fig. 5B muestran que la reducción de TTR en suero y la edición en el hígado fueron suficientes en las formulaciones de 2 % molar y 3 % molar de PEG. La Fig. 5C muestra que la respuesta de MCP-1 se reduce mediante el uso de formulaciones de 3 % molar de PEG.

Ejemplo 5 – administración de LNP a primates no humanos

[0239] Se realizaron tres estudios con formulaciones de LNP preparadas como se describe en el Ejemplo 1. Las cantidades molares y las cargas particulares se presentan en las Tablas 12-26. Cada formulación que contenía el ARNm de Cas9 y ARNm guía (ARNg) tenía una relación ARNm:ARNg 1:1 en peso. En las Tablas se indican las dosis de LNP (en mg/kg, contenido total de ARN), la vía de administración y si los animales recibieron pretratamiento de dexametasona. En el caso de los animales que recibieron pretratamiento con dexametasona (Dex), la Dex se administró a 2 mg/kg mediante inyección IV en bolo, 1 hora antes de la administración del vehículo o LNP.

[0240] Para el análisis químico de sangre, la sangre se extrajo de animales en los momentos como se indica en las Tablas siguientes para cada factor que se midió. La inducción de citocinas se midió en NHP pre y post-tratamiento. Un mínimo de 0,5 mL de sangre entera se obtuvo de una vena periférica de animales sujetos y conscientes en un tubo separador de suero de 4 mL. Se permitió que la sangre se coagulara durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación a 2000 x g durante 15 minutos. Se tomaron alícuotas de suero en 2 microtubos de polipropileno de 120 µL cada uno y se almacenó entre -60 y -86 ° hasta el análisis. Para el análisis se utilizó un kit personalizado de citocinas U-Plex de primate no humano de Meso Scale Discovery (MSD). Se incluyeron los siguientes parámetros en el análisis INF-g, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, MCP-1 y TNF-a, con foco en IL-6 y MCP-1. Los reactivos y estándares del kit se prepararon de acuerdo con lo establecido en el protocolo del fabricante. Se utilizó suero NHP puro. Las placas se corrieron en una unidad de imagen sectorial MSD 6000 con análisis realizados con la versión 4012 del software MSD Discovery work bench.

[0241] Los niveles de complemento se midieron en animales pre y post-tratamiento mediante inmunoensayo enzimático. Se extrajo sangre entera (0,5 mL) de una vena periférica de animales sujetos y conscientes en un tubo que contenía 0,5 mL de k₂EDTA. La sangre se centrifugó a 2000 xg durante 15 minutos. Se tomaron alícuotas de plasma en 2 microtubos de polipropileno de 120 µL cada uno y se almacenó entre -60 y -86 ° hasta el análisis. Para el análisis se utilizó un kit Quidel MicroVue Complement Plus EIA (C3a -n.º de cat. A031) o (BB-n.º de cat. A027). Los reactivos y estándares del kit se prepararon de acuerdo con lo establecido en el protocolo del fabricante. Las placas se corrieron en un MSD Sector Imager 6000 a una densidad óptica de 450 nm. Los resultados se analizaron utilizando un ajuste de curva de 4 parámetros.

[0242] Los datos para la inducción de citocina y activación del complemento se proporcionan en las Tablas siguientes. “BLQ” significa por debajo del límite de cuantificación.

Tabla 12. Estudio 1.

Grupo de tratamiento	Relaciones molares (lípidos A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG, respectivamente)	N:P	Carga	Tamaño de la muestra (n)	Administración	Nivel de dosis, contenido total de ARN (mg/kg)	D E X
(1) TSS (vehículo)	n/c	n/c	n/c	3	Infusión IV	n/c	no
(2) LNP699 G502	45/44/9/2	4,5	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502	3	Infusión IV	3	no
(3) LNP688 G506	45/44/9/2	4,5	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:2); G000506	3	Infusión IV	3	no
(4) LNP689 G509	45/44/9/2	4,5	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:2); G000509	3	Infusión IV	3	no
(5) LNP690 G510	45/44/9/2	4,5	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:2); G000510	3	Infusión IV	3	no

Tabla 13. Estudio 2.

Grupo de tratamiento	Relaciones molares (lípidos A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG, respectivamente)	N:P	Carga	Tamaño de la muestra (n)	Administración	Nivel de dosis, contenido total de ARN (mg/kg)	DEX
(1) TSS (vehículo)	n/c	n/c		1	Bolo IV	n/c	sí
(2) TSS (vehículo)	n/c	n/c		1	Bolo IV	n/c	no
(3) LNP898 G502	45/44/9/2	4,5	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502	1	Infusión IV	3	sí
(4) LNP898 G502	45/44/9/2	4,5	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502	1	Infusión IV	3	no
(5) LNP897 G502	45/43/9/3	4,5	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502	1	Bolo IV	3	sí
(6) LNP897 G502	45/43/9/3	4,5	ARNm de Cas9 (SEQ ID	1	Bolo IV	3	no

			NO:2); G000502				
(7) LNP897 G502	45/43/9/3	4,5	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502	1	Infus ión IV	3	sí
(8) LNP897 G502	45/43/9/3	4,5	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502	1	Infus ión IV	3	no
(9) GFP LNP916	45/43/9/3	4,5	ARNm de eGFP (SEQ ID NO:)	1	Infus ión IV	6	sí
(10) GFP LNP916	45/43/9/3	4,5	ARNm de eGFP (SEQ ID NO:)	1	Infus ión IV	6	no

Tabla 14. Estudio 3.

Grupo de tratamiento	Relaciones molares (lípidos A, colesterol, DSPC y PEG2k- DMG, respectivamente)	N:P	Carga	Tamaño de la muestra (n)	admin istración	Nivel de dosis, contenido total de ARN (mg/kg)	DEX
(1) TSS	n/c	n/c	n/c	3	Bolo IV	n/c	no

(2) LNP1021 G502	50/38/9/3	6	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:1); G000502	3	Bolo IV	1	no
(3) LNP1021 G502	50/38/9/4	6	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:1); G000502	1	Bolo IV	1	sí
(4) LNP1022 G502	55/33/9/3	6	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:1); G000502	3	Bolo IV	1	no
(5) LNP1023 G502	45/43/9/3	4,5	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:1); G000502	3	Bolo IV	3	no
(6) LNP1024 G509	50/38/9/3	6	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:1); G000509	3	Bolo IV	1	no
(7) LNP1024 G509	50/38/9/4	6	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:1); G000509	1	Bolo IV	1	sí

(8) LNP1025 G509	55/33/9/3	6	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:1); G000509	3	Bolo IV	1	no
(9) LNP1021 G502	50/38/9/3	6	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:1); G000502	1	Bolo IV	3	no
(10) LNP1022 G502	50/38/9/3	6	ARNm de Cas9 (SEQ ID NO:1); G000502	1	Bolo IV	3	no

Tabla 15. Mediciones de IL-6 del Estudio 1.

Grupo de tratamiento	Antes de la extracción de sangre	6 horas	24 horas
(1) TSS (vehículo)	5,71 ± 2,70	29,1 ± 20,37	7,05 ± 3,49
(2) LNP699 G502	9,73 ± 8,34	1296,41 ± 664,71	5,43 ± 7,68
(3) LNP688 G506	16,83 ± 4,08	1749,47 ± 1727,22	38,57 ± 39,39
(4) LNP689 G509	18,11 ± 11,51	1353,49 ± 766,66	32,42 ± 18,40
(5) LNP690 G510	13,95 ± 1,85	11838 ± 17161,74	90,07 ± 96,02

Tabla 16. Mediciones de MCP-1 del Estudio 1.

Grupo de tratamiento	Antes de la extracción de sangre	6 horas	24 horas
(1) TSS (vehículo)	810,49 ± 178,27	1351,16 ± 397,31	745,25 ± 56,49
(2) LNP699 G502	842,31 ± 350,65	19298,49 ± 11981,14	2092,89 ± 171,21
(3) LNP688 G506	1190,79 ± 383,64	13500,17 ± 12691,60	1414,71 ± 422,43
(4) LNP689 G509	838,63 ± 284,42	14427,7 ± 8715,48	1590 ± 813,23
(5) LNP690 G510	785,32 ± 108,97	52557,24 ± 48034,68	6319,77 ± 983,37

Tabla 17. Complemento de mediciones de C3a del Estudio 1.

Grupo de tratamiento	Antes de la extracción de sangre	6 horas	día 7
(1) TSS (vehículo)	23,9 ± 11,95	25,51 ± 14,79	30,67 ± 18,36
(2) LNP699 G502	32,36 ± 11,29	94,33 ± 58,45	38,50 ± 12,69
(3) LNP688 G506	22,30 ± 1,73	127,00 ± 22,34	37,80 ± 6,86
(4) LNP689 G509	35,83 ± 21,94	174,00 ± 44,51	50,83 ± 21,92
(5) LNP690 G510	36,30 ± 8,21	163,00 ± 40,60	42,50 ± 12,44

Tabla 18. Complemento de mediciones de bb del Estudio 1.

Grupo de tratamiento	04-bb	Antes de la extracción de sangre	6 horas	día 7
(1) TSS (vehículo)	de Vaca	1,53 ± 0,19	3,37 ± 2,13	1,43 ± 0,71
(2) LNP699 G502	G502	1,45 ± 0,39	9,01 ± 5,28	1,57 ± 0,54
(3) LNP688 G506	G506	1,45 ± 0,78	11,78 ± 2,33	1,78 ± 0,84
(4) LNP689 G509	G509	1,95 ± 0,99	15,73 ± 2,23	2,83 ± 0,88
(5) LNP690 G510	G510	2,12 ± 0,44	13,57 ± 1,23	2,21 ± 0,72

Tabla 19. Mediciones de IL-6 del Estudio 2.

Grupo de tratamiento	Antes de la extracción de sangre	90 min	6 horas	24 horas	Día 7
(1) TSS (vehículo)	1,77	11,46	4,2	2,76	3,01
(2) TSS (vehículo)	5,23	18,11	20,36	13,2	6,36
(3) LNP898 G502	2,02	1305,75	1138,22	383,32	16,02
(4) LNP898 G502	2,34	37,19	91,59	14,11	3,07
(5) LNP897 G502	2,1	55,79	6,89	2,26	2,01
(6) LNP897 G502	6,8	10,1	44,72	5,4	2,01
(7) LNP897 G502	1,97	44,87	32,61	2,97	1,11
(8) LNP897 G502	3,14	37,68	73,41	8,58	2,22
(9) LNP916 GFP	1,6	BLQ	95,32	27,58	BLQ
(10) LNP916 GFP	2,43	BLQ	883,01	66,71	BLQ

Tabla 20. Mediciones de MCP-1 del Estudio 2.

Grupo de tratamiento	Antes de la extracción de sangre	90 min	6 horas	24 horas	Día 7
(1) TSS (vehículo)	312,12	197,24	145,36	177,02	403,82
(2) TSS (vehículo)	232,44	175,08	187,72	136,64	325,69
(3) LNP898 G502	249,1	2183,5	1814,64	1887,41	372,38
(4) LNP898 G502	349,51	430,49	5635,55	953,05	236,6
(5) LNP897 G502	492,3	989,98	409,08	302,97	506,82
(6) LNP897 G502	283,79	225,1	1141,08	484,59	259,46
(7) LNP897 G502	223,16	349,79	398,57	172,67	287,09

(8) LNP897 G502	584,42	853,51	3880,81	1588,46	692,99
(9) LNP916 GFP	325,84	BLQ	1189,97	2279,82	BLQ
(10) LNP916 GFP	175,47	BLQ	3284,16	2023,53	BLQ

Tabla 21. Complemento de mediciones de C3a del Estudio 2.

Grupo de tratamiento	Antes de la extracción de sangre	90 min	6 horas	24 horas	Día 7
(1) TSS (vehículo)	0,087	0,096	0,048	0,033	0,038
(2) TSS (vehículo)	0,369	0,311	0,146	0,1	0,106
(3) LNP898 G502	0,087	0,953	0,647	0,277	0,065
(4) LNP898 G502	0,099	0,262	0,123	0,049	0,044
(5) LNP897 G502	0,067	0,479	0,209	0,036	0,036
(6) LNP897 G502	0,141	0,433	0,34	0,11	0,074
(7) LNP897 G502	0,1	0,345	0,396	0,096	0,127
(8) LNP897 G502	0,261	0,458	0,409	0,244	0,313
(9) LNP916 GFP	0,149	BLQ	0,714	0,382	BLQ
(10) LNP916 GFP	0,117	BLQ	0,752	0,723	BLQ

Tabla 22. Complemento de mediciones de bb del Estudio 2.

Grupo de tratamiento	Antes de la extracción de sangre	90 min	6 horas	24 horas	Día 7
(1) TSS (vehículo)	0,087	0,096	0,048	0,033	0,038
(2) TSS (vehículo)	0,369	0,311	0,146	0,1	0,106
(3) LNP898 G502	0,087	0,953	0,647	0,277	0,065
(4) LNP898 G502	0,099	0,262	0,123	0,049	0,044
(5) LNP897 G502	0,067	0,479	0,209	0,036	0,036
(6) LNP897 G502	0,141	0,433	0,34	0,11	0,074
(7) LNP897 G502	0,1	0,345	0,396	0,096	0,127
(8) LNP897 G502	0,261	0,458	0,409	0,244	0,313
(9) LNP916 GFP	0,149	BLQ	0,714	0,382	BLQ

(10) LNP916 GFP	0,117	BLQ	0,752	0,723	BLQ
-----------------	-------	-----	-------	-------	-----

Tabla 23. Mediciones de IL-6 del Estudio 3.

Grupo de tratamiento	Antes de la extracción de sangre	90 min	6 horas	24 horas	Día 7
(1) TSS	1,89 ± 0,97	2,56 ± 1,41	0,90 ± 0,71	BLQ	0,08
(2) LNP1021 G502	210 ± 0,35	7,44 ± 5,16	6,94 ± 8,45	1,07 ± 1,11	1,76 ± 0,98
(3) LNP1021 G502	0,79	2,96	4,25	0,67	0,27
(4) LNP1022 G502	1,54 ± 1,32	20,42 ± 31,60	13,94 ± 10,10	0,98 ± 0,41	2,04 ± 0,65
(5) LNP1023 G502	2,92 ± 1,68	6,28 ± 7,18	6,06 ± 2,31	3,62 ± 4,68	2,00 ± 1,21
(6) LNP1024 G509	1,43 ± 0,62	2,64 ± 1,92	7,72 ± 11,96	0,45 ± 0,19	0,88 ± 0,79
(7) LNP1024 G509	1,35 ± 0,74	2,64 ± 2,35	1,71 ± 0,41	0,36 ± 0,58	0,51 ± 0,32
(8) LNP1025 G509	1,64	2,68	25,65	0,58	2,00
(9) LNP1021 G502	0,56	6,15	28,80	0,85	0,61
(10) LNP1022 G502	1,76	8,66	2907,86	11,26	1,72

Tabla 24. Mediciones de MCP-1 del Estudio 2.

Grupo de tratamiento	Antes de la extracción de sangre	90 min	6 horas	24 horas	Día 7
(1) TSS	204,01 ± 46,39	197,62 ± 19,54	310,84 ± 45,87	179,07 ± 20,77	234,61 ± 71,79
(2) LNP1021 G502	303,67 ± 36,37	337,63 ± 195,18	755,20 ± 581,45	339,75 ± 206,20	214,82 ± 40,81
(3) LNP1021 G502	229,30	358,10	3182,00	413,56	178,30
(4) LNP1022 G502	393,63 ± 187,81	467,72 ± 221,61	1852,94 ± 2199,66	497,12 ± 412,30	382,19 ± 67,27
(5) LNP1023 G502	213,72 ± 8,85	196,18 ± 62,81	1722,18 ± 1413,90	197,83 ± 74,01	156,16 ± 18,87
(6) LNP1024 G509	237,76 ± 96,36	210,37 ± 95,17	468,53 ± 250,42	22,32 ± 69,06	141,20 ± 71,90
(7) LNP1024 G509	207,36	183,07	1885,66	235,70	163,11
(8) LNP1025 G509	259,57 ± 112,98	299,21 ± 304,89	1193,10 ± 974,04	258,82 ± 88,53	219,86 ± 219,86
(9) LNP1021 G502	199,29	286,04	2001,23	197,57	196,44

(10)					
LNP1022	305,81	970,65	7039,06	8379,05	203,47
G502					

Tabla 25. Complemento de mediciones de C3a del Estudio 3.

Grupo de tratamiento	Antes de la extracción de sangre	90 min	6 horas	24 horas	Día 7
(1) TSS	42,47 ± 10,30	55,40 ± 13,58	29,30 ± 14,46	41,70 ± 23,65	27,43 ± 12,43
(2) LNP1021 G502	34,37 ± 0,50	86,50 ± 3,66	90,07 ± 4,85	56,60 ± 2,25	32,53 ± 0,93
(3) LNP1021 G502	34,30	128,00	93,30	33,40	28,20
(4) LNP1022 G502	41,55 ± 13,51	151,37 ± 109,98	82,00 ± 31,82	45,57 ± 18,58	32,77 ± 6,45
(5) LNP1023 G502	31,67 ± 3,19	74,40 ± 22,08	74,13 ± 48,61	33,83 ± 9,75	27,70 ± 8,05
(6) LNP1024 G509	56,60 ± 25,61	100,37 ± 77,95	74,73 ± 70,15	55,20 ± 48,34	49,97 ± 39,94
(7) LNP1024 G509	33,80	33,90	33,70	26,10	20,90
(8) LNP1025 G509	39,90 ± 13,01	75,73 ± 1,38	46,13 ± 30,56	25,00 ± 3,80	23,90 ± 7,18

(9)					
LNP1021	34	85,70	133,00	62,00	25,50
G502					
(10)					
LNP1022	29,8	68,10	113,00	71,70	23,30
G502					

Tabla 26. Complemento de mediciones de bb del Estudio 3.

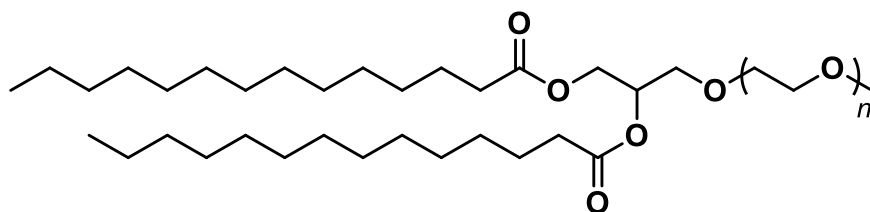
Grupo de tratamiento	Antes de la extracción de sangre	90 min	6 horas	24 horas	Día 7
(1) TSS	1,46 ± 0,70	2,18 ± 0,78	1,96 ± 0,64	0,945 ± 0,15	1,34 ± 0,50
(2) LNP1021 G502	1,77 ± 0,60	6,51 ± 3,66	11,00 ± 4,85	3,59 ± 2,25	2,07 ± 0,93
(3) LNP1021 G502	1,24	2,90	11,50	2,97	1,24
(4) LNP1022 G502	1,52 ± 0,34	5,67 ± 2,28	10,2 ± 3,36	3,66 ± 1,68	1,84 ± 0,24
(5) LNP1023 G502	1,65 ± 0,94	4,4 ± 1	7,68 ± 4,67	2,64 ± 1,18	2,08 ± 1,32
(6) LNP1024 G509	1,61 ± 0,13	4,52 ± 1,81	4,50 ± 3,22	1,63 ± 0,84	1,63 ± 0,32
(7) LNP1024 G509	0,96	2,99	2,64	1,13	1,07

(8)					
LNP1025					1,35 ±
G509	1,37 ± 0,17	4,9 ± 4,51	3,79 ± 3,84	1,66 ± 1,43	0,44
(9)					
LNP1021					
G502	1,41	5,67	11,50	4,64	1,38
(10)					
LNP1022					
G502	1,28	5,22	14,10	5,64	1,87

Ejemplo 6 – Selección de lípido de PEG

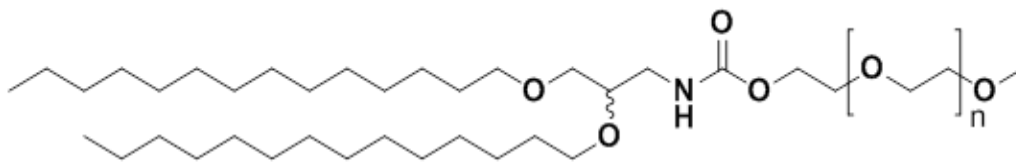
[0243] En otro estudio, se compararon los lípidos de PEG alternativos en formulaciones de LNP que comprendían 2 % molar o 3 % molar de lípido de PEG.

