

MÉTODO IN VITRO DE ADMINISTRACIÓN DE ARNM MEDIANTE EL USO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 62/566,232, presentada el 29 de septiembre de 2017, cuyo contenido se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

[0002] La introducción de cambios genéticos en células madre, que incluyen células madre hematopoyética (HSC) y su progenie es de interés para los métodos de terapia genética y edición génica. Las células madre, tales como HSC, tienen capacidad de proliferación que se pierde en células maduras y progenitores comprometidos, lo cual las hace particularmente útiles para las tecnologías de edición génica. La capacidad de modificar HSC y célula madre *in vitro* es importante, por ejemplo, y son necesarios métodos para administrar agentes biológicos a HSC y otras células madre en cultivo. Hay una necesidad particular de tecnologías de administración para HSC humanas en cultivo.

[0003] Las HSC son indispensables para la producción de sangre de por vida. Las HSC pueden sustentar la hematopoyesis funcional y a largo plazo debido a su capacidad tanto de diferenciar como de producir progenie madura de linajes de sangre totalmente mieloides y linfoides o para autorrenovarse para reemplazar células que se vuelven progresivamente comprometidas con la diferenciación. Las HSC se pueden usar para restaurar las células sanguíneas e inmunitarias en receptores de trasplantes, en pacientes inmunocomprometidos o en otros pacientes. Específicamente, el trasplante autólogo o alogénico de HSC puede utilizarse para el tratamiento de pacientes con enfermedades autoinmunitarias e inmunodeficientes hereditarias y diversos trastornos hematopoyéticos para reconstituir los linajes de células hematopoyéticas y la defensa del sistema inmunitario.

[0004] Los métodos para administrar componentes de sistemas de edición génica CRISPR/Cas a HSC en cultivo son de particular interés. Se proporcionan en la presente métodos para administrar ARN, incluso componentes del sistema CRISPR/Cas a cultivos celulares hematopoyéticos que incluyen HSC. Los métodos administran proteína activa a células madre, que incluyen HSC, cultivadas *in vitro* e incluye poner en contacto las células con una composición de nanopartículas lipídicas (LNP) que proporciona un ARNm que codifica la proteína. Además, se proporcionan métodos de edición génica en células madre, tales como HSC *in vitro*, y métodos para producir una célula modificada genéticamente.

[0005] En algunas modalidades, se proporcionan métodos de edición génica en HSC *in vitro*, y métodos para producir una célula HSC modificada genéticamente. En modalidades adicionales, se

proporciona en la presente un método para administrar un ARNm a una célula progenitora y/o madre hematopoyética (HSPC) o una población de HSPC. En algunas modalidades, el método comprende preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende el ARNm, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En algunas modalidades, el método comprende, además, poner en contacto la HSPC o la población de HSPC con la composición de LNP preincubada *in vitro*. En algunas modalidades, el método comprende, además, cultivar la HSPC o la población de HSPC *in vitro*. En algunas modalidades, el método da como resultado la administración del ARNm a la HSPC o la población de HSPC.

[0006] En algunas modalidades, se proporciona en la presente un método para introducir un ARNg o un ARNm de nucleasa Cas en una célula madre, por ejemplo, una HSPC. En algunas modalidades, el método comprende preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende el ARNm de nucleasa Cas, un ARNg, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En algunas modalidades, el método comprende, además, poner en contacto la HSPC con la composición de LNP preincubada *in vitro*. En algunas modalidades, el método comprende, además, cultivar la HSPC. En algunas modalidades, el método da como resultado la introducción del ARNg o ARNm de nucleasa Cas a la HSPC.

[0007] En algunas modalidades, se proporciona en la presente un método para producir una célula madre modificada genéticamente, por ejemplo, HSPC, *in vitro*. En algunas modalidades, el método comprende preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende un ARNm de nucleasa Cas, un ARNg, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En algunas modalidades, el método comprende, además, poner en contacto la HSPC con la composición de LNP preincubada *in vitro*. En algunas modalidades, el método comprende, además, cultivar la HSPC *in vitro*. En algunas modalidades, el método da como resultado la producción de una HSPC modificada genéticamente.

[0008] En algunas modalidades, se proporciona un método para administrar un ARNm a una HSPC o una población de HSPC, el método comprende preincubar una composición de LNP con un factor de suero, poner en contacto la célula o población con la composición de LNP preincubada *in vitro*; y cultivar la célula o población *in vitro*; mediante lo cual se administra el ARNm a la HSPC. En algunas modalidades, la HSPC es una HSC. En algunas modalidades, el método administra un ARNm, tal como un ARNm de nucleasa Cas, a una población de HSPC (por ejemplo, una población de células CD34+). En determinadas modalidades, un ARN guía (ARNg), opcionalmente en combinación con un ARNm de

nucleasa Cas, se administra a las células.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0009] La Fig. 1 muestra la administración de ARNm de proteína fluorescente verde (GFP) en células de médula ósea CD34+ mediante el uso de LNP.

5 [0010] La Fig. 2 muestra que la administración de ARNm en células de médula ósea CD34+ depende de la preincubación en suero.

[0011] Las Fig. 3A y 3B muestran la edición de *B2M* en células de médula ósea CD34+ con preincubación en suero, donde la Fig. 3A muestra el porcentaje de células B2M (atenuación de expresión de proteína) y la Fig. 3B grafica el porcentaje de edición logrado en el experimento.

10 [0012] Las Fig. 4A y 4B muestran la administración eficaz con preincubación con suero y preincubación con ApoE3. La Fig. 4A muestra el porcentaje de células B2M y la Fig. 4B proporciona el porcentaje de edición logrado en el experimento.

[0013] La Fig. 5 muestra el efecto de la preincubación de LNP con preparaciones con diversos factores de suero en la administración de LNP de células CD34+.

15 [0014] Las Fig. 6A y 6B muestran los datos de viabilidad y edición para células CD34+ que se expusieron a tratamiento con LNP a diversos intervalos. La Fig. 6A muestra la viabilidad de células CD34+ después de la exposición a LNP a las 2, 6 y 24 horas. La Fig. 6B proporciona datos de porcentaje de edición para los grupos de tratamiento de 2, 6 y 24 horas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 [0015] La presente descripción proporciona métodos para utilizar composiciones de LNP de ARN, que incluyen ARN de componente de CRISPR/Cas (la “carga”) para la administración *in vitro* a células CD34+, por ejemplo, poblaciones de células que contienen HSC. Los métodos pueden presentar propiedades mejoradas en comparación con las tecnologías de administración anteriores, por ejemplo, los métodos proporcionan la administración eficaz de los ARN, a la vez que reducen la muerte celular
25 provocada por la transfección.