- 5 **[0244]** En el estudio se utilizaron tres lípidos de PEG: Lípido 1 (DMG-PEG2k; Nof), se representa como:



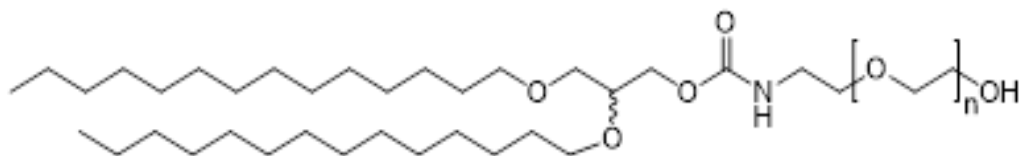
DMG-PEG

[0245] Lípido 2, sintetizado como se describe en Heyes, et ál., *J. Controlled Release*, 107 (2005), pp. 278-279 (véase “Synthesis of PEG2000-C-DMA”), puede representarse como:



PEG-C-DMA

y lípido 3, descrito en WO2016/010840 (véase el compuesto S027, párrafos [00240] a [00244]) y WO2011/076807, puede representarse como:



[0246] El lípido A se formuló con cada lípido de PEG a 2 % molar y 3 % molar. Los componentes de nanopartículas lipídicas se disolvieron en etanol al 100 % con las relaciones molares del componente lipídico establecidas anteriormente. Brevemente, las cargas de ARN se prepararon en amortiguador de citrato 25 mM, NaCl 100 mM, pH 5,0, lo cual dio como resultado una concentración de carga de ARN de aproximadamente 0,45 mg/mL. Las LNP se formularon con una relación molar entre amina lipídica y fosfato ARN (N:P) de alrededor de 4,5, con la relación entre ARNm y ARNg de 1:1 en peso.

Tabla 27.

N.º de LNP	LNP 784	LNP 785	LNP 786	LNP 787	LNP 788	LNP 789
CL/col./DSPC/PEG (% molar teórico)	45/44/9/2	45/43/9/3	45/44/9/2	45/43/9/3	45/44/9/2	45/43/9/3
ARNm	Cas9 SEQ ID NO:48	Cas9 SEQ ID NO: 48	Cas9 SEQ ID NO:48	Cas9 SEQ ID NO: 48	Cas9 SEQ ID NO:48	Cas9 SEQ ID NO: 48
ARNg	G282 SEQ ID NO: 42	G282 SEQ ID NO: 42	G282 SEQ ID NO: 42	G282, SEQ ID NO:42	G282, SEQ ID NO:42	G282 SEQ ID NO: 42
Tipo PEG	Lípido 1	Lípido 1	Lípido 2	Lípido 2	Lípido 3	Lípido 3
N/P	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

[0247] El ARNm de Cas9, sg282 y las LNP se prepararon tal como se describe en el Ejemplo 1.

[0248] Las composiciones de LNP con lípidos 1, 2 o 3 se administraron a ratones CD-1 hembra y se evaluaron como se describe en el Ejemplo 1 a 1 mg/kg y 0,5 mg/kg de peso corporal. Las cohortes de ratones se midieron para la edición en el hígado mediante la secuenciación de próxima generación (NGS) y los niveles de TTR en suero de acuerdo con los métodos del Ejemplo 1.

[0249] La Fig. 6A y Fig. 6B comparan los niveles de TTR en suero entre las formulaciones de lípidos de PEG. La Fig. 6A muestra TTR en suero en µg/mL y la Fig. 6B muestra los datos como un porcentaje

de reducción (%TSS). La Fig. 6C muestra el porcentaje de edición logrado en el hígado. Los datos indican que las composiciones de LNP con cada uno de los lípidos de PEG probados, demostraron potencia a 2 % molar y 3 % molar, con un rendimiento constante del lípido 1 ligeramente mejor que el lípido 2 y el lípido 3.

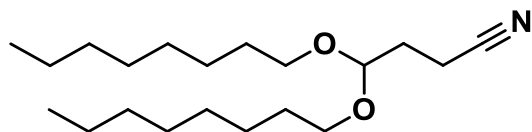
5 Ejemplo 7 – análogos del lípido A

[0250] Se sintetizaron y probaron varios análogos estructurales del lípido A en las composiciones de LNP descritas en la presente.

[0251] Síntesis: El lípido A se produce al hacer reaccionar el ácido 4,4-bis(octiloxibutanoico) (“Intermedio 13b” en el Ejemplo 13 de WO2015/095340) con octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-hidroxi-2-(hidroximetil)propilo (“Intermedio 13c”), antes de la adición del grupo de cabeza al hacer reaccionar el producto del intermedio 13b y el intermedio 13c con 3-dietilamino-1-propanol (véanse pp. 84-86 de WO2015/095340).

[0252] El Intermediario 13b de WO2015/095340 (ácido 4,4 bis(octiloxi)butanoico) se sintetizó a través de 4,4-bis(octiloxi)butanonitrilo de la siguiente manera:

15 **[0253]** Intermedio 13a: 4,4-bis(octiloxi)butanonitrilo

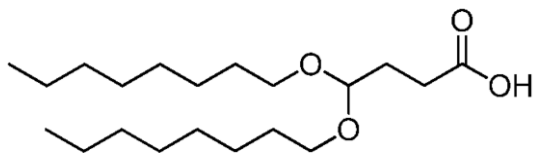


[0254] A una mezcla de 4,4-diethoxibutanonitrilo (9,4 g, 60 mmol) y octan-1-ol (23,1 g, 178 mmol) se le agregó *p*-toluenosulfonato de piridinio (748 mg, 3,0 mmol) a t.a. La mezcla se calentó hasta 105 °C y se agitó durante 18 horas con el recipiente de reacción abierto al aire y no equipado con un condensador de reflujo. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se purificó en gel de sílice (gradiente de 0-5 % de acetato de etilo en hexanos) para proporcionar 10,1 g (31,0 mmol) del Intermedio 13a como aceite transparente. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,55 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H), 3,60 (dt, *J* = 9,2, 6,6 Hz, 2H), 3,43 (dt, *J* = 9,2, 6,6 Hz, 2H), 2,42 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,94 (td, *J* = 7,4, 5,3 Hz, 2H), 1,63 – 1,50 (m, 4H), 1,38 – 1,19 (m, 20H), 0,93 – 0,82 (m, 6H) ppm.

[0255] A continuación, a una solución del Intermedio 13a (8,42 g, 31 mmol) en etanol (30 mL) se le agregaron 31 mL de hidróxido de potasio acuoso (2,5 M, 30,9 mL, 77,3 mmol) a temperatura ambiente. Al equipar el recipiente con un condensador de reflujo, la mezcla se calentó hasta 110 °C y se agitó durante

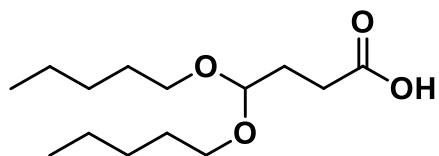
24 horas. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, se acidificó con ácido clorhídrico acuoso (1N) a pH 5 y se extrajo en hexanos tres veces. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (dos veces) y salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, y se concentraron al vacío para proporcionar 8,15 g (23,6 mmol) del Intermedio 13b como aceite transparente, que se utilizó sin purificación adicional. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4,50 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 3,57 (dt, $J = 9,4$, 6,7 Hz, 2H), 3,41 (dt, $J = 9,3$, 6,7 Hz, 2H), 2,40 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,92 (td, $J = 7,4$, 5,3 Hz, 2H), 1,56 (m, 4H), 1,37 – 1,21 (m, 20H), 0,92 – 0,83 (m, 6H) ppm (estructura a continuación).

[0256] Intermedio 13b



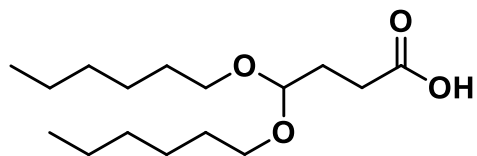
[0257] Mediante el uso de los métodos descritos anteriormente, los intermedios del ácido C(5, 6, 7, 9 y 10)-acetal, llamados Intermedios B3-F3 y descritos a continuación, se prepararon mediante el uso de los reactivos de alcan-1-ol apropiados.

[0258] Intermedio B3 ácido 4,4-bis(pentiloxi)butanoico



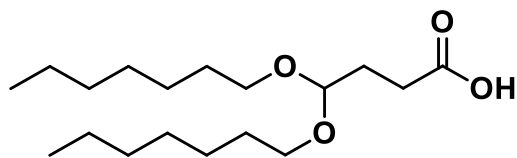
[0259] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4,52 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 3,58 (dt, $J = 9,3$, 6,6 Hz, 2H), 3,41 (dt, $J = 9,3$, 6,7 Hz, 2H), 2,45 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,94 (m, 2H), 1,57 (m, 4H), 1,32 (m, $J = 3,7$ Hz, 8H), 0,95 – 0,83 (m, 6H) ppm.

[0260] Intermedio C3: Ácido 4,4-bis(hexiloxi)butanoico



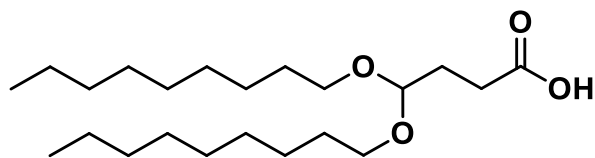
[0261] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4,44 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 3,49 (dt, $J = 9,3$, 6,9 Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3$, 6,8 Hz, 2H), 2,12 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,79 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,54 (m, 4H), 1,29 (m, 12H), 0,94 – 0,82 (m, 6H) ppm.

[0262] Intermedio D3: Ácido 4,4-bis(heptiloxi)butanoico



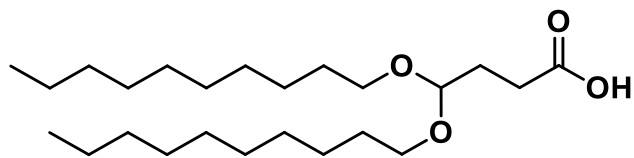
[0263] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,85 (br s, 1H), 4,46 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 3,52 (dt, $J = 9,4, 6,8$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,8$ Hz, 2H), 2,26 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,85 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,53 (m, 4H), 1,29 (m, 16H), 0,94 – 0,80 (m, 6H) ppm.

5 **[0264]** Intermedio E3: Ácido 4,4-bis(noniloxi)butanoico



[0265] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5,32 (br s, 1H), 4,44 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 3,49 (dt, $J = 9,3, 6,9$ Hz, 2H), 3,38 (dt, $J = 9,4, 6,9$ Hz, 2H), 2,10 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,78 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,53 (m, 4H), 1,27 (m, 24H), 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz, 6H) ppm.

10 **[0266]** Intermedio F3: Ácido 4,4-bis(deciloxi)butanoico



[0267] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 3,55 (m, 2H), 3,42 (m, 2H), 2,29 (dd, $J = 10,8, 7,5$ Hz, 2H), 1,90 – 1,82 (m, 2H), 1,55 (m, 4H), 1,27 (m, 28H), 0,88 (t, $J = 6,7$ Hz, 6H) ppm

[0268] Los análogos de acetal del lípido A (C(8)) se sintetizaron al hacer reaccionar los intermedios (B3-F3) de ácido acetal C(5, 6, 7, 9, o 10) con el Intermedio 13c, antes de hacer reaccionar el producto de esa etapa con 3-dietilamino-1-propanol. (véanse pp 84-86 de WO2015/095340). Cada análogo se sintetizó y caracterizó mediante ^1H NMR (datos no mostrados).

[0269] Los análogos C7, C9 y C10 se formularon a 45 % molar de análogo de lípido A, 2 % molar de DMG-PEG2k, 9 % molar de DSPC y 44 % molar de colesterol, con una relación entre N:P de 4,5. Cada análogo también se formuló a 55 % molar de análogo de lípido A, 2,5 % molar de DMG-PEG2k, 9 % molar de DSPC, y 38,5 % de molar colesterol, con una relación entre N:P de 6. Los componentes de nanopartículas lipídicas se disolvieron en etanol al 100 % con las relaciones molares del componente lipídico establecidas anteriormente. Las cargas de ARN se prepararon en amortiguador de citrato 25 mM, NaCl 100 mM, pH 5,0, lo cual dio como resultado una concentración de carga de ARN de aproximadamente 0,45 mg/mL.

[0270] La carga de ARN incluía el ARNm de Cas9 que comprende la SEQ ID NO:43 y sg282, preparado como se describió anteriormente. Las LNP se formaron como se describe en el Ejemplo 1.

[0271] Junto con el panel anterior, se ensayó un panel ampliado de análogos de acetal, que incluía composiciones de LNP que comprendían los análogos de lípido A C(5) y C(6). Los dos nuevos análogos se formularon a 55 % molar de análogo de lípido A, 2,5 % molar de DMG-PEG2k, 9 % molar de DPSC, y 33,5 % de molar colesterol, con una relación entre N/P de 6, como se describió anteriormente. Los análisis indicaron que los tamaños de todas las LNP son inferiores a 120 nm, la PDI es inferior a 0,2 y el % de ARN encapsulado es superior al 80 %. Los resultados analíticos para las formulaciones se encuentran en la Tabla 28 a continuación.

Tabla 28.

Identificador de LNP	Análogos de lípido A	% molar del análogo	% de PEG	N/P	ARN Conc. (mg/mL)	% EE	Prom. Z (nm)	PDI	Promedio numérico (nm)
LNP 1122	Análogo C5 (LP000030-001)	55	2,5	6	0,063	88	118,8	0,103	88,17
LNP 1123	Análogo C6 (LP000031-001)	55	2,5	6	0,067	95	107,6	0,038	88,1
LNP 1004	Análogo C7 (LP000020-001)	55	2,5	6	0,068	98	100	0,012	81,55
LNP 1002	LP000001-011	55	2,5	6	0,067	98	95,06	0,01	78,95
LNP 1006	Análogo C9 (LP000021-001)	55	2,5	6	0,067	97	95,43	0,022	80,35

LNP 1008	Análogo C10 (LP000022- 001)	55	2,5	6	0,069	95	103,9	0,008	86,79
---------------------	--------------------------------------	----	-----	---	-------	----	-------	-------	-------

[0272] Se evaluaron los análogos para detectar la pKa mediante el uso de ácido 6-(p-toluidino)-6-naptaleno sulfónico (“TNS”) disuelto en agua. En este ensayo se preparó un amortiguador de fosfato 0,1 M con diferentes valores de pH entre 4,5 y 10,5. Cada análogo se preparó individualmente en etanol al 100 %. Los lípidos y TNS se añadieron en amortiguador de pH individual y se transfirieron a una placa para analizarlos a una longitud de onda de 321-488 nm en el lector de placas SpectraMax. Los valores se graficaron para generar la pKa, se usa logIC₅₀ como pKa.

[0273] A ratones CD-1 hembra se les administraron dosis como se describe en el Ejemplo 1 con 0,3 mg/kg (Fig. 7A-Fig. 7E), o con 0,1 mg por kg (Fig. 7F-Fig. 7G). En resumen, a ratones CD-1 hembra de Charles River Laboratories, n=5 por grupo, se les administraron las composiciones de LNP a dosis variables. En la necropsia (7 días después de la dosis), se recolectó suero para el análisis de TTR y se recogió el hígado para el análisis de edición. Los ensayos de TTR en suero y porcentaje de edición se realizaron como se describe en el Ejemplo 1. Los niveles de TTR en suero y la edición en el hígado de la Fig. 7A-Fig. 7E indican que todos los análogos tuvieron rendimientos similares al lípido A a 0,3 miligramos por kilogramo de peso corporal. Las Fig. 7F-Fig. 7G indican que, si bien el lípido A tenía la potencia más alta, los análogos recién sintetizados tienen todos un nivel edición en el hígado y atenuación de TTR adecuado.

Ejemplo 8 – curva de respuesta a la dosis – hepatocitos primarios de cynomolgus

[0274] *Hepatocitos hepáticos primarios.* Los hepatocitos hepáticos primarios de cynomolgus (PCH) (Gibco) se descongelaron y resuspendieron en medio de descongelación de hepatocitos con suplementos (Gibco, n.º de cat. CM7000) seguido de centrifugación a 80 g durante 4 minutos. El sobrenadante fue descartado y las células sedimentadas se resuspendieron en medio de colocación en placas de hepatocitos más un paquete de suplementos (Invitrogen, n.º de cat. A1217601 y CM3000). Las células se contaron y se colocaron en placas de 96 pocillos recubiertas de colágeno I Bio-Coat (ThermoFisher, n.º de cat. 877272) a una densidad de 50 000 células/pocillo. Se permitió que las células en las placas se asentaran y se adhirieran durante 24 horas en una incubadora de cultivo tisular (37 °C y atmósfera de 5 % de CO₂) antes de la administración de las LNP. Tras comprobar la formación de monocapa en las células de

incubación, se sustituyó el medio por medio de cultivo de hepatocitos con un paquete de suplementos libre de suero (Invitrogen, n.º de cat. A1217601 y CM4000).

[0275] Las formulaciones de LNP para este estudio (LNP1021, LNP1022, LNP1023, LNP1024, LNP1025 y LNP897) se prepararon como se describió anteriormente.

5 **[0276]** Se analizaron varias dosis de formulaciones de nanopartículas lipídicas que contenían ARNg modificados en hepatocitos primarios de cynomolgus para generar una curva de respuesta a la dosis. Después de la siembra y 24 horas en cultivo, las LNP se incubaron en medios de mantenimiento de hepatocitos que contenían suero de cynomolgus al 6 % a 37 °C durante 5 minutos. Después de la incubación, se añadieron LNP a los hepatocitos primarios de cynomolgus en una curva de respuesta de
10 dosis de 8 puntos y 2 veces, comenzando con 100 ng de ARNm. Las células se lisaron 72 horas después del tratamiento para el análisis de NGS, como se describe en el Ejemplo 1. Se determinó el porcentaje de edición para varias composiciones de LNP y los datos se representan en la Fig. 8A. En la Fig. 8B se presenta el % de edición con ARNm de Cas9 (SEQ ID NO 48) y ARNm de Cas9 con U agotado (SEQ I NO:43). Las composiciones de LNP se describen en la Tabla 2 (LNP 897) y en la Tabla 5 (LNP 1021,
15 1022, 1023, 1024 y 1025).

[0277] Los resultados muestran un ensayo cuantitativo para evaluar la potencia comparativa, lo cual demuestra que tanto el ARNm como la composición del LNP afectan la potencia.

Ejemplo 9 – carga de ARN: Coformulaciones de ARNm y ARNg

[0278] En este estudio se evaluó la eficacia *in vivo* en ratones con diferentes relaciones de ARNg y ARNm. Se elaboraron ARNm de Cas9 con casquetes CleanCap™ con el ORF de la SEQ ID NO:4, UTR
20 5' de HSD, UTR 3' de albúmina humana, una secuencia de Kozak y una cola poli-A mediante la síntesis de IVT, como se indica en el Ejemplo 1 con trifosfato de N1-metiluridina en lugar de trifosfato de uridina.

[0279] Formulaciones de LNP preparadas a partir del ARNm descrito y sg282 (SEQ ID NO: 42; G282) como se describe en el Ejemplo 2 con lípido A, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar
25 de 50:38:9:3 y con una relación entre N:P de 6. Las relaciones en peso de ARNg:ARNm de Cas9 de las formulaciones fueron como se muestra en la Tabla 29.

Tabla 29.

Identif icador de LNP	Relació n Guía : ARNm	Conc. de ARN (mg/mL)	EE (%)	Promedio Z	PDI de partícula s	Promedio en número (nm)
--------------------------------	--------------------------------	----------------------------	------------	---------------	--------------------------	----------------------------------

	de Cas9 (p/p)			Tamaño (nm)		
1110	8:1	0,92	99	69,52	0,022	56,47
1111	4:1	0,86	97	76,65	0,065	57,36
1112	2:1	0,90	99	76,58	0,036	63,11
1113	1:1	0,97	99	76,60	0,071	58,92
1114	1:2	1,05	99	76,34	0,018	62,82
1115	1:4	0,65	99	82,64	0,018	66,63
1116	1:8	0,75	100	82,01	0,039	65,05

[0280] Para la caracterización *in vivo*, las LNP anteriores se administraron a ratones a 0,1 mg de ARN total (mg de ARN guía + mg de ARNm) por kg (n=5 por grupo). A los 7 a 9 días posteriores a la dosis, se sacrificaron animales, se recolectaron sangre y el hígado, y se midieron TTR en suero y la edición en el hígado como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados de TTR en suero y de edición en el hígado se muestran en la Fig. 9A y 9B. A los ratones de control negativo se les administraron dosis de vehículo TSS.

[0281] Además, las LNP anteriores se administraron a ratones con una dosis constante de ARNm de 0,05 mg de ARNm por kg (n=5 por grupo), variando la dosis de ARNg de 0,06 mg por kg a 0,4 mg por kg. A los 7 a 9 días posteriores a la dosis, se sacrificaron animales, se recolectaron sangre y el hígado, y se midieron TTR en suero y la edición en el hígado. Los resultados de TTR en suero y de edición en el hígado se muestran en la Fig. 9C y Fig. 9D. A los ratones de control negativo se les administraron dosis de vehículo TSS.

Ejemplo 10 – lípidos neutros

[0282] Para evaluar la eficacia *in vivo* de las LNP, se prepararon formulaciones de LNP con el ARNm del Ejemplo 2 y sg534 (SEQ ID NO: 72; G534), tal como se describe en el Ejemplo 2. Los componentes de nanopartículas lipídicas se disolvieron en etanol al 100 % con las relaciones molares del componente lipídico establecidas a continuación. Brevemente, las cargas de ARN se prepararon en un amortiguador

de citrato 25 mM y NaCl 100 mM con pH 5,0, lo cual dio como resultado una concentración de carga de ARN de aproximadamente 0,45 mg/mL. Las LNP se formularon con una relación molar entre amina lipídica y fosfato ARN (N:P) de alrededor de 6, con la relación entre ARNg y ARNm de 1:2 en peso.

[0283] Las formulaciones de LNP se analizaron para verificar el tamaño de partícula promedio, la polidispersidad (pdi), contenido total de ARN y eficiencia de encapsulación de ARN como se describió en el Ejemplo 1. El análisis del tamaño promedio de partícula, la polidispersidad (PDI), el contenido total de ARN y la eficacia de encapsulación del ARN se muestran en la Tabla 30. Las relaciones molares de lípido se proporcionan como lípido de amina (lípido A)/lípido neutro/lípido auxiliar (colesterol)/lípido de PEG (PEG2k-DMG). El lípido neutro fue DSP, DPPC, o estaba ausente, según lo especificado.

10 **Tabla 30. Composiciones y datos de LNP. (Las relaciones molares de lípido se proporcionan como lípido de amina (lípido A)/lípido neutro/lípido auxiliar (colesterol)/lípido de PEG (PEG2k-DMG).)**

Identificador de muestra	Lípido neutro	Relaciones molares	ARN Conc. (mg/mL)	% EE	Prom. Z (nm)	PDI	Promedio numérico (nm)	% de edición en hígado	TTR en suero (µg/mL)	% TTR KD
Control con TSS								0,0	1248,9	
CO241	-	50,0/0,0/47,0/3,0	1,46	94	75,64	0,090	54,21	1,8	1070,2	14,3
CO242	-	59,0/0,0/38,0/3,0	1,51	94	92,25	0,019	75,56	12,0	819,6	34,4
CO243	-	54,5/0,0/42,5/3,0	1,62	94	78,90	0,052	61,49	3,3	1260,5	-0,9
CO244	DSPC	50,0/9,0/39,0/2,0	1,50	93	101,3	0,044	80,73	27,4	741,0	40,7
CO034	DSPC	50,0/9,0/38,0/3,0	1,48	97	84,23	0,040	66,96	34,2	630,1	49,6

CO245	DSPC	52,5/4,0/ 42,5/3,0	1,55	95	81,88	0,054	64,54	5,8	846,6	32,2
CO246	DPPC	50,0/9,0/ 38,0/3,0	1,52	96	87,11	0,040	70,04	35,9	528,6	57,7
CO247	DPPC	52,5/4,0/ 42,5/3,0	1,54	97	83,67	0,050	66,43	18,3	726,6	41,8

[0284] Para la caracterización *in vivo*, las LNP anteriores se administraron por vía intravenosa a ratas Sprague Dawley hembra a 0,3 mg de ARN total (ARN guía y ARNm) por kg de peso corporal. Había cinco ratas por grupo. A los siete días posteriores a la dosis, se sacrificaron animales, se recolectaron sangre y el hígado, y se midieron TTR en suero y la edición en el hígado como se describe en el Ejemplo 1. A los animales de control negativo se les administraron dosis de vehículo TSS. Los resultados de TTR en suero y de edición en el hígado se muestran en la Fig. 10A y 10B, y en la Tabla 30 (anterior).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS DESCRITAS

SEQ ID NO	Descripción
1	Secuencia codificante de ADN de Cas9 mediante el uso del análogo de timidina de los codones de uridina mínima enumerados en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación
2	Secuencia codificante de ADN de Cas9 mediante el uso de codones con una expresión generalmente alta en seres humanos
3	Secuencia de aminoácidos de Cas9 con una señal de localización nuclear (1xNLS) como los 7 aminoácidos del extremo C
4	ORF de ARNm de Cas9 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación
5	ORF de ARNm de Cas9 mediante el uso de codones con una expresión generalmente alta en seres humanos, con codones de inicio y terminación
6	Secuencia de aminoácidos de nickasa Cas9 con 1xNLS como los 7 aminoácidos del extremo C

7	ORF de ARNm de nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 6 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación
8	Secuencia de aminoácidos de dCas9 con 1xNLS como los 7 aminoácidos del extremo C
9	ORF de ARNm de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 8 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación
10	Secuencia codificante de ARNm Cas9 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)
11	Secuencia codificante de ARNm de nickasa Cas9 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)
12	Secuencia codificante de ARNm dCas9 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)
13	Secuencia de aminoácidos de Cas9 (sin NLS)
14	ORF de ARNm de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 13 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación
15	Secuencia codificante de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 13 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)
16	Secuencia de aminoácidos de nickasa Cas9 (sin NLS)

17	ORF de ARNm de nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 16 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación
18	Secuencia codificante de nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 16 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)
19	Secuencia de aminoácidos de dCas9 (sin NLS)
20	ORF de ARNm de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 13 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación
21	Secuencia codificante de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 13 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)
22	Secuencia de aminoácidos de Cas9 con dos señales de localización nuclear (2xNLS) como los aminoácidos del extremo C
23	ORF de ARNm de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 13 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación
24	Secuencia codificante de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 13 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)
25	Secuencia de aminoácidos de nickasa Cas9 con dos señales de localización nuclear como los aminoácidos del extremo C
26	ORF de ARNm de nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 16 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación
27	Secuencia codificante de nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 16 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en

	la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)
28	Secuencia de aminoácidos de dCas9 con dos señales de localización nuclear como los aminoácidos del extremo C
29	ORF de ARNm de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 13 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación
30	Secuencia codificante de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 13 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)
31	Promotor T7
32	UTR 5' de beta-globina humana
33	UTR 3' de beta-globina humana
34	UTR 5' de alfa-globina humana
35	UTR 3' de alfa-globina humana
36	UTR 5' de <i>Xenopus laevis</i>
37	UTR 3' de <i>Xenopus laevis</i>
38	UTR 5' de hormona bovina del crecimiento
39	UTR 3' de hormona bovina del crecimiento
40	UTR 3' de hemoglobina alfa cadena adulta 1 (Hba-a1) de <i>Mus musculus</i>
41	UTR 5' de HSD17B4
42	ARN guía simple de G282 dirigido al gen TTR de ratón
43	Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB
44	Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 4 y UTR 3' de ALB
45	ORF de Cas9 alternativo con contenido de U del 19,36 %

46	Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 45, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB
47	Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 45 y UTR 3' de ALB
48	Transcripto de Cas9 que comprende ORF de Cas9 mediante el uso de codones con una expresión generalmente alta en seres humanos
49	Transcripto de Cas9 que comprende una secuencia de Kozak con ORF de Cas9 mediante el uso de codones con una expresión generalmente alta en seres humanos
50	ORF de Cas9 con uniones de empalme retiradas; contenido en U del 12,75 %
51	Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 50, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB
52	ORF de Cas9 con codones de uridina mínima utilizados frecuentemente en seres humanos en general; contenido de U del 12,75 %
53	Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 52, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB
54	ORF de Cas9 con codones de uridina mínima utilizados con poca frecuencia en seres humanos en general; contenido de U del 12,75 %
55	Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 54, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB
56	Transcripto de Cas9 con AGG como los tres primeros nucleótidos para su uso con CleanCap™, UTR 5' de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB
57	Transcripto de Cas9 con UTR 5' de CMV, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB
58	Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HBB, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de HBB
59	Transcripto de Cas9 con UTR 5' de XBG, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de XBG

60	Transcripto de Cas9 con AGG como los tres primeros nucleótidos para su uso con CleanCap™, UTR 5' de XBG, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de XBG
61	Transcripto de Cas9 con AGG como los tres primeros nucleótidos para su uso con CleanCap™, UTR 5' de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB
62	Secuencia de poli-A 30/30/39
63	Secuencia 100 de poli-A
64	ARN guía simple de G209 dirigido al gen TTR de ratón
65	ORF que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación
66	ORF que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)
67	Transcripto que comprende la SEQ ID NO: 65 (que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis)
68	Secuencia de aminoácidos de Cas9 de Neisseria meningitidis
69	ARN guía simple de G390 dirigido al gen TTR de rata
70	ARN guía simple de G502 dirigido al gen TTR de mono cynomolgus
71	ARN guía simple de G509 dirigido al gen TTR de mono cynomolgus
72	ARN guía simple de G534 dirigido al gen TTR de rata

[0285] Véase la tabla de secuencias que aparece a continuación para ver las secuencias en sí mismas. Las secuencias de transcripto generalmente incluyen GGG como los tres primeros nucleótidos para uso con ARCA o AGG como los tres primeros nucleótidos para uso con CleanCap™. En consecuencia, los tres primeros nucleótidos pueden modificarse para su uso con otros abordajes de formación de casquetes, tal como la enzima de formación de casquetes Vaccinia. Los promotores y las secuencias poli-A no se incluyen en las secuencias de transcripto. Un promotor, tal como un promotor T7 (SEQ ID NO: 31) y una secuencia poli-A, tal como la SEQ ID NO: 62 o 63, pueden adjuntarse a las secuencias de transcripto

descritas en los extremos 5' y 3', respectivamente. La mayoría de las secuencias de nucleótidos se proporcionan como ADN, pero pueden convertirse fácilmente a ARN al cambiar la T por U.

Tabla de secuencias

[0286] La siguiente tabla de secuencias proporciona una lista de secuencias descritas en la presente. Se entiende que si se hace referencia a una secuencia de ADN (que comprende T) con respecto a un ARN, entonces la T debe ser reemplazada por U (que puede ser modificada o no modificada dependiendo del contexto), y viceversa.

Descripción	Secuencia	SEQ ID No.
Secuencia 2 codificante de ADN de Cas9	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAA CAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATA CAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAAC ACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAG CACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAG AAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTC AGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCC ACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAA GAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTC GACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCT ACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAA GGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACAC ATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAG ACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTT CATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAG AAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGC AATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTG GAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGA ACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG ACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCA GAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACG ACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGA	1

	CCAGTACGCAGACCTGTTCTCCTGGCAGCAAAGAACCTG AGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCA ACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCAT GATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACA CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAA AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGG ATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAA GAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT GGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGA GAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACG GAAGCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCA CGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCC TGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGAC ATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGA AGAAACAATCACACCGTGGAAC TTCGAAGAAGTCGTC GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAA TGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGT CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAG TCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGA AGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAG AAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACA GAAAGGTACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTT CAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGC GGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACAT ACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTT CCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC ATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAAT GATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTC GACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGAT ACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAA	
--	--	--

	CGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG GACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAACT TCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAG GAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAG ACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAG CCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAG GTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACA AGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAA CCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGA AAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACT GGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAAC ACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTG GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACA TCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGAC AACAAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGA AAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGA AGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAA GCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAG GCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCA GGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGA TCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGA GAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCA GCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGA GAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACC TGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTA CCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTAC AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTT CTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCA	
--	--	--

	CACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGAC AAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGA GCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGT CCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCG AAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAG GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCC CGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTC GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAG GAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCT TCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGG ATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTG CCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAA AGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGG AAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTC CTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTGCA ACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAG ATCAGCGAATTTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCA CAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGC AGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAG AGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACAC TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGA AGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG	
Secuencia 1 codificante de ADN de Cas9	ATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAA CTAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATAC AAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACA CCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGC	2

	CCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCC GGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCG GAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGA ACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACCG CCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAG CATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGA AGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATC TGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGA CCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCA AATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAAC CCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAACT GGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCTGAAGAAAACCCA ATCAATGCTAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTC CGCCCGGCTGTCTGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTG ATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTT TCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCC AATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAA GCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTG GACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGG ATCTGTTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATC TTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAAC CAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACG ACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTC GTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCT TCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATC GATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCA TCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGA ACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGG AAACAGAGAACCTTTGACAACGGATCCATTCCCCACCA GATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCC AGGAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCGGGA	
--	---	--

	AAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATT ACGTGGGCCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCG TGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTT GGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGC ACAAAGCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAG AATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCT CCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTA AAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGC CTTTCTGTCCGGAGAACAGAAGAAAGCAATTGTCGATC TGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCA GCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCG ACTCAGTGGAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAA CGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCA TCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGA GGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTT TCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGAC CTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAAC TCAAGCGCCGCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCC CGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCG GTAAACTATCCTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTC GCTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACAG CCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAGCACAAGTG TCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGA ATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTG CAAACGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGTCA TGGGACGGCACAACCGGAGAATATCGTGATTGAAAT GGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAA AACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAA TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCC GGTGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTAC CTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGA	
--	---	--

	CCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACG TGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGAC TCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGA ACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGT CGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTG AATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAAGTTTGACAATCT CACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGAT AAGGCTGGATTTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTC GGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGGACTCC CGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCA TCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAAC TGTGTCGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAG TGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGC ATACCTCAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAA AGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGAC TACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGT CCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAAACCTGCGAAATACTT CTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACTGAAA TTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACT GATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTGG GACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAAAGTGC TCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAA GTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCC AAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAA GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGATTTCG CGACTGTCGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTG GAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAG AGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTC GAGAAGAACCCGATTGATTTCTCGAGGCGAAGGGTT ACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACCTCCC CAAGTACTCACTGTTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAG	
--	--	--

	CGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAA ATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTC TATCTTGCTTCGCACTACGAAAACTCAAAGGGTCACC GGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAG CACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTC CGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACC TCGACAAAGTCCTGTCTGGCCTACAATAAGCATAGAGAT AAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACT TGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTC AAGTACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAGATACAC GTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACC AAAGCATCACTGGACTCTACGAACTAGGATCGATCTG TCGCAGCTGGGTGGCGATGGCGGTGGATCTCCGAAAA AGAAGAGAAAGGTGTAATGA	
Secuencia de aminoácidos de Cas9:	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTD RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYAL AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE NPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDAEDAKLQLSKDTYDDDLDN LLAQIGDQYADLFLAAKNLSAAILLSDILRVNTEITKAPLS ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT	3

	YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ GDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE EG I KELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS DYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSE EVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR EVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLN AVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG EIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLV VAK VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELAL PSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLD EIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKH RD KPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIH QSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV	
Marco de lectura abierto (ORF) 2 de ARNm de Cas9	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGA ACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAA UACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGA AACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUC GGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAA GCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUAC ACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAA GAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AACAU CGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUAC	4

CCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGAC AGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUG GCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUC CUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGAC GUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUG AGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAG CUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAC CUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCA AGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGC AGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACA ACCUGCUGGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGCAGACCU GUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCU GCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAU CGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCA CUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAA AUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAA UCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGA AGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGA UCCUGACAU UCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAG GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAA GAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA	
---	--

	AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACU UCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACG UCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCG GAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCA AGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG AAGACUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCG UCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAA GCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCA AGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAG ACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU UCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGA CAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGC AGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGAC UGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGC AGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCG ACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGA AGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACG AACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCA GAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGA ACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAA CAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAA GAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCA GAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCU GCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAU CAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACA AGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGA	
--	---	--

UGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGC UGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGG CAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAG GAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGA UCACAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAA UGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCA GAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGG UCAGCGACUUCAGAAAGGACU UCCAGUUCUACAAGG UCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGC AUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGG AGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGC AAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAA GUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUCAA GACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAA GAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGA AAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGU CAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGU CAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU GAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUA CGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUC CUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAG AAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACA AUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUC GACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUG UUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCA AGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAA GCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACA	
--	--

	ACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGC ACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAAGCGAAU UCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACA AGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAU UCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAU ACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGA UCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAA UCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAA GCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAG	
ORF 1 de ARNm de Cas9	AUGGAUAAGAAGUACUCAAUCGGGCUGGAUAUCGGA ACUAAUUCCGUGGGUUGGGCAGUGAUCACGGAUGAA UACAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGG AACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAAUCUCAUC GGAGCCCUGCUGUUUGACUCCGGCGAAACCGCAGAA GCGACCCGGCUCAAACGUACCGCGAGGCGACGCUACA CCCGGCGGAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGA UCUUUUCGAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCU UCUUCCACCGCCUGGAAGAAUCUUUCCUGGUGGAGG AGGACAAGAAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAA ACAUCGUCGACGAAGUGGCGUACCACGAAAAGUACC CGACCAUCUACCAUCUGCGGAAGAAGUUGGUUGACU CAACUGACAAGGCCGACCUCAGAUUGAUCUACUUGG CCCUCGCCCAUAUGAUCAAUUCGCGGACACUUCCU GAUCGAAGGCGAUCUGAACCUGAUAACUCCGACGU GGAUAAGCUUUUCAUUAACUGGUGCAGACCUACAA CCAACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCAAUAGCUAGCGG CGUCGAUGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCG AAGUCGCGGCGCCUCGAAAACCUGAUCGCACAGCUGC	5

	CGGGAGAGAAAAAGAACGGACUUUUCGGCAACUUGA UCGCUCUCUCACUGGGACUCACUCCCAAUUUCAAGUC CAAUUUUGACCUGGCCGAGGACGCGAAGCUGCAACU CUCAAAGGACACCUACGACGACGACUUGGACAAUUU GCUGGCACAAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGUU CCUUGCCGCUAAGAACCUUUCGGACGCAAUCUUGCUG UCCGAUAUCCUGCGCGUGAACACCGAAAUAACCAA GCGCCGCUUAGCGCCUCGAUGAUUAAGCGGUACGAC GAGCAUCACCAGGAUCUCACGCUGCUCUAAAGCGCUCG UGAGACAGCAACUGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUCU UCUUCGACCAGUCCAAGAAUGGGUACGCAGGGUACA UCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUAAGU UCAUCAAGCCAAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACCG AAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGGGAGGAUCUGC UCCGGAACAGAGAACCUUUGACAACGGAUCCAUUC CCCACCAGAUCCAUCUGGGUGAGCUGCACGCCAUCUU GCGGCGCCAGGAGGACUUUUACCCAUUCCUCAAGGAC AACCGGGAAAAGAUCGAGAAAAUUCUGACGUUCCGC AUCCCGUAUUACGUGGGGCCACUGGCGCGCGGCAAUU CGCGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAAUCAGAGGAAA CCAUCACUCCUUGGAAUUUCGAGGAAGUUGUGGAUA AGGGAGCUUCGGCACAAAGCUUCAUCGAACGAAUGA CCAACUUCGACAAGAAUCUCCCAAACGAGAAGGUGC UUCCUAAGCACAGCCUCCUUUACGAAUACUUCACUGU CUACAACGAACUGACUAAAGUGAAAUACGUUACUGA AGGAAUGAGGAAGCCGGCCUUUCUGUCCGGAGAACA GAAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGCUGUUCAAGACCAA CCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUUAAAGAGGACUA CUUCAAGAAGAUCGAGUGUUUCGACUCAGUGGAAAU CAGCGGGGUGGAGGACAGAUUCAACGCUUCGCUGGG AACCUAUCAUGAUCUCCUGAAGAUCAUCAAGGACAA	
--	---	--

GGACUCCUUGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCU GGAAGAUUUCGUCCUGACCUUGACCCUUUUCGAGGA UCGCGAGAUGAUCGAGGAGAGGCUUAAGACCUACGC UCAUCUCUUCGACGAUAAGGUCAUGAAACAACUCAA GCGCCGCGGUACACUGGUUGGGGCGCCUCUCCCGC AAGCUGAUAACGGUAUUCGCGAUAAACAGAGCGGU AAAACUAUCCUGGAUUUCCUCAAAUCGGAUGGCUUC GCUAAUCGUAACUUCAUGCAAUUGAUCCACGACGAC AGCCUGACCUUUAAGGAGGACAUCCAAAAAGCACAA GUGUCCGGACAGGGAGACUCACUCCAUGAACACAUC GCGAAUCUGGCCCGGUUCGCCGGCGAUUAAGAAGGGA AUUCUGCAAACUGUGAAGGUGGUCGACGAGCUGGUG AAGGUCAUGGGACGGCACAAACCGGAGAAUAUCGUG AUUGAAAUGGCCCGAGAAAACCAGACUACCCAGAAG GGCCAGAAAAACUCCCGCGAAAGGAUGAAGCGGAUC GAAGAAGGAUUAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUG AAAGAGCACCCGGUGGAAAACACGCAGCUGCAGAAC GAGAAGCUCUACCUGUACUAAUUGCAAAAUGGACGG GACAUGUACGUGGACCAAGAGCUGGACAUAUAUCGG UUGUCUGAUUACGACGUGGACCACAUCGUUCCACAG UCCUUUCUGAAGGAUGACUCGAUCGAUAACAAGGUG UUGACUCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGUCAGAU AAUGUGCCAUCGGAGGAGGUCGUGAAGAAGAUGAAG AAUUACUGGCGGCAGCUCCUGAAUGCGAAGCUGAUU ACCCAGAGAAAGUUUGACAAUCUCACUAAAGCCGAG CGCGGCGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUGGAUUC AUCAAACGGCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACC AAGCACGUGGCGCAGAUUCUUGGACUCCCGCAUGAAC ACUAAAUACGACGAGAACGAUAAGCUCAUCCGGGAA GUGAAGGUGAUUACCCUGAAAAGCAAACUUGUGUCG GACUUUCGGAAGGACUUUCAGUUUUACAAAGUGAGA	
--	--