[0016] En algunas modalidades, se proporciona en la presente un método para administrar un ARNm a una célula madre, por ejemplo, una HSPC o una población de HSPC. En algunas modalidades, el método comprende preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende el ARNm, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En algunas modalidades, el método
30 comprende, además, poner en contacto la HSPC o la población de HSPC con la composición de LNP preincubada *in vitro*. En algunas modalidades, el método comprende, además, cultivar la HSPC o la

población de HSPC *in vitro*. En algunas modalidades, el método da como resultado la administración del ARNm a la HSPC o la población de HSPC. En algunas modalidades, el ARNm codifica una nucleasa Cas.

[0017] En algunas modalidades, se proporciona en la presente un método para introducir un ARNg o un ARNm de nucleasa Cas en una célula madre, por ejemplo, una HSPC o una población de HSPC. En algunas modalidades, el método comprende preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende el ARNm de nucleasa Cas, un ARNg, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En algunas modalidades, el método comprende, además, poner en contacto la HSPC con la composición de LNP preincubada *in vitro*. En algunas modalidades, el método comprende, además, cultivar la HSPC. En algunas modalidades, el método da como resultado la introducción del ARNg o ARNm de nucleasa Cas a la HSPC.

[0018] En algunas modalidades, se proporciona en la presente un método para producir una célula madre modificada genéticamente, por ejemplo, HSPC, *in vitro*. En algunas modalidades, el método comprende preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende un ARNm de nucleasa Cas, un ARNg, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En algunas modalidades, el método comprende, además, poner en contacto la HSPC con la composición de LNP preincubada *in vitro*. En algunas modalidades, el método comprende, además, cultivar la HSPC *in vitro*. En algunas modalidades, el método da como resultado la producción de una HSPC modificada genéticamente.

[0019] En algunas modalidades, la composición de LNP comprende, además, un ARNg. En algunas modalidades, el ARNm codifica una nucleasa Cas clase 2. En determinadas modalidades, el carga o componente de ARN incluye un ARNm de nucleasa Cas, tal como un ARNm de nucleasa Cas clase 2. En determinadas modalidades, la carga o componente de ARN incluye un ARN g o ácidos nucleicos que codifican un ARNg de un sistema CRISPR/Cas. También se proporcionan métodos para la edición génica y métodos para elaborar células modificadas genéticamente.

Métodos *in vitro*

[0020] Los métodos de la presente administran ARN a células CD34+ *in vitro*. “Células CD34+” se refiere a células que expresan en su superficie un marcador CD34. Las células CD34+ pueden detectarse y contarse mediante el uso de, por ejemplo, citometría de flujo y anticuerpos anti-CD34 humana marcados de forma fluorescente.

[0021] En algunas modalidades, se proporciona en la presente un método para administrar un ARNm a una célula madre, por ejemplo, una HSPC o una población de HSPC, el método comprende (a)

preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende el ARNm, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG; (b) poner en contacto la HSPC o población de HSPC con la composición de LNP preincubada *in vitro*; y (c) cultivar la HSPC o población de HSPC *in vitro*; mediante lo cual se administra el ARNm a la HSPC. En algunas modalidades, el ARNm codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas clase 2. En algunos aspectos, el ARNm de nucleasa Cas 2 es un ARNm Cas9 o un ARNm Cpf1. En determinadas modalidades, la nucleasa Cas clase 2 es una Cas9 de *S. pyogenes*. En algunas modalidades, la composición de LNP comprende, además, un ARNg. En modalidades adicionales, los métodos introducen una ARNg o ARNm de nucleasa Cas en una HSPC, el método comprende (a) preincubar un factor de suero con una composición de LNP que comprende el ARNm de nucleasa Cas, un ARNg, un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG; (b) poner en contacto la HSPC con la composición de LNP preincubada *in vitro*; y (c) cultivar la HSPC; mediante lo cual se introduce la nucleasa Cas y ARNg en la HSPC.

[0022] En diversas modalidades, los ARNg de los métodos descritos en la presente pueden ser un ARN guía dual (ARNgd) o un ARN guía simple (ARNgs).

[0023] En algunas modalidades de los métodos *in vitro*, la transfección de LNP puede reducir la muerte celular de células CD34+ o HSPC en comparación con las técnicas conocidas, tales como electroporación. En algunas modalidades, la transfección de LNP puede provocar menos que 5%, menos que 10%, menos que 20%, menos que 30%, o menos que 40% de la muerte celular. En determinadas modalidades, después de la transfección la supervivencia celular es de al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95%.

[0024] Las células madre se caracterizan por la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse para producir una amplia gama de tipos de células. Los dos tipos más amplios de células madre de mamífero son las células madre embrionarias (ES) y las células madre adultas. Las células madre adultas o células progenitoras pueden reabastecer las células especializadas. La mayoría de las células madre adultas están restringidas por linaje y pueden mencionarse por su origen tisular. Las líneas celulares ES derivan del tejido epiblastico de la masa celular interna de un blastocisto o embrión en etapa temprana de mórula. Las células ES son pluripotentes y dan lugar a derivados de tres capas germinales, es decir, el ectodermo, endodermo y mesodermo. Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) son células adultas que se reprogramaron genéticamente a un estado similar a célula madre embrionaria al forzarlas a expresar genes y factores importantes para mantener las propiedades definitorias de las células madre embrionarias. Una “célula madre” puede ser una ESC, una iPSC, una célula progenitora o una HSPC, por ejemplo.

[0025] La expresión “célula progenitora y/o madre hematopoyética” y “HSPC” se utilizan de manera indistinta y se refieren a una población de células que comprende tanto HSC como células progenitoras hematopoyéticas (“HPC”). Tales células se caracterizan, por ejemplo, como CD34+. En modalidades ilustrativas, las HSPC se aíslan de médula ósea. En otras modalidades ilustrativas, las HSPC se aíslan de sangre periférica. En otras modalidades ilustrativas, las HSPC se aíslan de sangre del cordón umbilical.

[0026] Las HSPC pueden derivar de médula ósea, sangre periférica o sangre del cordón umbilical y pueden ser autólogas (las células madre propias del paciente) o alogénicas (las células madre de un donante).

[0027] La expresión “células progenitoras hematopoyéticas” o “HPC” tal como se usa en la presente se refiere a células hematopoyéticas primitivas que tienen una capacidad limitada de autorrenovación y potencial para diferenciación de múltiple linaje (por ejemplo, mieloide, linfoide), diferenciación monolinaje (por ejemplo, mieloide o linfoide) o diferenciación restringida por el tipo celular (por ejemplo, progenitor eritroide) dependiendo de la ubicación dentro de la jerarquía hematopoyética (Doulatov et ál., Cell Stem Cell 2012).

[0028] La expresión “células madre hematopoyéticas” o “HSC” tal como se usa en la presente se refiere también a células sanguíneas inmaduras que tienen la capacidad de autorrenovarse y producir células sanguíneas maduras que comprenden granulocitos (por ejemplo, promielocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos), eritrocitos (por ejemplo, reticulocitos, eritrocitos), trombocitos (por ejemplo, megacarioblastos, megacariocitos productores de plaquetas, plaquetas) y monocitos (por ejemplo, monocitos, macrófagos). Se conoce en la técnica que tales células pueden o no incluir células CD34+. Las células CD34+ son células inmaduras que expresan el marcador de la superficie celular CD34. Se cree que las células CD34+ incluyen una subpoblación de células con las propiedades de células madre definidas anteriormente. El trasplante de poblaciones de células, tales como HSPC que contienen HSC multipotentes, puede utilizarse para tratar la leucemia, linfoma y otros trastornos.

[0029] Las HSC son células multipotentes que pueden producir células progenitoras primitivas (por ejemplo, células progenitoras multipotentes) y/o células progenitoras comprometidas a linajes hematopoyéticos específicos (por ejemplo, células progenitoras linfoides). Las células madre comprometidas a linajes hematopoyéticos específicos pueden ser de linaje de linfocitos T, linaje de linfocitos B, linaje de células dendríticas, linaje de células de Langerhans y/o linaje de células de macrófagos específico de tejido linfoide. Además, las HSC también se refieren a HSC de largo plazo (LT-HSC) y HSC de corto plazo (ST-HSC). Las ST-HSC son más activas y más proliferativas que las LT-

HSC. Sin embargo, las LT-HSC tienen autorrenovación ilimitada (es decir, sobreviven a través de la adultez), mientras que las ST-HSC tienen autorrenovación limitada (es decir, sobreviven solamente un período limitado de tiempo). Cualquiera de estas HSC puede utilizarse en cualquiera de los métodos descritos en la presente. Opcionalmente, las ST-HSC son útiles dado que son altamente proliferativas y, por lo tanto, rápidamente aumentan la cantidad de HSC y su progenie.

[0030] La HSC, HPC y HSPC se obtienen opcionalmente de productos sanguíneos. Un producto sanguíneo incluye un producto obtenido del cuerpo o de un órgano del cuerpo que contiene célula de origen hematopoyético. Tales fuentes incluyen médula ósea, cordón umbilical, sangre periférica (por ejemplo, sangre periférica movilizada, por ejemplo, movilizada con un agente de movilización, tal como G-CSF o Plerixafor® (AMD3100)), el hígado, timo, linfa y bazo. Todos los productos sanguíneos antemencionados (por ejemplo, en formas brutas, sin fraccionar o fraccionadas) pueden enriquecerse para células que tengan características de HSC de formas conocidas para los expertos en la técnica. De manera similar, se pueden enriquecer para característica de población de HPC y/o HSPC. En una modalidad, las HSC se caracterizan como CD34+/CD38-/CD90+/CD45RA-. En modalidades, las HSC se caracterizan como células CD34+/CD90+/CD49f+. En modalidades adicionales, las HSC se caracterizan como linaje CD34+/CD38-/CD90+/CD45RA-. En modalidades, las HSC se caracterizan como células de linaje CD34+/CD90+/CD49f+, donde “linaje” significa omitir marcadores para las células diferenciadas de manera terminal, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, etc. Estos pueden excluirse mediante tinción de las células con anticuerpos contra marcadores de superficie expresados por células que se comprometieron a un linaje hematopoyético. Estas pueden incluir, de modo no taxativo: CD3 (linfocito T), CD19 (linfocito B), CD33 (mieloide), CD56 (células NK), CD235a (células eritroides), CD71 (células eritroides).

[0031] “Enriquecido”, cuando se utiliza en el contexto de una población de células, se refiere a una población de células que se selecciona con base en la presencia de uno o más marcadores, por ejemplo, CD34+. Una población de células, tal como una población de células madre o una población de HSPC, se refiere a células eucariotas de mamífero, preferentemente humanas, aisladas a partir de fuentes biológicas, población, un producto sanguíneo o tejidos y derivada de más de una célula.

[0032] Durante la preincubación, un factor de suero se puede poner en contacto con una composición de LNP, antes de la administración a la célula HSPC *in vitro*.

[0033] Algunas modalidades de los métodos *in vitro* comprenden preincubar un factor de suero y la composición de LNP durante de alrededor de 30 segundos a durante la noche. En algunas modalidades, la etapa de preincubación comprende preincubar un factor de suero y la composición de LNP durante

alrededor de 1 minuto a 1 hora. En algunas modalidades, comprende preincubar durante alrededor de 1-30 minutos. En otras modalidades, comprende preincubar durante alrededor de 1-10 minutos. Modalidades adicionales comprenden preincubar durante alrededor de 5 minutos. En determinadas modalidades, los extremos de los intervalos y los valores proporcionados anteriormente pueden ser de $\pm 0,5$, 1, 2, 3 o 4 minutos.

[0034] En determinadas modalidades, la etapa de preincubación se produce a alrededor de 4 °C. En determinadas modalidades, la etapa de preincubación se produce a alrededor de 25°C. En determinadas modalidades, la etapa de preincubación se produce a alrededor de 37°C. La etapa de preincubación puede comprender un amortiguador, tal como bicarbonato de sodio o HEPES. En determinadas modalidades, el amortiguador puede comprender un medio de cultivo de HSPC. En modalidades adicionales, el amortiguador puede consistir en medio de cultivo de HSPC.

[0035] La preincubación de una composición de LNP con un factor de suero puede comprender la preincubación con suero, con una fracción de suero o con un factor de suero aislado. En algunas modalidades, la composición de LNP se preincuba con suero. El suero puede ser suero de mamífero, ratón, primate o humano. En algunas modalidades, la composición de LNP se preincuba con un factor de suero aislado. En determinadas modalidades, el factor de suero es una ApoE. En determinadas modalidades, el factor de suero se selecciona de ApoE2, ApoE3 y ApoE4. En modalidades adicionales, la ApoE es una proteína recombinante, tal como una proteína humana recombinante. La ApoE puede ser ApoE3 humana recombinante. Puede ser ApoE4 humana recombinante.

[0036] En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto la célula madre, por ejemplo, HSPC, o población de células madre, por ejemplo, población de HSPC, después de la etapa de preincubación, por ejemplo, poner el contacto las células con una composición de LNP preincubada. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto la población de células madres, tal como una población de ES o iSPC, después de la etapa de preincubación, por ejemplo, poner el contacto las células con una composición de LNP preincubada. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto las células con una composición de LNP preincubada durante alrededor de 1 minuto a alrededor de 72 horas. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto las células con una composición de LNP preincubada durante alrededor de 1 hora a alrededor de 24 horas. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto las células con una composición de LNP preincubada durante alrededor de 4 horas a alrededor de 24 horas. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto las células con una composición de LNP preincubada durante alrededor de

4 horas a alrededor de 12 horas. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto las células con una composición de LNP preincubada durante alrededor de 2 horas a alrededor de 12 horas. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto las células con una composición de LNP preincubada durante alrededor de 6 horas a alrededor de 8 horas. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto las células con una composición de LNP preincubada durante alrededor de 6 horas a alrededor de 24 horas. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto las células con una composición de LNP preincubada durante alrededor de 6 horas a alrededor de 24 horas. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto las células con una composición de LNP preincubada durante alrededor de 4 horas a alrededor de 12 horas. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto las células con una composición de LNP preincubada durante alrededor al menos alrededor de 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 o 12 horas. En algunas modalidades, los métodos comprenden una etapa de lavado después de la etapa de puesta en contacto. La etapa de lavado puede comprender un medio.

[0037] En algunas modalidades, los métodos comprenden un ARNm de nucleasa Cas. En algunas modalidades, los métodos comprenden un ARNm de nucleasa Cas clase 2. En algunas modalidades, los métodos comprenden un ácido nucleico de ARNg, tal como un ARNg. En determinadas modalidades, los métodos comprenden al menos dos ácidos nucleicos de ARNg. En modalidades adicionales, el método comprende 3 o más ácidos nucleicos de ARNg. En algunas modalidades, un ARNm, tal como un ARNm de nucleasa Cas y un ARNg se formulan en una única composición de LNP. En algunas modalidades, los métodos comprenden un ARNm, tal como un ARNm de nucleasa Cas, y un ácido nucleico de ARNg que se coencapsulan en la composición de LNP. En modalidades adicionales, los métodos comprenden un ARNm y un ácido nucleico de ARNg que se encapsulan por separado en LNP. En determinadas modalidades, un ARNm se coformula en una primera composición de LNP y un ácido nucleico de ARNg se formula en una segunda composición de LNP. En algunas modalidades, la primera y segunda composiciones de LNP se administran de manera simultánea. En otras modalidades, la primera y segunda composiciones de LNP se administran de manera secuencial. En algunas modalidades de los métodos in vitro, la primera y segunda composiciones de LNP se combinan antes de la etapa de preincubación. En algunas modalidades, la primera y segunda composiciones de LNP se preincuban por separado.

[0038] 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 o población de células, por ejemplo, una HSPC o una población de HSPC, 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, por ejemplo, a una HSPC o una población de HSPC, 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
 5 comprende una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas clase 2, se puede administrar, tal como a una HSPC o población de HSPC, 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, 24, 36, 48 o 72 horas de
 10 separación; o 1, 2 o 3 días de separación.

[0039] En algunas modalidades de los métodos *in vitro* descritos en la presente, la célula madre, HSPC o población de HSPC puede cultivarse *in vitro* después de la transfección mediante LNP.

[0040] En algunas modalidades, la célula madre, HSPC o población de HSPC transfectada se expande en un medio de cultivo de células madre, tal como un medio de cultivo de HSPC. “Expansión” o
 15 “expandir”, en el contexto de células, se refiere a un aumento en la cantidad de un tipo celular o tipos celulares característicos a partir de una población inicial de células, que pueden o no ser idénticas. Las células iniciales utilizadas para la expansión pueden no ser iguales a las células generadas a partir de la expansión. Algunas modalidades de los métodos *in vitro* comprenden cultivar la HSPC o población de HSPC en un medio de cultivo de HSPC. Algunas modalidades comprenden, además, expandir las HSPC
 20 en un medio de cultivo de HSPC que comprende un expansor de células madre. Véase, por ejemplo, WO2010/059401 (por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1), WO2013/110198 y WO2017/115268, que se incorporan a la presente mediante esta referencia, con respecto a los compuestos adecuados para la expansión de células madre. “Expansor de células madre” se refiere a un compuesto que provoca que las células, por ejemplo, HSPC, HSC y/o HPC, proliferen, por ejemplo, aumenten en cantidad, a una
 25 velocidad mayor con respecto a los mismos tipos de célula madre en ausencia de tal agente. En un aspecto ilustrativo, el expansor de células madre es un inhibidor de la vía del receptor de hidrocarburos de arilo.

[0041] En modalidades adicionales, los métodos *in vitro* comprenden, además, cambiar el medio de cultivo entre las etapas de puesta en contacto y cultivo. En modalidades adicionales, la etapa de cultivo comprende medio de cultivo celular que incluye trombopoyetina (Tpo), ligando Flt3 (Flt-3L) y factor de
 30 células madre (SCF) humano. En modalidades, el medio de cultivo incluye, además, interleucina-6 humana (IL-6). En modalidades, el medio de cultivo celular incluye trombopoyetina (Tpo), ligando Flt3

(Flt-3L) y factor de células madre (SCF) humano.

Carga de CRISPR/Cas

[0042] La carga de CRISPR/Cas administrada a través de la formulación de LNP incluye 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.

[0043] “ARNm” se refiere a un polinucleótido que no es ADN y 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

[0044] 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.

[0045] 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).

[0046] 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 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, US2016/0312198 A1; US 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).

[0047] 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*
 5 *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 becsii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium*
 10 *difficile*, *Finegoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter sp.*, *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc sp.*, *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira sp.*, *Lyngbya sp.*, *Microcoleus chthonoplastes*,
 15 *Oscillatoria sp.*, *Petrotoga mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, *Acidaminococcus sp.*, *Lachnospiraceae bacterium ND2006* y *Acaryochloris marina*.

[0048] 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
 20 modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Neisseria meningitidis*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cas9 de *Staphylococcus aureus*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Francisella novicida*. En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Acidaminococcus sp.* En algunas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de bacteria ND2006 *Lachnospiraceae*. En modalidades adicionales, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Francisella*
 25 *tularensis*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens* o *Porphyromonas macacae*. En determinadas modalidades, la nucleasa Cas es la nucleasa Cpf1 de *Acidaminococcus* o *Lachnospiraceae*.

30 [0049] 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. 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 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.

[0050] 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 Cas puede reemplazarse con un dominio de una nucleasa diferente, tal como Fok1. En algunas modalidades, una nucleasa Cas puede ser una nucleasa modificada.

[0051] 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.

[0052] 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 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 inactivado.

[0053] En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN se modifica para contener 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 actividad reducida. En algunas modalidades, se utiliza una nickasa que tiene un dominio HNH inactivo.

5 [0054] 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
10 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
15 (FnCpf1) de *Francisella novicida* (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN)).

[0055] 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,
20 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.

25 [0056] 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
30 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, US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1.

[0057] 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 [0058] 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.

[0059] 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)),
 10 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
 15 (UFM1) y proteína similar a ubiquitina 5 (UBL5).

[0060] 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
 20 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,
 25 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 epítipo. Los ejemplos no taxativos
 30 de etiquetas incluyen glutathione-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.

[0061] 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.

[0062] 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. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense 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; US 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.

[0063] 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.

5 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
10 anteriormente.

ARN guía (ARNg)

[0064] 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
15 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. 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
20 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.

[0065] “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
25 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.

[0066] Tal como se usa en la presente, una “secuencia guía” se refiere a una secuencia dentro de un
30 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.

[0067] 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.

[0068] 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.

5 [0069] En algunas modalidades, el ARNg es un “ARNgs de Cas9” capaz de mediar la escisión de ADN guiada por ARN mediante una proteína Cas9. En algunas modalidades, el ARNg 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
10 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.

[0070] 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 ARNg o un ARNgd)
15 en un casete de expresión de ARN guía, que es un ácido nucleico que codifica uno o más ARN guías.

[0071] 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
20 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
25 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 ARNg. En algunas modalidades, el ácido nucleico de ARNg codifica una nucleasa Cas9 de ARNg. En algunas modalidades, el ácido nucleico de ARNg codifica una nucleasa Cpf1 de ARNg.

[0072] La secuencia de nucleótidos que codifica el ARN guía puede estar unida de forma operativa a
30 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

5 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

10 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.

15 [0073] 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

20 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

[0074] En determinadas modalidades, las composiciones de LNP comprenden ARN modificados.

[0075] Puede haber presentes nucleósidos o nucleótidos modificados en un ARN, por ejemplo, un

25 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”.

30 [0076] 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 (tales 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.

[0077] 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

[0078] En algunas modalidades, una composición o formulación descrita en la presente comprende un ARNm que comprende un marco de lectura abierto (ORF), tal como, por ejemplo, un 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, 10, 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.

[0079] “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.

[0080] “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

[0081] 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, 10, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65, o 66.

[0082] 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.

[0083] 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.

[0084] 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.

[0085] 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.

[0086] 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.

[0087] 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 ARNm expresado de manera constitutiva.

[0088] 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).

[0089] 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.

[0090] 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.

[0091] 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.

[0092] 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. En algunas modalidades, el ARNM comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 o 66.

[0093] En algunas modalidades, el grado de identidad con respecto a la secuencia sustituida opcionalmente de las SEQ ID NO: 43 es 95%. En algunas modalidades, el grado de identidad con respecto a la secuencia sustituida opcionalmente de las SEQ ID NO: 4 es 98%. En algunas modalidades, el grado de identidad con respecto a la secuencia sustituida opcionalmente de las SEQ ID NO: 43 es 99%. En algunas modalidades, el grado de identidad con respecto a la secuencia sustituida opcionalmente de las SEQ ID NO: 43 es 100%.

[0094] 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

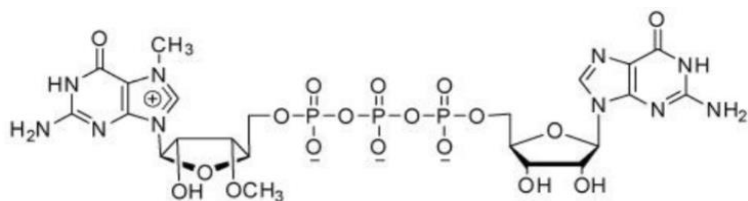
transcriptos del ARNm comprenden un 2'-metoxi y un 2'-hidroxilo, respectivamente. En Cap2, las ribosas del primer y segundo nucleótidos proximales del ARNm comprenden un 2'-metoxi. Véase, por ejemplo, Katibah et ál. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30; Abbas et ál. (2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115. La mayoría de los ARNm eucariotas superiores endógenos, que incluyen

5 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

10 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.

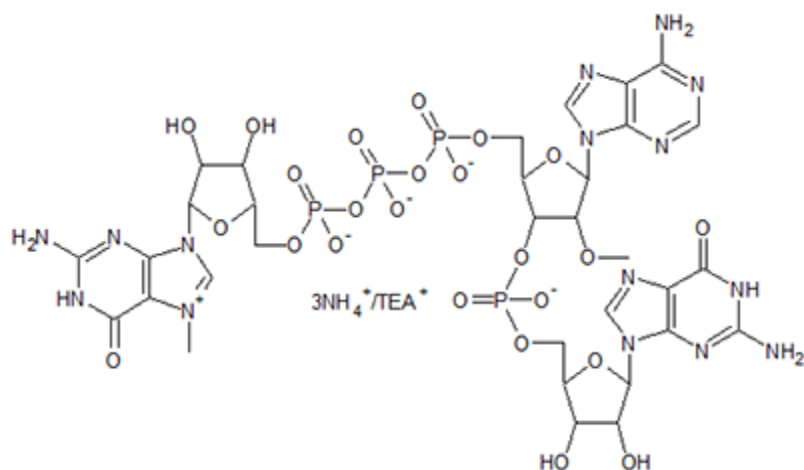
[0095] Un casquete puede incluirse de forma cotranscripcional. Por ejemplo, ARCA (análogo de casquete anti-inverso; Thermo Fisher Scientific n.º de cat. AM8045) es un análogo de casquete que comprende 3'-metoxi-5'-trifosfato de 7-metilguanina unido a la posición 5' de un ribonucleótido de

15 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.



[0096] 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'-O-metiladas de CleanCap™ AG y CleanCap™ GG de TriLink Biotechnologies como los n.º de cat. N-

25 7413 y N-7433, respectivamente. La estructura de CleanCap™ AG se muestra a continuación.



[0097] 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.

[0098] 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.

[00099] 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

5 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 [00100] 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

15 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.

[00101] 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,

20 de un ARNm descrito en la presente.

ARNg

[00102] En un aspecto, la presente descripción proporciona métodos de administración de un sistema de edición genómica (por ejemplo, un sistema de nucleasa de dedos de cinc, un sistema TALEN, un sistema de meganucleasa o un sistema de CRISPR/Cas) a una célula (o población de células), por ejemplo,

25 una HSPC (o población de HSPC), por ejemplo, una célula CD34+ (o población de células CD34+), donde el resultado es una célula (o su progenie) que tiene una mayor expresión de hemoglobina fetal (por ejemplo, cuando tal célula se diferencia para producir un eritrocito). En la presente se describen secuencias guía útiles para lograr tal efecto. En modalidades, el sistema de edición genómica comprende uno o más vectores, por ejemplo, ARNm, que codifican los componentes del sistema de edición genómica. En otras

30 modalidades, el sistema de edición genómica comprende uno o más polipéptidos. En un aspecto preferido, los métodos comprenden administrar un sistema de CRISPR/Cas. En modalidades, el sistema de

CRISPR/Cas comprende un ARNg y una nucleasa Cas, por ejemplo, en complejo en la forma de un complejo de proteína ribonuclear (RNP). En otras modalidades, el sistema de CRISPR/Cas comprende uno o más vectores que codifican un ARNg y/o una nucleasa Cas. En otras modalidades, el sistema de CRISPR/Cas comprende uno o más vectores, por ejemplo, ARNm, que codifican una nucleasa Cas (por ejemplo, una nucleasa Cas clase 2) y uno o más ARNg. En aspectos, el sistema de CRISPR/cas incluye un ARNg descrito en WO2017/115268, cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En aspectos, el sistema de CRISPR/Cas incluye un ARNg que comprende una secuencia guía complementaria a una secuencia objetivo dentro del gen de BCL11a o sus elementos reguladores. En otros aspectos, el sistema de CRISPR/Cas incluye un ARNg que comprende una secuencia guía complementaria a una secuencia objetivo dentro del intrón 2 del gen BCL11a (por ejemplo, dentro de una región del intrón 2 del gen BCL11a en o cerca de un sitio de unión de unión a GATA1). En aspectos, el sistema de CRISPR/Cas incluye un ARNg que comprende una secuencia guía complementaria con una secuencia objetivo dentro de la región del intrón 2 del gen BCL11a de ch2:60494000 a ch2:60498000 (de acuerdo con hg38), por ejemplo, dentro de una región del intrón 2 del gen BCL11a de ch2:60494250 a ch2:60496300 (de acuerdo con hg38). En modalidades, el sistema de CRISPR/Cas incluye un ARNg que comprende una secuencia guía enumerada en la Tabla 2 de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/566,232, presentada el 29 de setiembre de 2017, que se incorpora a la presente mediante esta referencia.

[00103] Las secuencias guía ilustrativas de ARNg que son complementarias a las secuencias objetivo dentro del intrón 2 del gen BCL11a. +58, +62 y +55 se refieren a los sitios de hipersensibilidad a ADNasa de la región potenciadora específica de eritroides como se describe en Bauer et ál., *Science* 2013; 342(6155): 253-257.

[00104] En otros aspectos, el sistema de CRISPR/Cas incluye un ARNg que comprende una secuencia guía complementaria a una secuencia objetivo dentro del locus de globina en el cromosoma 11. En un aspecto, el sistema de CRISPR/Cas incluye un ARNg que comprende una secuencia guía complementaria a una secuencia dentro de una región de HPFH. Tal como se usa en la presente, la expresión “región de HPFH” se refiere a un sitio genómico en el cual, cuando se modifica (por ejemplo, se muta o elimina), provoca un aumento en la producción de HbF en glóbulos rojos adultos e incluye regiones de HPFH identificadas en la bibliografía, véase, por ejemplo, Online Mendelian Inheritance in Man: <http://www.omim.org/entry/141749>, que se incorpora a la presente mediante esta referencia). En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es una región dentro del grupo de genes de beta globina en el cromosoma 11p15 o que lo abarca. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH se encuentra dentro

de al menos parte del gen de delta globina y sus elementos reguladores o lo abarca. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es una región del promotor de HBG1. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es una región del promotor de HBG2. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es una región descrita en Sankaran VG et ál. NEJM (2011) 365:807-814, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es la HPFH por delección del punto de quiebre de Francia como se describe en Sankaran VG et ál. NEJM (2011) 365:807-814. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es la HPFH de Argelia como se describe en Sankaran VG et ál. NEJM (2011) 365:807-814. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es la HPFH de Sri Lanka como se describe en Sankaran VG et ál. NEJM (2011) 365:807-814. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es la HPFH-3 de Sankaran como se describe en Sankaran VG et ál. NEJM (2011) 365:807-814. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es la HPFH-2 de Sankaran como se describe en Sankaran VG et ál. NEJM (2011) 365:807-814. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH-1 es la HPFH-3 de Sankaran como se describe en Sankaran VG et ál. NEJM (2011) 365:807-814. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es la HPFH de ($\delta\beta$)0-talasemia de Sri Lanka como se describe en Sankaran VG et ál. NEJM (2011) 365:807-814. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es la HPFH de ($\delta\beta$)0-talasemia de Sicilia como se describe en Sankaran VG et ál. NEJM (2011) 365:807-814. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es la HPFH de ($\delta\beta$)0-talasemia de Macedonia como se describe en Sankaran VG et ál. NEJM (2011) 365:807-814. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es la HPFH de β 0-talasemia kurda como se describe en Sankaran VG et ál. NEJM (2011) 365:807-814. En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es una región ubicada en Chr11:5213874-5214400 (hg18). En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es una región ubicada en Chr11:5215943-5215046 (hg18). En una modalidad ilustrativa, la región de HPFH es una región ubicada en Chr11:5234390-5238486 (hg38). En modalidades, el sistema de CRISPR/cas incluye un ARNg que comprende una secuencia guía que comprende una secuencia como se describe en WO2017/077394, cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En modalidades, el sistema de CRISPR/Cas incluye un ARNg que comprende una secuencia guía que comprende una secuencia que se selecciona de una secuencia guía de WO2017/077394. En modalidades, el sistema de CRISPR/Cas incluye un ARNg que comprende una secuencia guía enumerada en la Tabla 3 de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/566,232, presentada el 29 de setiembre de 2017, que se incorpora a la presente mediante esta referencia.

[00105] Secuencias guía ilustrativas que se dirigen a HPFH de Francia (HPFH de Francia; Sankaran

VG et ál. A functional element necessary for fetal hemoglobin silencing. NEJM (2011) 365:807-814.)

[00106] En modalidades, el sistema de CRISPR/Cas incluye un ARNg que comprende una secuencia guía enumerada en la Tabla 4 de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/566,232, presentada el 29 de setiembre de 2017, que se incorpora a la presente mediante esta referencia.

- 5 [00107] Las secuencias guía ilustrativas pueden dirigirse a las regiones promotoras de HBG1 y/o HBG2.

ARNg modificado químicamente.

- [00108] 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 (tales 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).
- 10
15
20
25

- [00109] 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
- 30

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.

10 [00110] 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.

25 [00111] 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.

[00112] 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 son nucleósidos o nucleótidos modificados.

[00113] 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 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 interferones, y muerte celular.

[00114] 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 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.

[00115] Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen fosforotioato, fosforoselenatos, borano fosfatos, ésteres de borano fosfato, fosfonatos de hidrógeno, fosforamidatos, fosfonatos de arilo o alquilo y fosfodiésteres. El átomo de fósforo en un grupo fosfato no modificado es quiral. Sin embargo, el
 5 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
 10 los oxígenos de unión o en ambos oxígenos de unión.

[00116] 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,
 15 carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, enlazador de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilénmetilimino, metilénhidrazo, metiléndimetilhidrazo y metilénoximetilimino.

[00117] En algunas modalidades, la invención comprende un ARNGs que comprende una o más modificaciones dentro de una o más de las siguientes regiones: los nucleótidos en el extremo 5’; la región
 20 del tallo inferior; la región del bulto; la región del tallo superior; la región del nexo; la región de horquilla 1; la región de horquilla 2; y los nucleótidos en el extremo 3’. En algunas modalidades, la modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-O-Me). En algunas modalidades, la modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F). En algunas modalidades, la modificación comprende un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

[00118] En algunas modalidades, los primeros tres o cuatro nucleótidos en el extremo 5’ y los últimos tres o cuatro nucleótidos en el extremo 3’ están modificados. En algunas modalidades, los cuatro primeros nucleótidos en el extremo 5’ y los cuatro últimos nucleótidos en el extremo 3’ están unidos con enlaces fosforotioato (PS). En algunas modalidades, la modificación comprende 2'-O-Me. En algunas modalidades, la modificación comprende 2'-F.

[00119] En algunas modalidades, los cuatro primeros nucleótidos en el extremo 5’ y los cuatro últimos nucleótidos en el extremo 3’ se unen con un enlace PS y los primeros tres nucleótidos en el extremo 5’ y

los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' comprenden modificaciones con 2'-O-Me.

[00120] En algunas modalidades, los cuatro primeros nucleótidos en el extremo 5' y los cuatro últimos nucleótidos en el extremo 3' se unen con un enlace PS y los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' y los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' comprenden modificaciones con 2'-O-F.

- 5 [00121] En algunas modalidades, el ARNGs comprende el patrón de modificación de la SEQ ID NO: 74:

(mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm
CAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmG
mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU), donde N es cualquier nucleótido

- 10 natural o no natural. En algunas modalidades, el ADNgs comprende la SEQ ID NO:74. En determinadas modalidades, el ARNGs comprende una modificación con 2' O-metilo de los primeros tres residuos en su extremo 5', con enlaces fosforotioato entre los residuos 1-2, 2-3 y 3-4 del ARN.

Plantilla de ácido nucleico

- [00122] Las composiciones y métodos descritos en la presente pueden incluir una plantilla de ácido
15 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
20 un único gen en una célula, o dos genes diferentes en una célula.

- [00123] 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
25 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
30 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.

[00124] 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%.

[00125] 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.

[00126] 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.

[00127] 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.

[00128] 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

[00129] 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 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

[00130] 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 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.

[00131] 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.

[00132] 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.

[00133] 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.

[00134] 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.

[00135] En modalidades que implican una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas 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, NNAAAAN, 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 NNAAAAN.

Formulaciones lipídicas

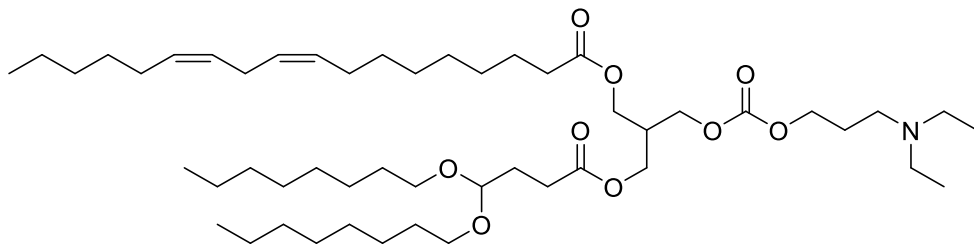
[00136] En la presente se describen diversas modalidades de formulaciones de LNP para agentes

biológicamente activos, tales como ARN, lo que incluye cargas de CRISPR/Cas. Tales formulaciones de LNP incluyen un “lípidio de amina” o un “lípidio biodegradable”, opcionalmente junto con uno o más de un lípidio auxiliar, un lípidio neutro y un lípidio de ocultación, tal como un lípidio de PEG. “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

[00137] En determinadas modalidades, 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.

10 [00138] 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:



15 [00139] 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.

[00140] 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.

[00141] Los lípidos de amina y otros “lípidos biodegradables” adecuados para su uso en las LNP descritas en la presente son biodegradables *in vivo*. Los lípidos de amina tienen toxicidad baja (por ejemplo, son tolerados en modelos animales sin efectos adversos en cantidades mayores o iguales que 10 mg/kg). En determinadas modalidades, las LNP que comprenden un lípidio de amina incluyen las que al menos 75 % del lípidio 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.

[00142] Los lípidos biodegradables incluyen, por ejemplo, los lípidos biodegradables de WO/2017/173054, WO2015/095340 y WO2014/136086.

[00143] 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.

[00144] Los lípidos 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 y lípidos biodegradables 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.

[00145] Los lípidos pueden ser ionizables, dependiendo del pH del medio en el que estén. Por ejemplo, en un medio ligeramente ácido, el lípido, tal como un lípido de amina, puede protonarse y, de este modo, tener una carga positiva. Por el contrario, en un medio ligeramente básico, tal como, por ejemplo, sangre donde el pH es de aproximadamente 7,35, el lípido, tal como un lípido de amina, puede no protonarse y, por lo tanto, no tener carga.

[00146] La capacidad de un lípido de tener carga positiva 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 biodisponibles de la presente descripción pueden tener independientemente una pKa en el independientemente de alrededor de 5,1 a alrededor de 7,4. Por ejemplo, cada uno de los lípidos de amina de la presente descripción pueden tener independientemente una pKa en el independientemente de alrededor de 5,8 a alrededor de 6,5. Los lípidos con una pKa que oscila de alrededor de 5,1 a alrededor de 7,4 son eficaces para administrar carga in vivo, por ejemplo, al hígado. Además, se descubrió que los lípidos 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, WO2014/136086.

Lípidos adicionales

[00147] 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).

10 [00148] Los “lípidos auxiliares” incluyen esteroides, esteroles y resorcinol 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.

15 [00149] Los “lípidos de ocultación” son lípidos que alteran la duración temporal en la que pueden existir *in vivo* las nanopartículas (por ejemplo, en la sangre). Los lípidos de ocultación pueden asistir en el proceso de formulación, por ejemplo, al reducir la agregación de partículas y controlar el tamaño de partícula. Los lípidos de ocultación utilizados en la presente pueden modular las propiedades farmacocinéticas de la LNP. Los lípidos de ocultación adecuados para su uso en una composición lipídica de la descripción incluyen, de modo no taxativo, lípidos de ocultación que tengan un grupo de cabeza 20 hidrofílica unido a un resto lipídico. Los lípidos adecuados para su uso en la composición lipídica de la presente descripción y la información acerca de la bioquímica de tales lípidos pueden encontrarse en Romberg et ál., *Pharmaceutical Research*, Vol. 25, No. 1, 2008, pág. 55-71 y Hoekstra et ál., *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52. Se describen lípidos de PEG adecuados adicionales en, por ejemplo, WO 2006/007712.

25 [00150] En una modalidad, el grupo de cabeza hidrofílica del lípido de ocultación comprende un resto polimérico seleccionado de polímeros a base de PEG. Los lípidos de ocultación pueden comprender un resto lipídico. En algunas modalidades, el lípido de ocultación es un lípido de PEG.

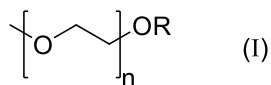
[00151] En una modalidad, un lípido de ocultación comprende un resto de polímero que se selecciona de polímeros a base de PEG (a veces mencionados como óxido de (poli)etileno, poli(oxazolina), alcohol 30 (poli)vinílico, poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poliaminoácidos y poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida].

[00152] En una modalidad, el lípido de PEG comprende un resto polimérico a base de PEG (mencionado a menudo como poli(etilen óxido)).

[00153] El lípido de PEG comprende, además, un resto lipídico. 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.

[00154] 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 PEG es un polímero de etilenglicol u óxido de etileno lineal o ramificado opcionalmente sustituido. En una modalidad, el PEG no está sustituido. En una modalidad, el PEG está sustituido, por ejemplo, por uno o más grupos alquilo, alcoxi, acilo, hidroxilo o arilo. En una modalidad, el término incluye copolímeros de PEG, tales como PEG-poliuretano o PEG-polipropileno (véase, por ejemplo, J. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992)); en otra modalidad, el término no incluye copolímeros de PEG. En una 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.

[00155] 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
 5 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.

10 [00156] En cualquiera de las modalidades descritas en la presente, el lípido de PEG se puede seleccionar de PEG-dilauroilglicerol, PEG-dimiristoilglicerol (PEG-DMG) (n.º de catálogo GM-020 de NOF, Tokio, Japón), PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-distearoilglicerol (PEG-DSPE) (n.º de catálogo DSPE-020CN, NOF, Tokio, Japón), PEG-dilaurilglicamida, PEG-dimiristilglicamida, PEG-dipalmitoilglicamida, and PEG-distearoilglicamida, PEG-colesterol (1-[8'-(Colest-5-en-3[beta]-
 15 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.º de catálogo 880150P de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EUA), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DSPE) (n.º de catálogo 880120C de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EUA), 1,2-
 20 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
 25 modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C-DMA. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser el compuesto S027, descrito en WO2016/010840 (párrafos [00240] a [00244]). En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-DSA. En una modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C11. En algunas modalidades, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C14. En algunas modalidades, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C16. En algunas modalidades, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C18.

[00157] La LNP puede contener (i) un lípido biodegradable, (ii) un lípido neutro opcional, (iii) un lípido auxiliar y (iv) un lípido de ocultación, tal como un lípido de PEG. La LNP puede contener un lípido biodegradable y uno o más de un lípido neutro, un lípido auxiliar y un lípido de ocultación, tal como un lípido de PEG.

5 [00158] La LNP puede contener (i) un lípido de amina para encapsulación y para escape endosomal, (ii) un lípido neutro para estabilización, (iii) un lípido auxiliar, también para estabilización, y (iv) un lípido de ocultación, tal como un lípido de PEG. La LNP puede contener un lípido de amina y uno o más de un lípido neutro, un lípido auxiliar, y también para estabilización, y un lípido de ocultación, tal como un lípido de PEG.

10 [00159] En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un componente de ARN que incluye uno o más de un agente de unión a ADN guiada por ARN, un ARNm de nucleasa Cas, un ARNm de nucleasa Cas clase 2, un ARNm de Cas9 y un ARNg. En algunas modalidades, una composición de LNP puede incluir una nucleasa Cas clase 2 y un ARNg y el componente de ARN. En determinadas modalidades, una composición de LNP puede comprender el componente de ARN, un lípido de amina, 15 un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de ocultación. En determinadas composiciones de LNP, el lípido auxiliar es colesterol. En otras composiciones, el lípido neutro es DSPC. En modalidades adicionales, el lípido de ocultación es PEG2k-DMG o PEG2k-C11. En determinadas modalidades, la composición de LNP comprende el lípido A o un equivalente del lípido A; un lípido auxiliar; un lípido neutro; un lípido de ocultación; y un ARN guía. En determinadas composiciones, el lípido de amina es el 20 lípido A. En determinadas composiciones, el lípido de amina es el lípido A o un análogo de acetal de este; el lípido auxiliar es colesterol; el lípido neutro es DSPC; y el lípido de ocultación es PEG2k-DMG.

[00160] En determinadas modalidades, las composiciones lipídicas se describen de acuerdo con las respectivas relaciones molares de los lípidos componentes en la formulación. Modalidades de la presente descripción proporcionan composiciones lipídicas descritas de acuerdo con las relaciones molares 25 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. 30 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%.

[00161] En una modalidad, el % molar del lípido neutro puede ser de alrededor de 5 % molar a alrededor de 15 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro puede ser de alrededor de 7 % molar a alrededor de 12 % molar. En una modalidad, el % molar del lípido neutro puede ser de alrededor de 9 % molar. En algunas modalidades, el% molar del lípido neutro 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 neutro. En determinadas modalidades, la variabilidad entre lotes de LNP será menor que 15 %, menor que 10 % o menor que 5 %.

[00162] 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 PEG para llevar el componente lipídico al 100% 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 %.

[00163] 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 %.

[00164] 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.

[00165] 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 auxiliar; 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 una modalidad, la relación entre N/P puede ser de alrededor de 5-7. En una modalidad, la relación entre N/P puede ser de alrededor de 4,5-8.

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 alrededor 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% .

[00166] En algunas modalidades, el componente de ARN puede comprender un ARNm, tal como un ARNm que codifica una nucleasa Cas. En una modalidad, el componente de ARN puede comprender un ARNm de Cas9. En algunas composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas, la LNP comprende, además, un ácido nucleico de ARNg, tal como un ARNg. En algunas modalidades, el componente de ARN comprende un ARNm de nucleasa Cas y un ARNg. En algunas modalidades, el componente de ARN comprende un ARNm de nucleasa Cas clase 2 y un ARNg.

[00167] 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 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 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.

[00168] 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 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.

[00169] En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un ARNg. En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un ARNg de Cas9. En una modalidad, una composición de LNP puede comprender un ARNg de Cpf1. En algunas composiciones que comprenden un ARNg, la

LNP incluye un lípido de amina, un lípido auxiliar, un lípido neuro y un lípido de PEG. En determinadas composiciones que comprenden un ARNg, el lípido auxiliar es colesterol. En otras 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, tales como análogos de acetal del lípido A.

[00170] En determinadas modalidades, una composición de LNP composición un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg, que puede ser un ARNg. 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 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. 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.

[00171] 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.

[00172] 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 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.

10 [00173