	GAAAUCAACAACUACCAUCACGCGCAUGACGCAUACC UCAACGCUGUGGUCGGUACCGCCCUGAUCAAAAAGU ACCCUAAACUUGAAUCGGAGUUUGUGUACGGAGACU ACAAGGUCUACGACGUGAGGAAGAUGAUAGCCAAGU CCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGAAAUACU UCUUUUACUCAAAACAUCAUGAACUUUUUCAAGACUG AAAUUACGCUGGCCAAUGGAGAAAUCAGGAAGAGGC CACUGAUCGAAACUAAACGGAGAAACGGGCGAAAUCG UGUGGGACAAGGGCAGGGACUUCGCAACUGUUCGCA AAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUCAAUUUGUGAAGA AAACCGAAGUGCAAACCGGCGGAUUUCAAAGGAAU CGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAGCGACAAGCUCAUUG CACGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAG GAUUCGAUUCGCCGACUGUCGCAUACUCCGUCCUCGU GGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCU CAAAUCCGUCAAAGAGCUGCUGGGGAUUACCAUCAU GGAACGAUCCUCGUUCGAGAAGAACCCGAUUGAUUU CCUCGAGGCGAAGGGUUACAAGGAGGUGAAGAAGGA UCUGAUCAUCAAACUCCCAAGUACUCACUGUUCGAA CUGGAAAAUGGUCGGAAGCGCAUGCUGGCUUCGGCC GGAGAACUCCAAAAAGGAAAUGAGCUGGCCUUGCCU AGCAAGUACGUCAACUUCCUCUAUCUUGCUUCGCACU ACGAAAAACUCAAGGGUCACCGGAAGAUAAACGAAC AGAAGCAGCUUUUCGUGGAGCAGCACAAGCAUUAUC UGGAUGAAAUCAUCGAACAAAUCUCCGAGUUUCAA AGCGCGUGAUCCUCGCCGACGCCAACCUCGACAAAGU CCUGUCGGCCUACAAUAAGCAUAGAGAUAAAGCCGAU CAGAGAACAGGCCGAGAACAUAUCCACUUGUUCAC CCUGACUAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUCAAGUAC UUCGAUACUACUAUCGAUCGAAAAGAUACACGUCC ACCAAGGAAGUUCUGGACGCGACCCUGAUCCACCAA	
--	--	--

	GCAUCACUGGACUCUACGAAACUAGGAUCGAUCUGU CGCAGCUGGGUGGCGAUGGCGGUGGAUCUCCGAAAA AGAAGAGAAAGGUGUAAUGA	
Secuencia de aminoácidos de nickasa Cas9 (D10A)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTD RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYAL AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE NPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN LLAQIGDQYADLFLAAKNLSAILLSDILRVNTEITKAPLS ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLEPKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNRE KIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ GDLSHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHK PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS DYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSE EVLKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR EVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLN AVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG	6

		EIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLV VAK VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELAL PSKYVNFYLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLD EIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKH RDKPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIH QSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV	
ORF de ARNm de nickasa Cas9 (D10A)		AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGA ACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAA UACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGA AACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUC GGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAA GCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUAC ACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAA GAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUAC CCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGAC AGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUG GCACUGGCACACAUGAUGAAGUUCAGAGGACACUUC CUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGAC GUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUG AGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAG CUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAC CUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUA AGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGC	7

	AGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACA ACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCU GUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCU GCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAU CGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCA CUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAGUACAAGGAA AUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC AUCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAA UCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGA AGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAU UCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAG GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAA GAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACU UCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACG UCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCG GAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCA AGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCG UCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAA GCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCA AGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAAG ACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU UCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGA	
--	---	--

	CAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGC AGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGAC UGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGC AGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCG ACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUAUCAAGGAAGACAUCCAGA AGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACG AACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCA GAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGA ACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAA CAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAA GAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCA GAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCU GCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAU CAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACA AGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGA UGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGC UGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGG CAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAG GAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGA UCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAA UGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCA GAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGG UCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGG UCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGC AUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGG	
--	--	--

	AGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGC AAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAA GUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAA GACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAA GAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGA AAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGU CAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGU CAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU GAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUA CGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUC CUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAG AAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACA AUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUC GACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUG UUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCA AGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAA GCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACA ACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGC ACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAU UCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACA AGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAU UCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAU ACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGA UCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAA UCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAA GCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAG	
--	--	--

Secuencia de aminoácidos de dCas9 (D10A H840A)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTD RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLLAL AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE NPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLN LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLEPKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ GDLSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHK PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE EG I K E L G S Q I L KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS DYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSE EVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR EVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLN AVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDKVYDVRKMIKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG EIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAK VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELAL	8
---	--	---

	PSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLD EIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIH QSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKRKV	
ORF de ARNm de Cas9 (D10A H840A)	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGA ACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAA UACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGA AACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUC GGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAA GCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUAC ACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAA GAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUAC CCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGAC AGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUG GCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUC CUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGAC GUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUG AGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAG CUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAAC CUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCA AGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGC AGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACA ACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCU GUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCU GCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC	9

AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUUA
 CGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCCA
 CUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAA
 AUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA
 UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC
 AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA
 ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC
 CUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC
 AUCCCGCACCGAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAA
 UCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGA
 AGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAU
 UCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAG
 GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG
 AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG
 UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAA
 GAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA
 AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACU
 UCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACG
 UCACAGAAGGAAUGAGAAAAGCCGGCAUUCCUGAGCG
 GAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCA
 AGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG
 AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCG
 UCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAA
 GCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCA
 AGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAG
 ACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU
 UCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGA
 CAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGC
 AGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGAC
 UGAGCAGAAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAAGC
 AGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCG

	ACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGA AGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACG AACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAA GAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGA ACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAA CAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAA GAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCA GAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCU GCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAU CAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUC CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACA AGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGA UGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGC UGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGG CAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAG GAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGA UCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAA UGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCA GAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGG UCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGG UCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGC AUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGG AGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGC AAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAA GUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAA GACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAA	
--	--	--

	GAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGA AAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGU CAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGU CAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU GAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUA CGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUC CUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAG AAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACA AUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUC GACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUG UUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCA AGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAA GCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACA ACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGC ACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAU UCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACA AGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAU UCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAU ACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGA UCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAA UCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAA GCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAG	
Secuencia codificante limpia de Cas9	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACA AACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUAC AAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGA	10

	GCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCA ACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACA AGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAAC AUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCG ACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGC ACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCA CUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUG AUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUC GACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACC AGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAG UCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCA AGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGC CGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGA UCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGA GCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGC UGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGU UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAA GGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGA CGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUG GUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUAC AUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACA GAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUC CCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCC	
--	--	--

UGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUAUCA GAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAAGAA UGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCAC AGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCAC AGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGA ACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGA AAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCU GGGAAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGA CAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAU CCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGA AGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUA CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAG CAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAG CGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGG AUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGA CGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGC ACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACA CAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAA GGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACU GGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAU CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACA GAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAG AAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAU	
--	--

	CCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGA AGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAAC AGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGC AGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGG UCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGA AGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAU UCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA CAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGAAUGA ACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAG AAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCA GCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUA CCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAA GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGA CUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAA GAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUA CUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGAC AGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAG ACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAU CGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAG AAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAA GAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGA AAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU CGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGG AGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUC	
--	---	--

	AUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGAC UCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAG GACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUC GAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGC GCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUG CCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCC ACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG AACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCA GCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACA AGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGC CGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACAC AAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCA CCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGA CCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCC GAAGAAGAAGAGAAAGGUC	
Secuencia codificante limpia de nickasa Cas9	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACA AACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUAC AAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGA GCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCA ACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACA AGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAAC AUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCG ACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGC	11

ACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCA CUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUG AUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUC GACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACC AGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAG UCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCA AGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGC CGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGA UCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGA GCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGC UGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGU UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAA GGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGA CGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUG GUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUAC AUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACA GAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAAACAUUCGACAACGGAAGCAUC CCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCC UGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUCCUGACAUUCA GAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAA UGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCAC	
--	--

AGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCAC
 AGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGA
 ACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC
 AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA
 CUACUUCAAGAAGAUCGAAUUCGACAGCGUCGA
 AAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCU
 GGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGA
 CAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAU
 CCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGA
 AGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUA
 CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU
 GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAG
 CAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAG
 CGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGG
 AUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGA
 CGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGC
 ACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACA
 CAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAA
 GGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAACU
 GGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAU
 CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACA
 GAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAG
 AAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAU
 CCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAG
 AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGA
 AGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAAC
 AGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCCG
 AGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGG
 UCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG
 ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGA
 AGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA

UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAU UCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA CAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGA ACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAG AAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCA GCGACUUCAGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUA CCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAA GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGA CUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAA GAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUA CUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGAC AGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAG ACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAU CGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAG AAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAA GAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGA AAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU CGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGG AGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUC AUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGAC UUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAG GACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUC GAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGC GCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUG CCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCC ACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG AACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU	
---	--

	ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUUCAGCGAAUUCA GCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACA AGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGC CGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACAC AAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCA CCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGA CCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCC GAAGAAGAAGAGAAAGGUC	
Secuencia codificante limpia de dCas9	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACA AACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUAC AAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGA GCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCA ACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACA AGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAAC AUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCG ACAUUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGC ACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCA CUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUG AUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUC GACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACC AGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAG UCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCA AGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGC CGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGA UCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGA	12

	GCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGC UGAGCAAGGACACAUAACGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCUGU UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAA GGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGA CGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUG GUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUAC AUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACA GAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUC CCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCC UGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUAUCCUGACAUUCA GAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAA UGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCAC AGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCAC AGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGA ACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGA AAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCU GGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGA CAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAU CCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGA	
--	---	--

	AGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUA CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAG CAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAG CGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGG AUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGA CGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGC ACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACA CAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAA GGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACU GGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAU CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACA GAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAG AAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAU CCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGA AGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAAC AGACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGC AGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGG UCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGA AGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAU UCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA CAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGA ACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAG AAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCA GCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUA CCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAA	
--	--	--

	GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGA CUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA GAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUA CUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGAC AGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAG ACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAA CGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAG AAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAA GAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGA AAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU CGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGG AGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUC AUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGAC UUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAG GACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUC GAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGC GCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUG CCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCC ACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG AACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCA GCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACA AGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGC CGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACAC AAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCA CCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGA	
--	--	--

	CCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCC GAAGAAGAAGAGAAAGGUC	
Secuencia de aminoácidos de Cas9 (sin NLS)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYAL AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE NPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNRE KIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ GDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS DYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSE EVLKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR EVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLN AVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG EIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAK	13

		VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKKNPIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNELAL PSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEKQQLFVEQHKHYLD EIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIH QSITGLYETRIDLSQLGGD	
ORF de ARNm de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 13 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación		AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGA ACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAA UACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGA AACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUC GGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAA GCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUAC ACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAA GAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUAC CCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGAC AGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUG GCACUGGCACACAUGAUC AAGUUCAGAGGACACUUC CUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGAC GUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUG AGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAG CUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAAC CUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCA AGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGC AGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACA ACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCU	14

	GUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCU GCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAU CGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCA CUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAA AUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC AUCCCGCACCGAUAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAA UCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGA AGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGA UCCUGACAU UCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAG GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAA GAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACU UCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACG UCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAU UCCUGAGCG GAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCA AGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCG UCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAA GCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCA AGGACAAGGACU UCCUGGACAACGAAGAAAACGAAG ACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU UCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGA CAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGC AGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGAC	
--	---	--

UGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGC
 AGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCG
 ACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC
 ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGA
 AGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACG
 AACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAA
 GAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGA
 ACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAA
 CAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC
 ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAA
 GAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCA
 GAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCU
 GCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA
 CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAU
 CAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC
 CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACA
 AGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
 GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGA
 UGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGC
 UGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGG
 CAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAG
 GAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGA
 UCACAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGAA
 UGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCA
 GAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGG
 UCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGG
 UCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGC
 AUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA
 GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGG
 AGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGC
 AAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAA

	GUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCUCAA GACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAA GAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGA AAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGU CAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGU CAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU GAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUA CGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUC CUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAG AAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACA AUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUC GACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUG UUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCA AGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAA GCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACA ACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGC ACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAU UCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACA AGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAU UCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAU ACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGA UCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAA UCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACUAG	
Secuencia codificante de	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACA AACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUAC	15

Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 13 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)	AAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGA GCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCA ACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACA AGAAGAAAGAACAGAAUUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUUCGACGACAGCUUC UUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAAC AUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCG ACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGC ACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCA CUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUG AUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUC GACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACC AGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAG UCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCA AGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGC CGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGA UCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGA GCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGC UGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCUGU UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAA GGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGA CGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUG GUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUAC AUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACA GAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG	
---	---	--

	CUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUC CCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCC UGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUAUCA GAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAA UGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCAC AGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCAC AGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGA ACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGA AAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCU GGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUAUCAAGGA CAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAU CCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGA AGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUA CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAG CAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAG CGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGG AUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGA CGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGC ACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACA CAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAA GGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACU GGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAACAAU CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACA	
--	---	--

GAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAG
 AAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAU
 CCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAG
 AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGA
 AGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAAC
 AGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGC
 AGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGG
 UCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG
 ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGA
 AGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA
 UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAG
 AGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAU
 UCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUA
 CAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGA
 ACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAG
 AAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCA
 GCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA
 GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUA
 CCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUAAGAA
 GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGA
 CUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAA
 GAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUA
 CUUCUUCUACAGCAACAUAUGAACUUCUUAAGAC
 AGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAG
 ACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAU
 CGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAG
 AAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAA
 GAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGA
 AAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU
 CGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGG
 AGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG

	GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUC AUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGAC UCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAG GACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUC GAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGC GCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUG CCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCC ACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG AACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACGCGAAUUCA GCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACA AGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGC CGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACAC AAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCA CCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGA CCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC	
Secuencia de aminoácidos de nickasa Cas9 (sin NLS)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTD RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYAL AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE NPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN LLAQIGDQYADLFLAAKNLS DAILLSDILRVNTEITKAPLS ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNRE	16

	KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ GDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS DYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSE EVVKKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR EVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLN AVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG EIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAK VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKNPIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELAL PSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLD EIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIH QSITGLYETRIDLSQLGGD	
ORF de ARNm de nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 16 mediante el	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGA ACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAA UACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGA AACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUC GGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAA GCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUAC	17

uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación	ACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAA GAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUAC CCGACAAUCUACCACCUGAGAAAAGAAGCUGGUCGAC AGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUG GCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUC CUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGAC GUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUG AGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAG CUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAAC CUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCA AGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGC AGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACA ACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCU GUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCU GCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAU CGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCA CUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAA AUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC AUCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAA UCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGA AGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGA UCCUGACAU	
---	--	--

UCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAG GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAA GAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACU UCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACG UCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCG GAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCA AGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCG UCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAA GCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCA AGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAG ACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU UCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGA CAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGC AGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGAC UGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAAGC AGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCG ACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGA AGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACG AACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAA GAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGA ACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAA CAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAA GAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCA GAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCU GCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA	
--	--

CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAU CAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACA AGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGA UGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGC UGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGG CAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAG GAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGA UCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAA UGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCA GAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGG UCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGG UCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGC AUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGG AGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGC AAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAA GUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAA GACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAA GAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGA AAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGU CAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGU CAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU GAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUA CGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUC CUGGUCGUCGCAAAGGU CGAAAAGGGAAAGAGCAAG AAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACA AUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUC GACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG	
--	--

	AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUG UUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCA AGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAA GCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACA ACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGC ACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAU UCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACA AGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAU UCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAU ACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGA UCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAA UCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACUAG	
Secuencia codificante de nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 16 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACA AACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUAC AAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGA GCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCA ACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACA AGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAC AUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCG ACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGC ACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCA CUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUCCUG AUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUC GACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACC	18

para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)	AGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAG UCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCA AGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGC CGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGA UCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUAAGA GCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGC UGAGCAAGGACACAUAACGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGU UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAA GGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUAAGAGAUACGA CGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUG GUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUAC AUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACA GAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUC CCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCC UGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUAUCCUGACAUUCA GAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAA UGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCAC AGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCAC AGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGA ACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGAC AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA	
---	---	--

CUACUUCAAGAAGAUUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGA AAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCU GGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGA CAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAU CCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGA AGACAGAGAAAUGAUUCGAAGAAAGACUGAAGACAU CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAG CAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAG CGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGG AUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGA CGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGC ACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACA CAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAA GGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACU GGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAU CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACA GAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAG AAUCGAAGAAGGAUUAAGGAACUGGGAAGCCAGAU CCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGA AGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAAC AGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGC AGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGG UCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGA AGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAU UCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUA CAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGA	
--	--

	ACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAG AAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCA GCGACUUCAGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUA CCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAA GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGA CUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA GAGCGAACAGGAAAUUCGGAAGGCAACAGCAAAGUA CUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGAC AGAAAUACACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAG ACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAU CGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAG AAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAA GAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGA AAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU CGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGG AGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUC AUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGAC UUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAG GACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUC GAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGC GCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUG CCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCC ACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG AACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAAGCGAAUUA GCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACA AGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGC CGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU	
--	--	--

	UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACAC AAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCA CCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGA CCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC	
Secuencia de aminoácidos de dCas9 (sin NLS)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLVESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE NPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLEYEF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ GDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIIEGIKELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS DYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSE EVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR EVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLN AVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEI	19

		GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG EIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAK VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELAL PSKYVNFLYLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKHYLD EIIHQISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKH RDKPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIH QSITGLYETRIDLSQLGGD	
ORF de ARNm de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 19 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación		AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGA ACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAA UACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGA AACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUC GGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAA GCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUAC ACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAA GAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AACAU CGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUAC CCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGAC AGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUG GCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUC CUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGAC GUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUG AGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAG CUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAAC CUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCA	20

	AGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGC AGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACA ACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCU GUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCU GCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAU CGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCA CUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAGUACAAGGAA AUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC AUCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAA UCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGA AGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAU UCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAG GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAA GAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACU UCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACG UCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCG GAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCA AGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCG UCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAA GCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCA AGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAAG ACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU	
--	---	--

	UCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGA CAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGC AGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGAC UGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGC AGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCG ACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUAAGGAAGACAUCCAGA AGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACG AACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAA GAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGA ACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAA CAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAA GAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCA GAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCU GCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAU CAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUC CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACA AGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGA UGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGC UGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGG CAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAG GAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGA UCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAA UGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCA GAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGG UCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGG UCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGC AUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA	
--	--	--

GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGG
 AGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGC
 AAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAA
 GUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAA
 GACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAA
 GAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGA
 AAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGU
 CAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGU
 CAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA
 GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU
 GAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUA
 CGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUC
 CUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAG
 AAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACA
 AUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUC
 GACUUCCUGGAAGCAAAGGGGAUACAAGGAAGUCAAG
 AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUG
 UUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCA
 AGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA
 CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAA
 GCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACA
 ACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGC
 ACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAU
 UCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGG
 ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACA
 AGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC
 UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAU
 UCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAU
 ACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGA
 UCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAA
 UCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACUAG

Secuencia codificante de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 19 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACA AACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUAC AAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGA GCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCA ACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACA AGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUUCGACGACAGCUUC UUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAAC AUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCG ACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGC ACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCA CUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUCCUG AUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUC GACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACC AGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAG UCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCA AGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGC CGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGA UCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGA GCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGC UGAGCAAGGACACAUAACGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGU UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAUACACAAA GGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGA CGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUG GUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUAC AUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG	21
--	---	-----------

UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACA GAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUC CCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCC UGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGA UCCUGACA UUCA GAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAA UGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCAC AGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCAC AGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGA ACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAUUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGA AAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCU GGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGA CAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAU CCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGA AGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAU CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAG CAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAG CGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGG AUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGA CGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACA UCCAGAAGGC ACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACA CAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAA GGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAACU	
---	--

	GGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGA AAAACAU CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACA GAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAG AAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAU CCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGA AGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAAC AGACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGC AGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGG UCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGA AGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAU UCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA CAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGA ACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAG AAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCA GCGACUUCAGAAAGGACU UCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUA CCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAA GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGA CUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA GAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUA CUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGAC AGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAG ACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAU CGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAG AAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAA GAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGA AAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU	
--	---	--

	CGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGG AGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUC AUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGAC UCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAG GACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUC GAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGC GCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUG CCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCC ACUACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAACG AACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAAGCGAAUUC GCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACA AGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGC CGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUC GUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACAC AAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCA CCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGA CCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC	
Secuencia de aminoácidos de Cas9 con dos señales de localización nuclear como los aminoácidos del extremo C	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTD RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE NPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED	22

		LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLEYEF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRDNASLGTYHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ GDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS DYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSE EVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR EVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLN AVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG EIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAK VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELAL PSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLD EIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIH QSITGLYETRIDLSQLGGD GSGSPKKKRKVDGSPKKKRKVDSG	
ORF	de	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGA	23
ARNm	de	ACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAA	
Cas9	que	UACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGA	
codifica	la	AACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUC	

SEQ ID NO: 22 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación	GGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAA GCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUAC ACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAA GAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUAC CCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGAC AGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUG GCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUC CUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGAC GUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUG AGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAG CUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA AAC CUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCA AGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGC AGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACA ACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCU GUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCU GCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAU CGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCA CUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAA AUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAA	
---	---	--

UCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGA AGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGA UCCUGACAU UCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAG GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAA GAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACU UCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACG UCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAU UCCUGAGCG GAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCA AGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCG UCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAA GCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCA AGGACAAGGACU UCCUGGACAACGAAGAAAACGAAG ACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU UCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGA CAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGC AGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGAC UGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGC AGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACU UCCUGAAGAGCG ACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACA UCCAGA AGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACG AACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCA GAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGA ACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAA CAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAA GAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCA	
---	--

	GAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCU GCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAU CAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACA AGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGA UGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGC UGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGG CAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAG GAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGA UCACAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGAA UGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCA GAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGG UCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGG UCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGC AUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGG AGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGC AAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAA GUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAA GACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAA GAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGA AAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGU CAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGU CAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU GAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUA CGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUC CUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAG AAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACA	
--	---	--

	AUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUC GACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUG UUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCA AGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAA GCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACA ACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGC ACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAU UCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACA AGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAU UCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAU ACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGA UCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAA UCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAA GCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGA AGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG	
Secuencia codificante de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 23 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACA AACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUAC AAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUUCGGA GCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCA ACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACA AGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AAC AUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCG	24

Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)	ACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGC ACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCA CUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUG AUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUC GACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACC AGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAG UCGACGCAAAGGCCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCA AGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGC CGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGA UCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGA GCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGC UGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGU UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAA GGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGA CGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUG GUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUAC AUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACA GAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAAACAUUCGACAACGGAAGCAUC CCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCC UGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUUCGAAAAGAUCCUGACAUUCA GAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAA UGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGG	
--	--	--

	UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCAC AGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCAC AGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGA ACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCGA AAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCU GGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGA CAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAU CCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGA AGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUA CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAG CAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAG CGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGG AUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGA CGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGC ACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACA CAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAA GGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGU CGUCGACGAACU GGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAU CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACA GAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAG AAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAU CCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGA AGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAAC AGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGC AGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGG UCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGA	
--	---	--

	AGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAU UCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA CAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGAAUGA ACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAG AAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCA GCGACUUCAGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUA CCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAA GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGA CUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAA GAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUA CUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGAC AGAAAUACACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAG ACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAU CGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAG AAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAA GAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGA AAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU CGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGG AGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUC AUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGAC UUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAG GACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUC GAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGC GCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUG CCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCC ACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG	
--	---	--

	AACAGAAGCAGCUGUUCGUGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAAGCGAAUUCA GCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACA AGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGC CGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACAC AAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCA CCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGA CCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCC GAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAA GAAGAGAAAGGUCGACAGCGGA	
Secuencia de aminoácidos de nickasa Cas9 con dos señales de localización nuclear como los aminoácidos del extremo C	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTD RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE NPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ	25

	GDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHK PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS DYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSE EVLKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR EVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLN AVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG EIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAK VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKKNPIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELAL PSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLD EIIQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIH QSITGLYETRIDLSQLGGDGS SPKKKRKVDGSPKKKRK VDSG	
ORF de ARNm de nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 25 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGA ACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAA UACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGA AACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUC GGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAA GCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUAC ACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAA GAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUAC CCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGAC	26

codones de inicio y terminación	AGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUG GCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUC CUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGAC GUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUG AGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAG CUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAAC CUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCA AGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGC AGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACA ACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCU GUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCU GCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAU CGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCA CUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAA AUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAA UCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGA AGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGA UCCUGACAU UCAGAAUCCCGUACUACGUUCGGACCGCUGGCAAGAG GAAACAGCAGAUUUCGAUGGAUGACAAGAAAGAGCG AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAA GAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACU	
--	---	--

UCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACG UCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCG GAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCA AGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCG UCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAA GCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCA AGGACAAGGACUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAG ACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU UCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGA CAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGC AGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGAC UGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGC AGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUCCUGAAGAGCG ACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUAAGGAAGACAUCCAGA AGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACG AACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAA GAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGA ACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAA CAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAA GAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCA GAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCU GCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAU CAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACA AGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGA UGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGC	
---	--

UGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGG CAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAG GAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGA UCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAA UGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCA GAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGG UCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGG UCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGC AUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGG AGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGC AAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAA GUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUCAA GACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAA GAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGA AAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGU CAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGU CAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU GAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUA CGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUC CUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAG AAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACA AUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUC GACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUG UUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCA AGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAA GCCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACA ACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGC	
---	--

	ACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAU UCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACA AGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAU UCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAU ACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGA UCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAA UCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAA GCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGA AGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG	
Secuencia codificante de nickasa Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 25 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACA AACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUAC AAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGA GCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCA ACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACA AGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AAC AUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCG ACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGC ACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCA CUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUCCUG AUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUC GACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACC AGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAG UCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCA AGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGC CGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA AACCUGA	27

proteínas de fusión)	UCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGA GCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGC UGAGCAAGGACACAUAACGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCUGU UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAA GGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGA CGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUG GUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUAC AUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACA GAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUC CCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCC UGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGA UCCUGACAUUCA GAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAA UGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCAC AGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCAC AGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGA ACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCGA AAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCU GGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGA CAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAU	
-----------------------------	---	--

	CCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGA AGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAU CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAG CAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAG CGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGG AUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGA CGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGC ACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACA CAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAA GGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACU GGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAACAAU CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACA GAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAG AAUCGAAGAAGGAUUAAGGAACUGGGAAGCCAGAU CCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGA AGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAAC AGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGC AGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGG UCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGA AGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAU UCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA CAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGA ACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAG AAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCA GCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUA	
--	---	--

	CCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAA GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGA CUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA GAGCGAACAGGAAAUCGGAAGGCAACAGCAAAGUA CUUCUUCUACAGCAACAUAUGAACUUCUUCAAGAC AGAAAUACACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAG ACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAU CGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAG AAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAA GAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGA AAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU CGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGG AGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAUACACAAUC AUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGAC UUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAG GACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUC GAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGC GCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUG CCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCC ACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG AACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCA GCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACA AGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGC CGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACAC AAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCA CCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGA	
--	---	--

	CCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGAC GGAAGCCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGA	
Secuencia de aminoácidos de dCas9 con dos señales de localización nuclear como los aminoácidos del extremo C	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE NPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ GDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS DYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSE EVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR EVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLN AVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG EIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKES	28

		ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAK VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKKNPIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELAL PSKYVNFYLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLD EIIHQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIH QSITGLYETRIDLSQLGGDGS GSPKKKRKVDGSPKKKRK VDSG	
ORF de ARNm de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 28 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 3, con codones de inicio y terminación		AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGA ACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAA UACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGA AACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUC GGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAA GCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUAC ACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAA GAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUAC CCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGAC AGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUG GCACUGGCACACAUGAUGAAGUUCAGAGGACACUUC CUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGAC GUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUG AGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAG CUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAC CUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUA AGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGC	29

AGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACA
 ACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCU
 GUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCU
 GCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC
 AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAU
 CGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCA
 CUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAGUACAAGGAA
 AUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA
 UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC
 AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA
 ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC
 CUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC
 AUCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAA
 UCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGA
 AGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAU
 UCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAG
 GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG
 AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG
 UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAA
 GAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA
 AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACU
 UCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACG
 UCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCG
 GAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCA
 AGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG
 AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCG
 UCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAA
 GCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUAUCA
 AGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAAG
 ACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU
 UCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGA

	CAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGC AGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGAC UGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGC AGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCG ACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCC ACGACGACAGCCUGACAUAUCAAGGAAGACAUCCAGA AGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACG AACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAA GAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGA ACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAA CAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAA GAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCA GAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCU GCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAU CAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUC CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACA AGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGA UGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGC UGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGG CAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAG GAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGA UCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAA UGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCA GAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGG UCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGG UCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGC AUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGG	
--	---	--

	AGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGC AAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAA GUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAA GACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAA GAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGA AAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGU CAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGU CAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAA GGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU GAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUA CGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUC CUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAG AAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACA AUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUC GACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUG UUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCA AGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAA GCCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACA ACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGC ACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACGCGAAU UCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACA AGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAU UCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAU ACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGA UCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAA UCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGAC	
--	--	--

	GGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGA UAG	
Secuencia codificante de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 28 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 3 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACA AACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUAC AAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGA GCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCA ACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACA AGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAA GACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA AAC AUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCG ACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGC ACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCA CUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUG AUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUC GACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACC AGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAG UCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCA AGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGC CGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA AACUGA UCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUAAGA GCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGC UGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCUGU UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAA GGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGA CGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUG GUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUC	30

UUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUAC AUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACA GAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAACAUUUCGACAACGGAAGCAUC CCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCC UGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUUCA GAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAA UGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCAC AGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCAC AGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGA ACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGA AAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCU GGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGA CAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAU CCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGA AGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAU CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAG CAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAG CGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGG AUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGA CGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCAGAAAGGC ACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACA	
--	--

CAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAA GGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACU GGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAU CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACA GAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAG AAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAU CCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGA AGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAAC AGACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGC AGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGG UCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGA AGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAU UCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA CAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGA ACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAG AAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCA GCGACUUCAGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUA CCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAA GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGA CUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA GAGCGAACAGGAAAUUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUA CUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGAC AGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAG ACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAU CGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAG AAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAA	
--	--

	GAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGA AAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU CGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGG AGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUG GUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUC AUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGAC UUCUGGAAGCAAAGGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAG GACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUC GAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGC GCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUG CCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCC ACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG AACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCA GCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACA AGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGC CGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACAC AAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCA CCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGA CCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGAC GGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGA	
Promotor T7	TAATACGACTCACTATA	31
UTR 5' de beta-globina humana	ACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCCTAGCAACCT CAAACAGACACC	32

UTR 3' de beta-globina humana	GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCTT TTGTTCCCTAAGTCCAACACTAACTGGGGGATATTA TGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAA ACATTTATTTTCATTGC	33
UTR 5' de alfa-globina humana	CATAAACCCCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTCTTCTG GTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACC	34
UTR 3' de alfa-globina humana	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGC CTCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCC CCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC	35
UTR 5' de <i>Xenopus laevis</i>	AAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCC	36
UTR 3' de <i>Xenopus laevis</i>	ACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCT ACATAATACCAACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCC CAAAATGTAGCCATTTCGTATCTGCTCCTAATAAAAAGA AAGTTTCTTCACATTCT	37
UTR 5' de hormona bovina del crecimiento	CAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCAGCT	38
UTR 3' de hormona bovina del crecimiento	TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTC CTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCT AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA	39
UTR 3' de hemoglobina alfa cadena adulto 1 (Hba- a1) de Mus musculus	GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCTGGCCATGCCCTTC TTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAA AGCCTGAGTAGGAAG	40

UTR 5' de HSD17B4	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCTGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTC	41
TTR dirigida a ARN guía G282	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	42
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCTGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAAGAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAAGGACAGCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCTGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCA	43

	GAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACG ACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGA CCAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCAAAGAACCTG AGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCA ACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCAT GATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACA CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGG ATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAA GAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT GGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGA GAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTTCGACAACG GAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCA CGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCC TGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGAC ATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGA AGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTC GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAA TGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGT CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAG TCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGA AGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAG AAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACA GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTT CAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGC GGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACAT ACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTT CCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC ATCGTCCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAAT GATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTC	
--	---	--

GACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGAT
 ACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAA
 CGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG
 GACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACT
 TCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAG
 GAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAG
 ACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAG
 CCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAG
 GTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACA
 AGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAA
 CCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGA
 AAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACT
 GGGAAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAAC
 ACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT
 GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTG
 GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACA
 TCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGAC
 AACAAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGA
 AAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGA
 AGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAA
 GCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAG
 GCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCA
 GGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGA
 TCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT
 GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGA
 GAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCA
 GCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGA
 GAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACC
 TGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTA
 CCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTAC
 AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG

AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTT
 CTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCA
 CACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT
 CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGAC
 AAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGA
 GCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGT
 CCAGACAGGAGGATTGAGCAAGGAAAGCATCCTGCCG
 AAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAG
 GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCC
 CGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTC
 GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAG
 GAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCT
 TCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGG
 ATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTG
 CCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAA
 AGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGG
 AAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTC
 CTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA
 GCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGA
 ACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAG
 ATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG
 CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCA
 CAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC
 ATCCACCTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGC
 AGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAG
 AGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACAC
 TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG
 AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGA
 AGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCA
 CATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAG
 AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTT

	CTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAA ACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTG CTTCAATTAATAAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondien te a la SEQ ID NO: 4 y UTR 3' de ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCG TGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATGGAC AAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACA GCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGT CCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGAC AGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACT GAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAA GAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAAC GAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGAC TGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCA CGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAA GTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCT GAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGAC CTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAA GTTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAAC CCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCT GGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCG ATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGA GCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCT GATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTG TTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACC GAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCA AAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACC TGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGC AGACCTGTTCTTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCA ATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAA	44

	TCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAG ATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAG GCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGG AAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGG ATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTAC AAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA CAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCT GCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATC CCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCT GAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGAC AACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAA TCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAG CAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACA ATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGG GAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAA CTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATG AGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGG CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGT CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAG ATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCG AAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGA CCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGAC AACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCC TGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGA AGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGAC AAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAG GATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAT CAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC CTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAACTTCATGC	
--	--	--

	AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGA CATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGC CTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGG CAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGT CGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCG GAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGA CAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAA TGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAA GCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACA GCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG AACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACA TCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTC CCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACA AGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTG ATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATT CATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACA AAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACA CAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGT CAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGAC TTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAAT CAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAAC GCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGT CTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAG GAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACA GCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTG GCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAA CAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGG	
--	--	--

AAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATG
 CCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGA
 CAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAG
 AAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGG
 GACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAG
 TCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAA
 GGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACT
 GCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAA
 AAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACA
 AGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA
 GTACAGCCTGTTCTGAAGTGGAAAACGGAAGAAAGAGA
 ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACG
 AACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTAC
 CTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGG
 AAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCA
 CAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGC
 GAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACC
 TGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGA
 CAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCAC
 CTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATT
 CAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATAC
 ACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCC
 ACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGA
 CCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCG
 AAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTA
 AAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAA
 AATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTC
 GTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAA
 ATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAAT
 TAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG

ORF de Cas9 alternativo con contenido de U del 19,36 %	ATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAA CTAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATAC AAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACA CCGATAGACACAGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGC CCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCC GGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCG GAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGA ACGAAATGGCAAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCG CCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAG CATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTGGACGA AGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATC TGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGA CCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCA AATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAAC CCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTGTTCATTCAACT GGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCTGAAGAAAACCCA ATCAATGCCAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTC CGCCCGGCTGTCTGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTG ATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAGAAGAACGGACTTT TCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCC AATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAA GCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTG GACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGG ATCTGTTCTTGCCGCTAAGAACCTTTTCGGACGCAATC TTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAAC CAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACG ACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTC GTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATTT TCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATC GATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCA TCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGA	45
---	--	-----------

	ACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGC AAACAGAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACACC AGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGC CAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGGA AAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATT ACGTGGGCCCCTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCG TGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTT GGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGC ACAATCCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGA ATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTC CTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAA AGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCC TTTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAAGCGATTGTCGATC TGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCA GCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCG ACTCAGTGGAATCAGCGGAGTGAGGACAGATTCAA CGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCA TCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGA GGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTT TCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGAC CTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAAC TCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCC CGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCG GTAAAACTATCCTGGATTTCTCAAAATCGGATGGCTTC GCTAATCGTAACTTCATGCAGTTGATCCACGACGACAG CCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAGAAAGCACAAGTG AGCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGA ATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAAGAAGGGAATCCTG CAAACTGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTCA TGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAAT GGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAG	
--	---	--

	AACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAA TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCC GGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTAC CTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGA CCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACG TGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGAC TCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGA ACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGT CGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTG AATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAAGTTTGACAATCT CACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGAT AAGGCTGGATTTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTC GGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTC CCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTC ATCCGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAAC TTGTGTCTGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAA GTGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACG CATACCTCAACGCTGTGGTCGGCACCGCCCTGATCAAG AAGTACCCTAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGA CTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAG TCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAATACT TCTTTTACTCAAACATCATGAACTTCTTCAAGACTGAA ATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCAC TGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTG GGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTGCAAAGTG CTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGA AGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCC CAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAA AGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTG CCGACTGTGCGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGT GGAGAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCCGTCAAA	
--	---	--

	GAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTT CGAGAAGAACCCGATTGATTTCTGAGGCGAAGGGT TACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACCTGC CCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAA GCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAGAAAGGA AATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCT CTATCTTGCTTCGCACTACGAGAACTCAAAGGGTCAC CGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCA GCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCT CCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAAC CTCGACAAAGTCCTGTCCGCCTACAATAAGCATAGAG ATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCA CTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCT TCAAGTACTTCGATACTACTATCGACCGCAAAAGATAC ACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCA CCAAAGCATCACTGGACTCTACGAACTAGGATCGATC TGTCGCAGCTGGGTGGCGATGGTGGCGGTGGATCCTAC CCATACGACGTGCCTGACTACGCCTCCGGAGGTGGTGG CCCCAAGAAGAAACGGAAGGTGTGATAG	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondien te a la SEQ ID NO: 45, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCG TGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCTGCCACC ATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAA CTAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATAC AAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACA CCGATAGACACAGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGC CCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCC GGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCG GAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGA ACGAAATGGCAAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCG CCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAG	46

	CATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTGGACGA AGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATC TGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGA CCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCA AATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAAC CCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTGTTCAATTCAACT GGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCTGAAGAAAACCCA ATCAATGCCAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTC CGCCCGGCTGTCTGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTG ATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAGAAGAACGGACTTT TCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCC AATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAA GCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTG GACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGG ATCTGTTCTTGCCGCTAAGAACCTTTTCGGACGCAATC TTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAAC CAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACG ACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTC GTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATTT TCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATC GATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCA TCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGA ACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGC AAACAGAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACACC AGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGC CAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGGA AAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATT ACGTGGGCCCCTGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCG TGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTT GGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGC ACAATCCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGA	
--	---	--

	ATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTC CTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAA AGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCC TTTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAAGCGATTGTCGATC TGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCA GCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCG ACTCAGTGGAATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAA CGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCA TCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGA GGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTT TCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGAC CTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAAC TCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCC CGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCG GTAAAACTATCCTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTC GCTAATCGTAACTTCATGCAGTTGATCCACGACGACAG CCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAGAAAGCACAAAGTG AGCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGA ATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATCCTG CAAACTGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTCA TGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAAT GGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAG AACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAA TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCC GGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTAC CTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGA CCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACG TGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGAC TCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGA ACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGT CGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTG	
--	--	--

AATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCT
 CACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGAT
 AAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTC
 GGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTC
 CCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTC
 ATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAAC
 TTGTGTCGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAA
 GTGAGAGAAATCAACAACTACCATCACGCGCATGACG
 CATACCTCAACGCTGTGGTCGGCACCGCCCTGATCAAG
 AAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGA
 CTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAG
 TCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAATACT
 TCTTTTACTCAAACATCATGAACTTCTTCAAGACTGAA
 ATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCAC
 TGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTG
 GGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTG
 CTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGA
 AGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCC
 CAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAA
 AGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCTG
 CCGACTGTGCGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGT
 GGAGAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCCGTCAAA
 GAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTT
 CGAGAAGAACCCGATTGATTTCTGAGGCGAAGGGT
 TACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACCTGC
 CCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAA
 GCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAGAAAGGA
 AATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCT
 CTATCTTGCTTCGCACTACGAGAACTCAAAGGGTCAC
 CGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCA
 GCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCT

	CCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAAC CTCGACAAAGTCCTGTCTGGCCTACAATAAGCATAGAG ATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCA CTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCT TCAAGTACTTCGATACTACTATCGACCGCAAAAGATAC ACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCA CCAAAGCATCACTGGACTCTACGAACTAGGATCGATC TGTCGCAGCTGGGTGGCGATGGTGGCGGTGGATCCTAC CCATACGACGTGCCTGACTACGCCTCCGGAGGTGGTGG CCCCAGAAGAAACGGAAGGTGTGATAGCTAGCCATC ACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGA GAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTT TCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAA AACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGT GCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondien te a la SEQ ID NO: 45 y UTR 3' de ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCG TGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCTATGGAT AAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTC CGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTG CCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATA GACACAGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGCCCTGCT GTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTC AAACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGA ATCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAA ATGGCAAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGA AGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAA CGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTGGACGAAGTGGC GTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGA AGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAG ATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCC	47

	GCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGAT AACTCCGACGTGGATAAGCTGTTCAATTCAACTGGTGCA GACCTACAACCAACTGTTCTGAAGAAAACCCAATCAAT GCCAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCCG GCTGTCTGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCAC AGCTGCCGGGAGAGAAGAAGAACGGACTTTTCGGCAA CTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAA GTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAAC TCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTG CTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCTT TGCCGCTAAGAACCTTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCG ATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCC GCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATC ACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACA GCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATTTTCTTCGACC AGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGG CGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCA ATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAAGCTGCTGG TCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGCAAACAGAG AACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACACCAGATCCATC TGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGA CTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCG AGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGC CCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGAC TAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTTG AGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAATCCTTC ATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAA ACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAA TACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATA CGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGAGC GGAGAACAGAAGAAAGCGATTGTCTGATCTGCTGTTCA	
--	---	--

	AGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGA GGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGG AAATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCT GGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACA AGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCT GGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATC GCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCA TCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCC GCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTG ATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAACTA TCCTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGT AACTTCATGCAGTTGATCCACGACGACAGCCTGACCTT TAAGGAGGACATCCAGAAAGCACAAAGTGAGCGGACAG GGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCG GTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATCCTGCAAACCTGT GAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGG CACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAG AAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCG CGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGA GCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAA AACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACT ATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGA GCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACC ACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCCATC GATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAG GGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAA GAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCG AAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAA AGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCT GGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGA TTACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATG	
--	--	--

	AACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGG AAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTC GGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAG AAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCATACCTC AACGCTGTGGTCGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCC TAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGG TCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACA GGAAATCGGGAAAGCAAACCTGCGAAATACTTCTTTTACT CAAACATCATGAACTTCTTCAAGACTGAAATTACGCTG GCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAA CTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGG CAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAAAGTGCTCTCTATGC CGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAAC CGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGA AATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGG ACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGATTTCGCCGACTGT CGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAG GGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGC TGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTTCGAGAAG AACCCGATTGATTTCTTGGAGGCGAAGGGTTACAAGG AGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACCTGCCCAAGTA CTCACTGTTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGC TGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAGAAAGGAAATGAGCT GGCCTTGCCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTG CTTCGCACTACGAGAACTCAAAGGGTCAACCGGAAGA TAACGAACAGAAGCAGCTTTTTCGTGGAGCAGCACAAG CATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTT TTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACA AAGTCCTGTGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCC GATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCA CCCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCTTCAAGTAC	
--	--	--

	TTCGATACTACTATCGACCGCAAAAGATACACGTCCAC CAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGC ATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTGCGA GCTGGGTGGCGATGGTGGCGGTGGATCCTACCCATACG ACGTGCCTGACTACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCCCAAG AAGAAACGGAAGGTGTGATAGCTAGCCATCACATTTA AAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAA AATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTC GTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAA ATTTCTTTAATCATTTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAAT TAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Transcripto de Cas9 que comprende ORF de Cas9 mediante el uso de codones con una expresión generalmente alta en seres humanos	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCG TGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATGCCT AAGAAAAAGCGGAAGGTGACGGGGATAAGAAGTACT CAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGTTGG GCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGA AGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCAT CAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCG GCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGC GAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGC TATCTGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGT CGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCC TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTAT CTTTGGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAA AAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGT TGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACT TGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTTC CTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGT GGATAAGCTTTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACC AACTGTTCTGAAGAAAACCCAATCAATGCTAGCGGCGT	48

	CGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGT CGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGG AGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCT CTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTT GACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGG ACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAA ATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTTCCTTGCCGCTAA GAACCTTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGC GCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGC CTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGAT CTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCC TGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAG AATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCC AGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAA AAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGA ACAGGGAGGATCTGCTCCGGAACAGAGAACCTTTGA CAACGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGC TGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCA TTCCTCAAGGACAACCGGGAAGATCGAGAAAATTC TGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCCTGGCG CGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATC AGAGGAAACCATCACTCCTTGAATTTTCGAGGAAGTTG TGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACG AATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAG GTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCAC TGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTG AAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACA GAAGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACC GCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTT CAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAATCAGC GGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCT	
--	---	--

	ATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTC CTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATA TCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATG ATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGA CGATAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCCGGTAC ACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGG TATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTATCCTGGATT TCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATG CAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGG ACATCCAAAAAGCACAAGTGTCCGGACAGGGAGACTC ACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGG CGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACCTGTGAAGGTGGT CGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCG GAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGA CTACCCAGAAGGGCCAGAAAACTCCCGCGAAAGGAT GAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGC CAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACACGCAGC TGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAAT GGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCA ATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCA CAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGT GTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGAT AATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGA ATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACC CAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCG GCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAA ACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCAC GTGGCGCAGATCTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATA CGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTG ATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTGGACTTTTCGGAA GGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAAC	
--	---	--

ACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTC GGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAATC GGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTG AGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGA AAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATG AACTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGA AATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAA ACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCG CAACTGTTGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAAT ATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTT CAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAA GCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAG TACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTCGCATACTCCGT CCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAA AAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCAT CATGGAACGATCCTCGTTTCGAGAAGAACCCGATTGATT TCCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGA TCTGATCATCAAACCTCCCAAGTACTCACTGTTCTGAAC TGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGG AGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGC AAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGA AAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAG CAGCTTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGA AATCATCGAACAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGA TCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTGCGCC TACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGG CCGAGAACATTATCCACTTGTTACCCCTGACTAACCTG GGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACTACTAT CGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTG GACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTA CGAAACTAGGATCGATCTGTGCGCAGCTGGGTGGCGATT	
---	--

	GATAGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTA CCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGC TTATTCATCTCTTTTTCTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAA CACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTG CCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAA GAACCTCGAG	
Transcripto de Cas9 que comprende una secuencia de Kozak con ORF de Cas9 mediante el uso de codones con una expresión generalmente alta en seres humanos	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTG TGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACC ATGCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTCGACGGGGATAAGA AGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTG GGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGT CCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACA CAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTG ACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACG TACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGC ATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATGGC AAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAAT CTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCA TCCTATCTTTGGAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACC ACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAA GTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGA TCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGA CACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTC CGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAACTGGTGCAGACCT ACAACCAACTGTTCTGAAGAAAACCCAATCAATGCTAG CGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGT CGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTG ATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTC CAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCT	49

	CAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTGCT GGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCCCTTG CCGCTAAGAACCTTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGAT ATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGC TTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCAC CAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGC AACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAG TCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCG CTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATC CTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAAGTCTGGTCA AGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAAC CTTTGACAACGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGG GTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTT TACCCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGA AAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCA CTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAG AAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTTGAG GAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCA TCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAA CGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAAT ACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATAC GTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGG AGAACAGAAGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAG ACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGG ACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAA ATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGG GAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAG GACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGG AAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGC GAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATC TCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACTCAAGCGCCGC	
--	---	--

CGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGAT CAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACCTATC CTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAA CTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTA AGGAGGACATCCAAAAAGCACAAAGTGTCCGGACAGGG AGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTT CGCCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACCTGTGAA GGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCAC AAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAA ACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTCCCGCGA AAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTG GGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACA CGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTG CAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGG ACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATC GTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAA CAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAG TCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGA TGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCT GATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCG AGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATT CATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACC AAGCACGTGGCGCAGATCTTGACTCCCGCATGAACA CTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGT GAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCGGACT TTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATC AACAACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGC TGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAAC TTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTAC GACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAA TCGGGAAAGCAAACCTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAAC	
---	--

	ATCATGAACTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAA TGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAAC GGAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGG GACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCA AGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGC GGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATA GCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCC GAAGAAGTACGGAGGATTTCGATTTCGCCGACTGTCGCA TACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAA AGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGG GATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACC CGATTGATTTCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGT GAAGAAGGATCTGATCATCAAACCTCCCCAAGTACTCAC TGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCT TCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGGCCT TGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGC ACTACGAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGA ACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATC TGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAG CGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCT GTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGA GAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTACCCCTGAC TAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATA CTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGA AGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTG GACTCTACGAACTAGGATCGATCTGTTCGCAGCTGGGT GGCGATTGATAGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCT CAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGAT CAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTCGTTGGTGTA AAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAA	
--	--	--

	TCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAA ATGGAAAGAACCTCGAG	
ORF de Cas9 con uniones de empalme retiradas; contenido en U del 12,75 %	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAA CAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATA CAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAAC ACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAG CACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAG AAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTC AGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCC ACcggCTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCTGAAGAAGACAAG AAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCG ACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAG GCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACAT GATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGAC CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCTGAAGAA AACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAA TCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGA AAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAAC GGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACT GACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAA GACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACG ACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCA GTACGCAGACCTGTTCTGTCAGCAAAGAACCTGAGC GACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACA CAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGAT CAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTG CTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT	50

	ACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAA TTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGA CGGAACAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAA GACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAA GCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGC AATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGA AGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATT CAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGA AACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAG AAACAATCACACCGTGGAAGTTTGAAGAAGTCGTCGA CAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATG ACAAAGTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTC TACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAG GAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAA GAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGA AAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCA AGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGG AGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAC CACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCT GGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATC GTCCTGACACTGACACTGTTTGAAGACAGAGAAATGA TCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTGA CGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATAC ACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACG GAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGA CTTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTC ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGG AAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGA CAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGC	
--	--	--

	CCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGG TCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAA GCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAAC CAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAA AGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTG GGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACA CACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTG CAaAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGG ACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACAT CGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGAC AACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGA AAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGA AGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAA GCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAG GCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCA GGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGA TCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGA GAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCA GCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGA GAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACC TGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTA CCCGAAGCTGGAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTAC AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTT CTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCA CACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGAC AAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGA GCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGT CCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCG	
--	---	--

	AAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAG GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCC CGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTC GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAG GAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCT TCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGG ATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTG CCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAA AGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGG AAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTC CTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGA ACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAG ATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCA CAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGC AGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAG AGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACAC TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGA AGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondien te a la SEQ ID NO: 50, secuencia de	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCC TGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTTCGGATCCGCCACC ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAA CAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATA CAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAAC ACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAG CACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAG	51

Kozak y UTR 3' de ALB	AAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTC AGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCC ACcggCTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAG AAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCG ACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAG GCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACAT GATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGAC CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCTGAAGAA AACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAA TCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGA AAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAAC GGACTGTTCTGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACT GACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAA GACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACG ACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCA GTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCAAAGAACCTGAGC GACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACA CAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGAT CAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTG CTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT ACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAA TTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGA CGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAA GACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAA GCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGC AATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGA AGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATT CAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGA	
--	---	--

	AACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAG AAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGA CAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATG ACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTC TACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAG GAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAA GAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGA AAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCA AGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGG AGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAC CACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCT GGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATC GTCCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACAGAGAAATGA TCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCTGA CGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATAC ACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACG GAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGA CTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTC ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGG AAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGA CAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGC CCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGG TCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAA GCCGGAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAAC CAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAA AGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTG GGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACA CACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTG CAaAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGG ACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACAT	
--	---	--

CGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGAC
 AACAAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGA
 AAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGA
 AGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAA
 GCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAG
 GCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCA
 GGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGA
 TCACAAAGCACGTGCGACAGATCCTGGACAGCAGAAT
 GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGA
 GAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCA
 GCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGA
 GAAATCAACAACTACCACCACGCGACACGACGCATACC
 TGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTA
 CCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTAC
 AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
 AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTT
 CTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCA
 CACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT
 CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGAC
 AAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGA
 GCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGT
 CCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCG
 AAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAG
 GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCC
 CGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTC
 GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAG
 GAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCT
 TCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGG
 ATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTG
 CCGAAGTACAGCCTGTTCTGAACTGGAAAACGGAAGAA
 AGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGG

	AAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTC CTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGA ACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAG ATCAGCGAATTTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAACAGCA CAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGC AGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAG AGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACAC TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGA AGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCA CATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTT CTTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAA ACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTG CTTCAATTAATAAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
ORF de Cas9 con codones de uridina mínima utilizados frecuentement e en seres humanos en general; contenido de U del 12,75 %	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCA CCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTA CAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAAC ACCGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCG CCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCAC CAGACTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGA AGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCA GCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCA CAGACTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAG AAGCACGAGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGG ACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAG	52

	GCCGACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACAT GATCAAGTTCAGAGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACC TGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCAT CCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAG AACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCA TCCTGAGCGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGA GAACCTGATCGCCCAGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAAC GGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCT GACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAG GACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACG ACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCA GTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCG ACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACC GAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCA AGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCT GAAGGCCCTGGTGAGACAGCAGCTGCCCCGAGAAGTAC AAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACG CCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTT CTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGAC GGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGG ACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAG CATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCA TCCTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAG GACAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCA GAATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAAC AGCAGATTGCGCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAGA CCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAA GGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACC AACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGC CCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTAC AACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCA	
--	--	--

	TGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAA GGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAG GTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGA AGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGT GGAGGACAGATTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCAC GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG ACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT GCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACAGAGAGATGATC GAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCCACCTGTTCGACG ACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACAC CGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGC ATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACT TCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATG CAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG ACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCC GCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGG TGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCAGACACAAGCC CGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAACCAG ACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCAGAGAGAGA ATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCA GCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCA GCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG AACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACA TCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGT GCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAC AAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAG AGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGA TGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCT GATCACCAGAGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCC GAGAGAGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCT	
--	---	--

	TCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCAC CAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCAGAATGAAC ACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAGG TGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGA CTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAG ATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAA CGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCC AAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGG TGTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCA GGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACA GCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTG GCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGA CCAACGGCGAGACCGGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGG CAGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATG CCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGA CCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGAG AAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGG GACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCG TGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAA GGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCT GCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGCTTCGAG AAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACA AGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA GTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGA ATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACG AGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTAC CTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCG AGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCA CAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCCAACC TGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGA	
--	--	--

	CAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCAC CTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTT CAAGTACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATAC ACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCC ACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCAGAATCGA CCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGCAGCCCC AAGAAGAAGAGAAAGGTGTGA	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondien te a la SEQ ID NO: 52, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCG TGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACC ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCA CCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTA CAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAAC ACCGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCG CCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCAC CAGACTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGA AGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCA GCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCA CAGACTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAG AAGCACGAGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGG ACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTA CCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAG GCCGACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACAT GATCAAGTTCAGAGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACC TGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCAT CCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAG AACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCA TCCTGAGCGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGA GAACCTGATCGCCCAGCTGCCC GGCGAGAAGAAGAAC GGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCT GACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAG	53

	GACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACG ACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCA GTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAACCTGAGCG ACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACC GAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCA AGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCT GAAGGCCCTGGTGAGACAGCAGCTGCCCCGAGAAGTAC AAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACG CCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTT CTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGAC GGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGG ACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAG CATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCA TCCTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAG GACAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCA GAATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAAC AGCAGATTTCGCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAGA CCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAA GGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACC AACTTCGACAAGAACCTGCCCCAACGAGAAGGTGCTGC CCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTAC AACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCA TGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAA GGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAG GTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGA AGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGAGATCAGCGGCGT GGAGGACAGATTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCAC GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG ACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT GCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACAGAGAGATGATC GAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCCACCTGTTTCGACG	
--	--	--

	ACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACAC CGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGC ATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACT TCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATG CAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG ACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCC GCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGG TGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCAGACACAAGCC CGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAACCAG ACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCAGAGAGAGA ATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCA GCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCA GCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG AACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACA TCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGT GCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAC AAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAG AGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGA TGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCT GATCACCCAGAGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCC GAGAGAGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCT TCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCAC CAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCAGAATGAAC ACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAGG TGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGA CTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAG ATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAA CGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCC AAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGG TGTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCA	
--	---	--

GGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACA
 GCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTG
 GCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGA
 CCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGG
 CAGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATG
 CCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGA
 CCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCCAAGAG
 AAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGG
 GACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCG
 TGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAA
 GGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCT
 GCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGCTTCGAG
 AAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACA
 AGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
 GTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGA
 ATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACG
 AGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTAC
 CTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCG
 AGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGCA
 CAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC
 GAGTTCAGCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCCAACC
 TGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGA
 CAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCAC
 CTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTT
 CAAGTACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATAC
 ACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCC
 ACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCAGAATCGA
 CCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGCAGCCCC
 AAGAAGAAGAGAAAGGTGTGACTAGCCATCACATTTA
 AAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAA
 AATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTC

	GTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAA ATTTCTTTAATCATTTCCTCTTTCTCTGTGCTTCAAT TAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
ORF de Cas9 con codones de uridina mínima utilizados con poca frecuencia en seres humanos en general; contenido de U del 12,75 %	ATGGACAAAAAATACAGCATAGGGCTAGACATAGGGA CGAACAGCGTAGGGTGGGCGGTAATAACGGACGAATA CAAAGTACCGAGCAAAAAATTCAAAGTACTAGGGAAC ACGGACCGACACAGCATAAAAAAAACCTAATAGGGG CGCTACTATTCGACAGCGGGGAAACGGCGGAAGCGAC GCGACTAAAACGAACGGCGCGACGACGATACACGCGA CGAAAAAACCGAATATGCTACCTACAAGAAATATTCA GCAACGAAATGGCGAAAGTAGACGACAGCTTCTTCCA CCGACTAGAAGAAAGCTTCCTAGTAGAAGAAGACAAA AAACACGAACGACACCCGATATTCGGGAACATAGTAG ACGAAGTAGCGTACCACGAAAAATACCCGACGATATA CCACCTACGAAAAAACTAGTAGACAGCACGGACAAA GCGGACCTACGACTAATATACCTAGCGCTAGCGCACAT GATAAAATTCCGAGGGCACTTCCTAATAGAAGGGGAC CTAAACCCGGACAACAGCGACGTAGACAACTATTCA TACAACTAGTACAAACGTACAACCAACTATTCGAAGA AAACCCGATAAACGCGAGCGGGGTAGACGCGAAAGCG ATACTAAGCGCGCGACTAAGCAAAAGCCGACGACTAG AAAACCTAATAGCGCAACTACCGGGGGAAAAA CGGGCTATTCGGGAACCTAATAGCGCTAAGCCTAGGG CTAACGCCGAACCTTCAAAGCAACTTCGACCTAGCGG AAGACGCGAACTACAATAAGCAAAGACACGTACGA CGACGACCTAGACAACCTACTAGCGCAAATAGGGGAC CAATACGCGGACCTATTCCTAGCGGCGAAAAACCTAA GCGACGCGATACTACTAAGCGACATACTACGAGTAAA CACGGAAATAACGAAAGCGCCGCTAAGCGCGAGCATG ATAAACGATACGACGAACACCACCAAGACCTAACGC	54

	TACTAAAAGCGCTAGTACGACAACAACCTACCGGAAAA ATACAAAGAAATATTCTTCGACCAAAGCAAAAACGGG TACGCGGGGTACATAGACGGGGGGGCGAGCCAAGAAG AATTCTACAAATTCATAAAACCGATACTAGAAAAAAT GGACGGGACGGAAGAATACTAGTAAACTAAACCGA GAAGACCTACTACGAAAACAACGAACGTTTCGACAACG GGAGCATACCGCACCAAATACACCTAGGGGAACTACA CGCGATACTACGACGACAAGAAGACTTCTACCCGTTCC TAAAAGACAACCGAGAAAAAATAGAAAAAATACTAAC GTTCCGAATACCGTACTACGTAGGGCCGCTAGCGCGAG GGAACAGCCGATTTCGCGTGGATGACGCGAAAAAGCGA AGAAACGATAACGCCGTGGAAC TTCGAAGAAGTAGTA GACAAAGGGGCGAGCGCGCAAAGCTTCATAGAACGAA TGACGAACTTCGACAAAAACCTACCGAACGAAAAAGT ACTACCGAAACACAGCCTACTATACGAATACTTCACGG TATACAACGAACTAACGAAAGTAAAATACGTAACGGA AGGGATGCGAAAACCGGCGTTCCTAAGCGGGGAACAA AAAAAAGCGATAGTAGACCTACTATTCAAACGAACC GAAAAGTAACGGTAAAACAATAAAAGAAGACTACTT CAAAAAAATAGAATGCTTCGACAGCGTAGAAATAAGC GGGGTAGAAGACCGATTCAACGCGAGCCTAGGGACGT ACCACGACCTACTAAAAATAATAAAAGACAAAGACTT CCTAGACAACGAAGAAAACGAAGACATACTAGAAGAC ATAGTACTAACGCTAACGCTATTTCGAAGACCGAGAAA TGATAGAAGAACGACTAAAAACGTACGCGCACCTATT CGACGACAAAGTAATGAAACAATAAAACGACGACGA TACACGGGGTGCGGGGCGACTAAGCCGAAAATAATAA ACGGGATACGAGACAAACAAAGCGGGAAAACGATACT AGACTTCCTAAAAAGCGACGGGTTCGCGAACCGAAAC TTCATGCAACTAATACACGACGACAGCCTAACGTTCAA AGAAGACATACAAAAAGCGCAAGTAAGCGGGCAAGG	
--	---	--

GGACAGCCTACACGAACACATAGCGAACCTAGCGGGG
 AGCCCGGCGATAAAAAAAGGGATACTACAAACGGTAA
 AAGTAGTAGACGAACTAGTAAAAGTAATGGGGCGACA
 CAAACCGGAAAACATAGTAATAGAAATGGCGCGAGAA
 AACCAAACGACGCAAAAAGGGCAAAAAAACAGCCGA
 GAACGAATGAAACGAATAGAAGAAGGGATAAAAGAA
 CTAGGGAGCCAAATACTAAAAGAACACCCGGTAGAAA
 ACACGCAACTACAAAACGAAAAACTATACCTATACTA
 CCTACAAAACGGGCGAGACATGTACGTAGACCAAGAA
 CTAGACATAAACCGACTAAGCGACTACGACGTAGACC
 ACATAGTACCGCAAAGCTTCCTAAAAGACGACAGCAT
 AGACAACAAAGTACTAACGCGAAGCGACAAAAACCGA
 GGGAAAAGCGACAACGTACCGAGCGAAGAAGTAGTAA
 AAAAAATGAAAACTACTGGCGACA ACTACTAAACGC
 GAACTAATAACGCAACGAAAATTTCGACAACCTAACG
 AAAGCGGAACGAGGGGGGCTAAGCGAACTAGACAAA
 GCGGGGTTCATAAACGACA ACTAGTAGAAACGCGAC
 AAATAACGAAACACGTAGCGCAAATACTAGACAGCCG
 AATGAACACGAAATACGACGAAAACGACAACTAATA
 CGAGAAGTAAAAGTAATAACGCTAAAAAGCAA ACTAG
 TAAGCGACTTCCGAAAAGACTTCCAATTCTACAAAGTA
 CGAGAAATAACA ACTACCACGCGCACGACGCGT
 ACCTAAACGCGGTAGTAGGGACGGCGCTAATAAAAAA
 ATACCCGAACTAGAAAGCGAATTTCGTATACGGGGAC
 TACAAAGTATACGACGTACGAAAAATGATAGCGAAAA
 GCGAACAAGAAATAGGGAAAGCGACGGCGAAATACTT
 CTTCTACAGCAACATAATGAACTTCTTCAAACGGAAA
 TAACGCTAGCGAACGGGGAAATACGAAAACGACCGCT
 AATAGAAACGAACGGGGAAACGGGGGAAATAGTATG
 GGACAAAGGGCGAGACTTCGCGACGGTACGAAAAGTA
 CTAAGCATGCCGCAAGTAAACATAGTAAAAAAAACGG

	AAGTACAAACGGGGGGGTTTCAGCAAAGAAAGCATACT ACCGAAACGAAACAGCGACAACTAATAGCGCGAAAA AAAGACTGGGACCCGAAAAAATACGGGGGGTTCGACA GCCCCGACGGTAGCGTACAGCGTACTAGTAGTAGCGAA AGTAGAAAAAGGGAAAAGCAAAAACTAAAAAGCGT AAAAGA ACTACTAGGGATAACGATAATGGAACGAAGC AGCTTCGAAAAAAACCCGATAGACTTCCTAGAAGCGA AAGGGTACAAAGAAGTAAAAAAAGACCTAATAATAAA ACTACCGAAATACAGCCTATTCGAACTAGAAAACGGG CGAAAACGAATGCTAGCGAGCGCGGGGGAACTACAAA AAGGGAACGA ACTAGCGCTACCGAGCAAATACGTAAA CTTCCTATACCTAGCGAGCCACTACGAAAACTAAAAG GGAGCCCGGAAGACAACGAACAAAAACA ACTATTCGT AGAACAACACAAACACTACCTAGACGAAATAATAGAA CAAATAAGCGAATTCAGCAAACGAGTAATACTAGCGG ACGCGAACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGTACAACAA ACACCGAGACAAACCGATACGAGAACAAGCGGAAAAC ATAATACACCTATTCACGCTAACGAACCTAGGGGCGCC GGCGGCGTTCAAATACTTCGACACGACGATAGACCGA AAACGATACACGAGCACGAAAGAAGTACTAGACGCGA CGCTAATACACCAAAGCATAACGGGGCTATACGAAAC GCGAATAGACCTAAGCCA ACTAGGGGGGGACGGGGGG GGGAGCCCGAAAAAAAACGAAAAGTATGA	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondien te a la SEQ ID NO: 54,	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCCG TGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACC ATGGACAAAAAATACAGCATAGGGCTAGACATAGGGA CGAACAGCGTAGGGTGGGCGGTAATAACGGACGAATA CAAAGTACCGAGCAAAAAATTCAAAGTACTAGGGAAC ACGGACCGACACAGCATAAAAAAAAACCTAATAGGGG CGCTACTATTCGACAGCGGGGAAACGGCGGAAGCGAC	55

secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB	GCGACTAAAACGAACGGCGCGACGACGATACACGCGA CGAAAAAACCGAATATGCTACCTACAAGAAATATTCA GCAACGAAATGGCGAAAGTAGACGACAGCTTCTTCCA CCGACTAGAAGAAAGCTTCCTAGTAGAAGAAGACAAA AAACACGAACGACACCCGATATTCGGGAACATAGTAG ACGAAGTAGCGTACCACGAAAAATACCCGACGATATA CCACCTACGAAAAAACTAGTAGACAGCACGGACAAA GCGGACCTACGACTAATATACCTAGCGCTAGCGCACAT GATAAAATTCCGAGGGCACTTCCTAATAGAAGGGGAC CTAAACCCGGACAACAGCGACGTAGACAAACTATTCA TACAACTAGTACAAACGTACAACCAACTATTCGAAGA AAACCCGATAAACGCGAGCGGGGTAGACGCGAAAGCG ATACTAAGCGCGCGACTAAGCAAAAGCCGACGACTAG AAAACCTAATAGCGCAACTACCGGGGGAAAAAAAAAA CGGGCTATTCGGGAACCTAATAGCGCTAAGCCTAGGG CTAACGCCGAACCTTCAAAAGCAACTTCGACCTAGCGG AAGACGCGAAACTACAATAAGCAAAGACACGTACGA CGACGACCTAGACAACCTACTAGCGCAAATAGGGGAC CAATACGCGGACCTATTCCTAGCGGCGAAAAACCTAA GCGACGCGATACTACTAAGCGACATACTACGAGTAAA CACGGAAATAACGAAAGCGCCGCTAAGCGCGAGCATG ATAAAACGATACGACGAACACCACCAAGACCTAACGC TACTAAAAGCGCTAGTACGACAACAATACTACCGGAAAA ATACAAAGAAATATTCTTCGACCAAAGCAAAAACGGG TACGCGGGGTACATAGACGGGGGGGCGAGCCAAGAAG AATTCTACAAATTCATAAAACCGATACTAGAAAAAAT GGACGGGACGGAAGAATACTAGTAAACTAAACCGA GAAGACCTACTACGAAAACAACGAACGTTTCGACAACG GGAGCATACCGCACCAAATACACCTAGGGGAACTACA CGCGATACTACGACGACAAGAAGACTTCTACCCGTTCC TAAAAGACAACCGAGAAAAAATAGAAAAAATACTAAC	
---	---	--

	GTTCCGAATACCGTACTACGTAGGGCCGCTAGCGCGAG GGAACAGCCGATTCGCGTGGATGACGCGAAAAAGCGA AGAAACGATAACGCCGTGGAAC TTCGAAGAAGTAGTA GACAAAGGGGCGAGCGCGCAAAGCTTCATAGAACGAA TGACGAACTTCGACAAAAACCTACCGAACGAAAAAGT ACTACCGAAACACAGCCTACTATACGAATACTTCACGG TATACAACGAACTAACGAAAGTAAAATACGTAACGGA AGGGATGCGAAAACCGGCGTTCCTAAGCGGGGAACAA AAAAAAGCGATAGTAGACCTACTATTCAAACGAACC GAAAAGTAACGGTAAAACAACTAAAAGAAGACTACTT CAAAAAAATAGAATGCTTCGACAGCGTAGAAATAAGC GGGGTAGAAGACCGATTCAACGCGAGCCTAGGGACGT ACCACGACCTACTAAAAATAATAAAAGACAAAGACTT CCTAGACAACGAAGAAAACGAAGACATACTAGAAGAC ATAGTACTAACGCTAACGCTATTTCGAAGACCGAGAAA TGATAGAAGAACGACTAAAAACGTACGCGCACCTATT CGACGACAAAGTAATGAAACAAC TAAAACGACGACGA TACACGGGGTG GGGGCGACTAAGCCGAAAAC TAATAA ACGGGATACGAGACAAACAAAGCGGGAAAACGATACT AGACTTCCTAAAAAGCGACGGGTTCGCGAACCGAAAC TTCATGCAACTAATACACGACGACAGCCTAACGTTCAA AGAAGACATACAAAAAGCGCAAGTAAGCGGGCAAGG GGACAGCCTACACGAACACATAGCGAACCTAGCGGGG AGCCCGGCGATAAAAAAAGGGATACTACAAACGGTAA AAGTAGTAGACGAACTAGTAAAAGTAATGGGGCGACA CAAACCGGAAAACATAGTAATAGAAATGGCGCGAGAA AACCAAACGACGCAAAAAGGGCAAAAAAACAGCCGA GAACGAATGAAACGAATAGAAGAAGGGATAAAAGAA CTAGGGAGCCAAATACTAAAAGAACACCCGGTAGAAA ACACGCAACTACAAAACGAAAAACTATACCTATACTA CCTACAAAACGGGCGAGACATGTACGTAGACCAAGAA	
--	--	--

CTAGACATAAACCGACTAAGCGACTACGACGTAGACC
 ACATAGTACCGCAAAGCTTCCTAAAAGACGACAGCAT
 AGACAACAAAGTACTAACGCGAAGCGACAAAAACCGA
 GGGAAAAGCGACAACGTACCGAGCGAAGAAGTAGTAA
 AAAAAATGAAAACTACTGGCGACAACCTACTAAACGC
 GAAACTAATAACGCAACGAAAATTCGACAACCTAACG
 AAAGCGGAACGAGGGGGGCTAAGCGAACTAGACAAA
 GCGGGGTTCATAAAACGACAACCTAGTAGAAACGCGAC
 AAATAACGAAACACGTAGCGCAAATACTAGACAGCCG
 AATGAACACGAAATACGACGAAAACGACAACTAATA
 CGAGAAGTAAAAGTAATAACGCTAAAAAGCAAACCTAG
 TAAGCGACTTCCGAAAAGACTTCCAATTCTACAAAGTA
 CGAGAAATAAACAACCTACCACCACGCGCACGACGCGT
 ACCTAAACGCGGTAGTAGGGACGGCGCTAATAAAAAA
 ATACCCGAACTAGAAAGCGAATTTCGTATACGGGGAC
 TACAAAGTATACGACGTACGAAAAATGATAGCGAAAA
 GCGAACAAGAAATAGGGAAAGCGACGGCGAAATACTT
 CTTCTACAGCAACATAATGAACTTCTTCAAAACGGAAA
 TAACGCTAGCGAACGGGGAAATACGAAAACGACCGCT
 AATAGAAACGAACGGGGAAACGGGGGAAATAGTATG
 GGACAAAGGGCGAGACTTCGCGACGGTACGAAAAGTA
 CTAAGCATGCCGCAAGTAAACATAGTAAAAAAAACGG
 AAGTACAAACGGGGGGGTTCAGCAAAGAAAGCATACT
 ACCGAAACGAAACAGCGACAACTAATAGCGCGAAAA
 AAAGACTGGGACCCGAAAAAATACGGGGGGTTCGACA
 GCCCGACGGTAGCGTACAGCGTACTAGTAGTAGCGAA
 AGTAGAAAAAGGGAAAAGCAAAAACTAAAAAGCGT
 AAAAGAACTACTAGGGATAACGATAATGGAACGAAGC
 AGCTTCGAAAAAAACCCGATAGACTTCCTAGAAGCGA
 AAGGGTACAAAGAAGTAAAAAAAAGACCTAATAATAA
 ACTACCGAAATACAGCCTATTCGAACTAGAAAACGGG

	CGAAAACGAATGCTAGCGAGCGCGGGGGAACCTACAAA AAGGGAACGAACCTAGCGCTACCGAGCAAATACGTAAA CTTCCTATACCTAGCGAGCCACTACGAAAACTAAAAG GGAGCCCGGAAGACAACGAACAAAAACAACCTATTCGT AGAACAACACAAACACTACCTAGACGAAATAATAGAA CAAATAAGCGAATTCAGCAAACGAGTAATACTAGCGG ACGCGAACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGTACAACAA ACACCGAGACAAACCGATACGAGAACAAGCGGAAAAC ATAATACACCTATTCACGCTAACGAACCTAGGGGCGCC GGCGGCGTTCAAATACTTCGACACGACGATAGACCGA AAACGATACACGAGCACGAAAGAAGTACTAGACGCGA CGCTAATACACCAAAGCATAACGGGGCTATACGAAAC GCGAATAGACCTAAGCCAACTAGGGGGGGACGGGGGG GGGAGCCCGAAAAAAAAAACGAAAAGTATGACTAGCCA TCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAG AGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTT TTCTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAA AAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTG TGCTTCAATTAATAAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Transcripto de Cas9 con AGG como los tres primeros nucleótidos para su uso con CleanCap™, UTR 5'de HSD, ORF correspondien	AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCG TGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACC ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAA CAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATA CAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAAC ACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAG CACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAG AAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTC AGCAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAGCTTCTTCC ACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCTGAAGAAGACAA	56

te a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB	GAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTC GACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCT ACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAA GGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACAC ATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAG ACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTT CATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACCAGCTGTTTGAAG AAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGC AATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTG GAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGA ACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG ACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCA GAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACG ACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGA CCAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCAAAGAACCTG AGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCA ACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCAT GATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACA CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGG ATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAA GAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT GGACGGAACAGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACAGA GAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACG GAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCA CGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCC TGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGAC ATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGA AGAAACAATCACACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTC GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAA	
---	--	--

	TGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGT CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAG TCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACACAGA AGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAG AAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACA GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTT CAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGC GGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACAT ACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTT CCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC ATCGTCCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACAGAGAAAT GATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTC GACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGAT ACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAA CGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG GACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCTGCAAACAGAACT TCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAG GAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAG ACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAG CCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAG GTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACA AGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAA CCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGA AAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACT GGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAAC ACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTG GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACA TCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGAC AACAAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGA AAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGA	
--	--	--

AGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAA
 GCTGATCACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAAG
 GCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCA
 GGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGA
 TCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT
 GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGA
 GAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCA
 GCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGA
 GAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACC
 TGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTA
 CCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTAC
 AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
 AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTT
 CTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCA
 CACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT
 CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGAC
 AAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGA
 GCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGT
 CCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCG
 AAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAG
 GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCC
 CGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTC
 GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAG
 GAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCT
 TCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGG
 ATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTG
 CCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAA
 AGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGG
 AAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTC
 CTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA
 GCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGA

	ACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAG ATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAAGCA CAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGC AGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAG AGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACAC TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGA AGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCA CATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTT CTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAA ACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTG CTTCAATTAATAAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de CMV, ORF correspondien te a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB	GGGCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGA CCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGC GGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTG CCAAGAGTGACTACCGTCCTTGACACGGCCACCATGG ACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAA CAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAG GTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAG ACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT GCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGA CTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGA AAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCA ACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAG ACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCTGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACG AAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCA	57

	CCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGAT CAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTG AACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCC AGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCTGAAGAAAA CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATC CTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAA ACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAAGAAGAACGG ACTGTTCTGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGA CACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGA CGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGAC GACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCACT ACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGA CGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACA GAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCT GAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTAC AAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACG CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATT CTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGAC GGAACAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAG ACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAG CATCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCA ATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAA GGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTC AGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGA AACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGAC AAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGA CAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCT GCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCT	
--	--	--

	ACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAG AATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAG AAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAA AGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAA GAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGA GTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACC ACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCT GGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATC GTCCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACAGAGAAATGA TCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCTGA CGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATAC ACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACG GAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGA CTTCTGAAAGAGCGACGGATTCTGCAAACAGAACTTC ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGG AAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGA CAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGC CCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGG TCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAA GCCGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAAC CAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAA AGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTG GGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACA CACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTG CAGAACGGAAGAGACATGTACGTGACCGAGGAACTGG ACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCCACAT CGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGAC AACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGA AAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGA AGATGAAGAATACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAA GCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAG	
--	---	--

	GCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCA GGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGA TCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGA GAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCA GCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGA GAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACC TGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTA CCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTAC AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTT CTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCA CACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGAC AAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGA GCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGT CCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCG AAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAG GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCC CGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTC GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAG GAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCT TCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGG ATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTG CCGAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAGAA AGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGG AAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTC CTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA GCCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCTGA ACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAG ATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG	
--	--	--

	CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCA CAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGC AGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAG AGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACAC TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGA AGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCA CATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTT CTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAA ACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTG CTTCAATTAATAAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HBB, ORF correspondien te a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de HBB	GGGacatttgcttctgacacaactgtgttcactagcaacctcaacagacaccggatctgc caccATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCG GAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGA ATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGA AACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCG GAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGC AACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACAC AAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATC TTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTT CCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGAC AAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCG TCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAAT CTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCAC ACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGG AGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTG TTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGA	58

	AGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAG GCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGAC TGGA AACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAA GAACGGACTGTTTCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTG GGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGG CAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATA CGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGA GACCAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCAAAGAACC TGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTC AACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCA TGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGAC ACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAA AAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACG GATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGA AGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAG ATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACA GAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAA CGGAAGCATCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTG CACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTT CCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTG ACATTCAGAATCCCGTACTACGTCCGACCGCTGGCAAG AGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGC GAAGAAACAATCACACCGTGGA ACTTCGAAGAAGTCG TCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAG AATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAG GTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC AGTCTACAACGA ACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACA GAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAAC AGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAA CAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTAC TTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCA	
--	--	--

	GCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAAC ATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGAC TTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAG ACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGA AATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTG TTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAA GATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGAT CAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATC CTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAA ACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGG GAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGG AAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTC AAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGAC ACAAGCCGGAACACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGA AAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAG AGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGA ACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAA AACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACT ACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGA ACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGAC CACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCAT CGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGA GGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCA AGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGC AAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACA AAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAG GCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGAC AGATCACAAAGCACGTTCGCACAGATCCTGGACAGCAG AATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATC AGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGG	
--	---	--

	TCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTC AGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCAT ACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAA GTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGAC TACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGA GCCAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTT CTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAA TCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCT GATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGG GACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCC TGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGA AGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTG CCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGA AGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAG CCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTTCGTGCAAAGG TCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCA AGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAG CTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAG GGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGC TGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAG AAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAG GGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACT TCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGG AAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTC GAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAAC AGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGA CGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAG CACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAAC ATCATCCACCTGTTTCACTGACAAACCTGGGAGCACC GGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGA AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAA	
--	--	--

	CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAC AAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGA GGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGctagcgctgc tttcttgctgtccaatttctattaaaggttcctttgttcctaagtccaactactaaactgggggat attatgaagggccttgagcatctggattctgcctaataaaaaacattattttcattgcctcgag	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de XBG, ORF correspondien te a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de XBG	GGGagctcagaataaacgctcaacttggccgatctgccacCATGGACAAG AAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCG TCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCC GAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGT TCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAA GAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAA CAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAA ATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGG AAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGA AAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTC GCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGA GAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCT GAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTG GTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGA TCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAG CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTG ATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGT TCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACC GAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCA AAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACC TGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGC AGACCTGTTCTTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCA	59

	ATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAA TCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAG ATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAG GCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGG AAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGG ATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTAC AAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA CAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCT GCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATC CCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCT GAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGAC AACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAA TCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAG CAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACA ATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGG GAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAA CTTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATG AGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGG CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGT CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAG ATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCG AAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGA CCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGAC AACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCC TGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGA AGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGAC AAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAG GATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAT CAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC	
--	---	--

CTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTCATGC AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGA CATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGC CTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGG CAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGT CGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCG GAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGA CAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAA TGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAA GCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACA GCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG AACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACA TCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTC CCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACA AGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTG ATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATT CATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACA AAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACA CAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGT CAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGAC TTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAAT CAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAAC GCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGT CTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAG GAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACA GCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTG GCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAA	
---	--

	CAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGG AAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATG CCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGA CAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAG AAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGG GACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAG TCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAA GGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACT GCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAA AAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACA AGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA GTACAGCCTGTTTGAAGTGGAAAACGGAAGAAAGAGA ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACG AACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTAC CTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGG AAGACAACGAACAGAAAGCAGCTGTTTCGTGAACAGCA CAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACC TGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGA CAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCAC CTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATT CAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATAC ACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAAACTGATCC ACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGA CCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCG AAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGctagcaccagcctcaagaacaccg aatggagtcttaagctacataataaccaacttacactttacaaaatgtgtcccccaaatgta gccattcgtatctgctcctaataaaaagaaagtttcttcacattctctcgag	
Transcripto de Cas9 con	AGGaagctcagaataaacgctcaactttggccggatctgccacCATGGACAAG AAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCG	60

AGG como los tres primeros nucleótidos para su uso con CleanCap™, UTR 5' de XBG, ORF correspondiente a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de XBG	TCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCC GAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGT TCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAA GAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAA CAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAA ATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGG AAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGA AAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTC GCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGA GAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCT GAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCC GGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTG GTCCAGACATACAACCAGCTGTTTGAAGAAAACCCGA TCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAG CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTG ATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGT TCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACC GAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCA AAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACC TGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGC AGACCTGTTTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCA ATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAA TCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAG ATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAG GCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAGTACAAGG AAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGG ATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTAC AAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA CAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCT	
--	---	--

	GCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATC CCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCT GAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGAC AACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAA TCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAG CAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACA ATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGG GAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAA CTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCG AAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATG AGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGG CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGT CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAG ATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCG AAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGA CCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGAC AACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCC TGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGA AGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGAC AAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAG GATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAT CAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC CTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAACTTCATGC AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGA CATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGC CTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGG CAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGT CGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCG GAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGA CAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAA	
--	--	--

	TGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAA GCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACA GCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG AACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACA TCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTC CCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACA AGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTG ATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATT CATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACA AAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACA CAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGT CAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGAC TTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAAT CAACA ACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAAC GCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGT CTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAG GAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACA GCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTG GCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAA CAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGG AAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATG CCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGA CAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAG AAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGG GACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAG TCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAA GGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACT	
--	---	--

	GCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAA AAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACA AGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA GTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGA ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACG AACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTAC CTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGG AAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTGTAACAGCA CAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACC TGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGA CAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCAC CTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATT CAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATAC ACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCC ACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGA CCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCG AAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGctagcaccagcctcaagaacacccg aatggagtctctaagctacataataaccaacttacactttacaaaatgtgtcccccaaatgta gccattcgtatctgctcctaataaaaagaaagtttcttcacattctctcgag	
Transcripto de Cas9 con AGG como los tres primeros nucleótidos para su uso con CleanCap™, UTR 5'de HSD, ORF	AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCG TGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTTCGGATCCGCCACC ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAA CAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATA CAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAAC ACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAG CACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAG AAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTC AGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCC	61

correspondien te a la SEQ ID NO: 4, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB	ACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAA GAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTC GACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCT ACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAA GGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACAC ATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAG ACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTT CATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTGAAG AAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGC AATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTG GAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGA ACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG ACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCA GAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACG ACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGA CCAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCAAAGAACCTG AGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCA ACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCAT GATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACA CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGG ATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAA GAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT GGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGA GAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACG GAAGCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCA CGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCC TGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGAC ATTCAGAATCCCGTACTACGTTCGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGA AGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTC	
---	---	--

	GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAA TGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGT CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAG TCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGA AGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAG AAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACA GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTT CAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGC GGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACAT ACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTT CCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC ATCGTCCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACAGAGAAAT GATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTC GACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGAT ACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAA CGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG GACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCTGCAAACAGAACT TCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAG GAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAG ACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAG CCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAG GTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACA AGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAA CCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGA AAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACT GGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAAC ACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTG GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACA TCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGAC AACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGA	
--	--	--

	AAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGA AGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAA GCTGATCACACAGAGAAAAGTTCGACAACCTGACAAAG GCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCA GGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGA TCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGA GAAGTCAAGGTCATCAGCTGAAGAGCAAGCTGGTCA GCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGA GAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACC TGAACGCAGTCGTGGAACAGCACTGATCAAGAAGTA CCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTAC AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTT CTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCA CACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGAC AAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGA GCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAAGT CCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCG AAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAG GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCC CGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTC GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAG GAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCT TCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGG ATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTG CCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAA AGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGG AAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTC CTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAA	
--	--	--

	GCCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTCGA ACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAG ATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCA CAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC ATCCACCTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGC AGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAG AGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACAC TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGA AGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCA CATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTT CTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAA ACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTG CTTCAATTAATAAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Secuencia de poli-A 30/30/39	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	62
Secuencia 100 de poli-A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	63
ARN guía G209	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGCU AGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*m U*U	64
ORF que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis	ATGGCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATCAACTACATCCT GGGACTGGACATCGGAATCGCATCGGTCGGATGGGCA ATGGTCGAAATCGACGAAGAAGAAAACCCGATCAGAC TGATCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGA	65

AGTCCCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGA
 AGACTGGCAAGATCGGTCAGAAGACTGACAAGAAGAA
 GAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTGAA
 GAGAGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACCTTCGACGAA
 AACGGACTGATCAAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGC
 AGCTGAGAGCAGCAGCACTGGACAGAAAGCTGACACC
 GCTGGAATGGTCGGCAGTCCTGCTGCACCTGATCAAGC
 ACAGAGGATACCTGTTCGCAGAGAAAGAACGAAGGAGA
 AACAGCAGACAAGGAACTGGGAGCACTGCTGAAGGGA
 GTCGCAGGAAACGCACACGCACTGCAGACAGGAGACT
 TCAGAACACCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTCGA
 AAAGGAATCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGAC
 TACTCGCACACATTCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAG
 AACTGATCCTGCTGTTCGAAAAGCAGAAGGAATTCGG
 AAACCCGCACGTCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATC
 GAAACACTGCTGATGACACAGAGACCGGCACTGTTCGG
 GAGACGCAGTCCAGAAGATGCTGGGACACTGCACATT
 CGAACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAACACATAC
 ACAGCAGAAAGATTTCATCTGGCTGACAAAGCTGAACA
 ACCTGAGAATCCTGGAACAGGGATCGGAAAGACCGCT
 GACAGACACAGAAAGAGCAAACTGATGGACGAACCG
 TACAGAAAGTCGAAGCTGACATACGCACAGGCAAGAA
 AGCTGCTGGGACTGGAAGACACAGCATTCTTCAAGGG
 ACTGAGATACGGAAGGACAACGCAGAAAGCATCGACA
 CTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCTCGAGAG
 CACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAGTCGCC
 GCTGAACCTGTTCGCCGGAACCTGCAGGACGAAATCGGA
 ACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACAGACGAAGACATCAC
 AGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAATCCTG
 GAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTTCGT
 CCAGATCTCGCTGAAGGCACTGAGAAGAATCGTCCCG

	CTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAAGCATGCG CAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAGAACAC AGAAGAAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGAC GAAATCAGAAACCCGGTCGTCCTGAGAGCACTGTTCG AGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTCAGAAGATA CGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGA GAAGTCGGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCG AAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGAAA AGGCAGCAGCAAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAACTT CGTCGGAGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTG AGACTGTACGAACAGCAGCACGGAAAGTGCCTGTACT CGGGAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACTGAACGAAAA GGGATACGTCGAAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGA GAACATGGGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGT CCTGGGATCGGAAAACCAGAACAAGGGAAACCAGACA CCGTACGAATACTTCAACGGAAAGGACAACCTCGAGAG AATGGCAGGAATTCAAGGCAAGAGTCGAAACATCGAG ATTCCCGAGATCGAAGAAGCAGAGAATCCTGCTGCAG AAGTTCGACGAAGACGGATTCAAGGAAAGAAACCTGA ACGACACAAGATACGTCAACAGATTCTGTGCCAGTTC GTCGCAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAG AAGAGAGTCTTCGCATCGAACGGACAGATCACAAACC TGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGGTCAGAGC AGAAAACGACAGACACCACGCACTGGACGCAGTCGTC GTCGCATGCTCGACAGTCGCAATGCAGCAGAAGATCA CAAGATTCGTCAGATACAAGGAAATGAACGCATTCTGA CGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAGAAGTCCTG CACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATTCTT CGCACAGGAAGTCATGATCAGAGTCTTCGGAAAGCCG GACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAAGCAGACACACTGG AAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGCTGTCGTC	
--	--	--

	GAGACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTCACACCGCTG TTCGTCTCGAGAGCACCGAACAGAAAGATGTCGGGAC AGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCAAAGAGACT GGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCCGCTGACA CAGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACA GAGAAAGAGAACCGAAGCTGTACGAAGCACTGAAGGC AAGACTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCA TTCGCAGAACCGTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAA ACAGAACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAGAGTCGAACA GGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTCAGAAACCACAAC GGAATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACG TCTTCGAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATC TACTCGTGGCAGGTCGCAAAGGGAATCCTGCCGGACA GAGCAGTCGTCCAGGGAAAGGACGAAGAAGACTGGCA GCTGATCGACGACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGC ACCCGAACGACCTGGTCGAAGTCATCACAAGAAGGC AAGAATGTTTCGGATACTTCGCATCGTGCCACAGAGGA ACAGGAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGACC ACAAGATCGGAAAGAACGGAATCCTGGAAGGAATCGG AGTCAAGACAGCACTGTCGTTCCAGAAGTACCAGATC GACGAACTGGGAAAGGAAATCAGACCGTGCAGACTGA AGAAGAGACCGCCGGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGC AGACGGATCGGAATTCGAATCGCCGAAGAAGAAGAGA AAGGTCGAATGA	
ORF que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis (sin codones de inicio o terminación;	GCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATCAACTACATCCTGGG ACTGGACATCGGAATCGCATCGGTTCGGATGGGCAATG GTGCAAATCGACGAAGAAGAAAACCCGATCAGACTGA TCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAGT CCCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGA CTGGCAAGATCGGTCAGAAGACTGACAAGAAGAAGAG CACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTGAAGAG	66

adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)	AGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACCTTCGACGAAAAC GGACTGATCAAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGCAGC TGAGAGCAGCAGCACTGGACAGAAAGCTGACACCGCT GGAATGGTCGGCAGTCCTGCTGCACCTGATCAAGCACA GAGGATACCTGTCTGCAGAGAAAGAACGAAGGAGAAAC AGCAGACAAGGAACTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTC GCAGGAAACGCACACGCACTGCAGACAGGAGACTTCA GAACACCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTCGAAAA GGAATCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTAC TCGCACACATTCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAAC TGATCCTGCTGTTCGAAAAGCAGAAGGAATTCGAAA CCCGCACGTCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAA ACACTGCTGATGACACAGAGACCGGCACTGTCTGGGAG ACGCAGTCCAGAAGATGCTGGGACACTGCACATTCGA ACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAACACATACACA GCAGAAAGATTCTATCTGGCTGACAAAGCTGAACAACC TGAGAATCCTGGAACAGGGATCGGAAAGACCGCTGAC AGACACAGAAAGAGCAAACTGATGGACGAACCGTAC AGAAAGTCGAAGCTGACATACGCACAGGCAAGAAAGC TGCTGGGACTGGAAGACACAGCATTCTTCAAGGGACT GAGATACGGAAAGGACAACGCAGAAAGCATCGACACTG ATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCTCGAGAGCAC TGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAAGTCGCCGCT GAACCTGTCTCGCCGGAACCTGCAGGACGAAATCGGAACA GCATTCTCGCTGTTCAAGACAGACGAAGACATCACAG GAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAAATCCTGGA AGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTTCGTCC AGATCTCGCTGAAGGCACTGAGAAGAATCGTCCCGCT GATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAAGCATGCGCA GAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAGAACACAG AAGAAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGA	
--	--	--

	AATCAGAAACCCGGTCGTCCTGAGAGCACTGTCGCAG GCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTCAGAAGATACG GATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGA AGTCGGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAA AAGAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGAAAAG GCAGCAGCAAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGT CGGAGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGA CTGTACGAACAGCAGCACGGAAAGTGCCTGTACTCGG GAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACTGAACGAAAAGG GATACGTCGAAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGA ACATGGGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCCT GGGATCGGAAAACCAGAACAAGGGAAACCAGACACC GTACGAATACTTCAACGGAAAGGACAACTCGAGAGAA TGGCAGGAATTCAAGGCAAGAGTCGAAACATCGAGAT TCCCGAGATCGAAGAAGCAGAGAATCCTGCTGCAGAA GTTTCGACGAAGACGGATTCAAGGAAAGAAACCTGAAC GACACAAGATACGTCAACAGATTCTGTGCCAGTTCGT CGCAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAA GAGAGTCTTCGCATCGAACGGACAGATCACAAACCTG CTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGGTCAGAGCAG AAAACGACAGACACCACGCACTGGACGCAGTCGTCGT CGCATGCTCGACAGTCGCAATGCAGCAGAAGATCACA AGATTTCGTCAGATACAAGGAAATGAACGCATTTCGACG GAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAGAAGTCCTGCA CCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATTCTTCG CACAGGAAGTCATGATCAGAGTCTTCGGAAAGCCGGA CGGAAAGCCGGAATTTCGAAGAAGCAGACACACTGGAA AAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGCTGTCGTCGA GACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTCACACCGCTGTTC GTCTCGAGAGCACCGAACAGAAAGATGTCTGGGACAGG GACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCAAAGAGACTGGA	
--	---	--

	CGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCCGCTGACACAG CTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAG AAAGAGAACCGAAGCTGTACGAAGCACTGAAGGCAAG ACTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCATTC GCAGAACCGTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACA GAACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGT CCAGAAGACAGGAGTCTGGGTCAGAAACCACAACGGA ATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTCT TCGAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATCTA CTCGTGGCAGGTCGCAAAGGGAATCCTGCCGGACAGA GCAGTCGTCCAGGGAAAGGACGAAGAAGACTGGCAGC TGATCGACGACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGCAC CCGAACGACCTGGTCGAAGTCATCACAAGAAGGCAA GAATGTTCCGATACTTCGCATCGTGCCACAGAGGAACA GGAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGACCACA AGATCGGAAAGAACGGAATCCTGGAAGGAATCGGAGT CAAGACAGCACTGTCGTTCCAGAAGTACCAGATCGAC GAACTGGGAAAGGAAATCAGACCGTGCAGACTGAAGA AGAGACCGCCGGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCAGA CGGATCGGAATTCTGAATCGCCGAAGAAGAAGAGAAAG GTCGAA	
Transcripto que comprende la SEQ ID NO: 65 (que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis)	GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTG GATCCGCCACCATGGCAGCATTCAAGCCGAAGTTCGATC AACTACATCCTGGGACTGGACATCGGAATCGCATCGGT CGGATGGGCAATGGTCGAAATCGACGAAGAAGAAAAC CCGATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGA AAGAGCAGAAGTCCCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCA ATGGCAAGAAGACTGGCAAGATCGGTCAGAAGACTGA CAAGAAGAAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAA GACTGCTGAAGAGAGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAA CTTCGACGAAAACGGACTGATCAAGTCGCTGCCGAAC	67

	ACACCGTGGCAGCTGAGAGCAGCAGCACTGGACAGAA AGCTGACACCGCTGGAATGGTCGGCAGTCCTGCTGCAC CTGATCAAGCACAGAGGATACCTGTCGCAGAGAAAGA ACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGAACTGGGAGCAC TGCTGAAGGGAGTCGCAGGAAACGCACACGCACTGCA GACAGGAGACTTCAGAACACCGGCAGAACTGGCACTG AACAAGTTCGAAAAGGAATCGGGACACATCAGAAACC AGAGATCGGACTACTCGCACACATTCTCGAGAAAGGA CCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTTCGAAAAGCAG AAGGAATTCGGAAACCCGCACGTCTCGGGAGGACTGA AGGAAGGAATCGAAACACTGCTGATGACACAGAGACC GGCACTGTCTGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGCTGGGA CACTGCACATTTCGAACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAA AGAACACATACACAGCAGAAAGATTCATCTGGCTGAC AAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGAACAGGGATCG GAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACACTGA TGGACGAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTGACATACGC ACAGGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGACACAGCA TTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAACGCAG AAGCATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGC AATCTCGAGAGCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGAC AAGAAGTCGCCGCTGAACCTGTCGCCGGAAGTGCAGG ACGAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACAGA CGAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAG CCGGAAATCCTGGAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTT CGACAAGTTCGTCCAGATCTCGCTGAAGGCACTGAGA AGAATCGTCCCGCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACG ACGAAGCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCACTACGG AAAGAAGAACACAGAAGAAAAGATCTACCTGCCGCCG ATCCCGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTCGTCCTGA GAGCACTGTCTGCAGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGT	
--	--	--

CGTCAGAAGATACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATC GAAACAGCAAGAGAAGTCGGAAAGTCGTTCAAGGACA GAAAGGAAATCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAA AGGACAGAGAAAAGGCAGCAGCAAAGTTCAGAGAAT ACTTCCCGAACTTCGTCGGAGAACCGAAGTCGAAGGA CATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAACAGCAGCACGGA AAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAAATCAACCTGGGAA GACTGAACGAAAAGGGATACGTCGAAATCGACCACGC ACTGCCGTTCTCGAGAACATGGGACGACTCGTTCAACA ACAAGGTCTGGTCTGGGATCGGAAAACCAGAACAA GGGAAACCAGACACCGTACGAATACTTCAACGGAAAG GACAACTCGAGAGAATGGCAGGAATTCAAGGCAAGAG TCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAAGCAGAG AATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGATTCAAG GAAAGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGAT TCCTGTGCCAGTTCGTCGCAGACAGAATGAGACTGACA GGAAAGGGAAAGAAGAGAGTCTTCGCATCGAACGGAC AGATCACAAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAG AAAGGTCAGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACTG GACGCAGTCGTCGTCGCATGCTCGACAGTCGCAATGCA GCAGAAGATCACAAGATTTCGTCAGATACAAGGAAATG AACGCATTTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAG GAGAAGTCCTGCACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCC GTGGGAATTCTTCGCACAGGAAGTCATGATCAGAGTCT TCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAAGC AGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAA AAGCTGTCGTCGAGACCGGAAGCAGTCCACGAATACG TCACACCGCTGTTCGTCTCGAGAGCACCGAACAGAAA GATGTCTGGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCG GCAAAGAGACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAG TCCCGCTGACACAGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAA	
--	--

	GATGGTCAACAGAGAAAGAGAACCGAAGCTGTACGAA GCACTGAAGGCAAGACTGGAAGCACACAAGGACGACC CGGCAAAGGCATTTCGCAGAACCGTTCTACAAGTACGA CAAGGCAGGAAACAGAACACAGCAGGTCAAGGCAGTC AGAGTCGAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTCA GAAACCACAACGGAATCGCAGACAACGCAACAATGGT CAGAGTAGACGTCTTCGAAAAGGGAGACAAGTACTAC CTGGTCCCGATCTACTCGTGGCAGGTGCGAAAGGGAAT CCTGCCGGACAGAGCAGTCGTCCAGGGAAAGGACGAA GAAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTTCAA GTTCTCGCTGCACCCGAACGACCTGGTCGAAGTCATCA CAAAGAAGGCAAGAATGTTTCGGATACTTCGCATCGTG CCACAGAGGAACAGGAAACATCAACATCAGAATCCAC GACCTGGACCACAAGATCGGAAAGAACGGAATCCTGG AAGGAATCGGAGTCAAGACAGCACTGTCGTTCCAGAA GTACCAGATCGACGAACCTGGGAAAGGAAATCAGACCG TGCAGACTGAAGAAGAGACCGCCGGTCAGATCCGGAA AGAGAACAGCAGACGGATCGGAATTCGAATCGCCGAA GAAGAAGAGAAAGGTGCAATGATAGCTAGCTCGAGTC TAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTG TGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCC CCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCT GTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTG TCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGG GGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATA GCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG	
Secuencia de aminoácidos de Cas9 de Neisseria meningitidis	MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDL GVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRRAHRL RTRRLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALD RKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGAL LKGVAGNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRS	68

		DYSHTFSRKDLQAEILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIET LLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAPKAAKNTYTAE RFIWLTKLNNLRILEQGSRPLTDTERATLMDEPYRKS TYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAY HAISRALEKEGLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDED ITGRLKDRIQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLME QGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPV VLRALSQARKVINGVRRYGGSPARIHIETAREVGKSFKDR KEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPSKSDILKL RLYEQQHGKCLYSGKEINLGRLENEGYVEIDHALPFSRT WDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREW QEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEEDGFKERNLNDTRY VNRFLCQFVADRMRLTGKGKKRVFASNGQITNLLRGFW GLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYK EMNAFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRV FGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLAEKLSSRPEAVHEYVTP LFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSARLDEGVSVLRVPLT QLKLDLEKMNREREPPLYEALKARLEAHKDDPAKAF AEPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVVVRNHNG IADNATMVRVDVFEKGDYKYLVPYISWQVAKGILPDRA VVQKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMF GYFASCHRG TG NINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALS QKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTADGSEFESPKK KRKVE	
ARN G390	guía	mG*mC*mC*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	69
ARN G502	guía	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGG	70

		CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
ARN G509	guía	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGUCCGGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	71
ARN G534	guía	mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	72

* = enlace PS; “m” = nucleótido 2'-O-Me

Secuencias de cebador de NGS G000282 de ratón

5

Cebador

directo:

CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTTTTGTTCCAGAGTCTATCACCG

Cebador inverso:

GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACACGAATAAGAGCAAATGGGAAC

10

Secuencias de cebador de NGS G000390 de rata

Cebador

directo:

CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCATTTTCATGAGACCGAAAACA

Cebador

inverso:

GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTACAGTAGAGCTGTACATAAACTT

15

Secuencia de GFP:

TCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCAC
 AGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTT
 GGCGGGTGTCGGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACC
 ATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATT
 5 CGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACG
 CCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCC
 CAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGTCCCG
 CAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCC
 ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC
 10 GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC
 GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCC
 TCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCA
 GCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC
 AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTG
 15 AACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAG
 CTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGC
 ATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
 CACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACC
 TGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCT
 20 GGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATAGGAA
 TTATGCAGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGA
 AAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCT
 GTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAA
 AATGGAAAGAACCTCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 25 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AATCTAGACTTAAGCTTGATGAGCTCTAGCTTGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT
 GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
 GCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTT
 CCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGG
 30 CGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTC
 GGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG

GGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAA
 AGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCG
 ACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT
 GGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTT
 5 TCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGT
 AGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGC
 CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA
 GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGA
 AGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAA
 10 GCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGT
 AGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAG
 ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATT
 TTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTT
 TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT
 15 GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGT
 GTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGA
 GACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAG
 CGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGC
 TAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCG
 20 TGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCCA
 GTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGT
 CAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTA
 CTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA
 GAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGC
 25 CACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTC
 AAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCAACTGATCTT
 CAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGC
 AAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATAT
 TATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA
 30 AAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAA
 ACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTGCG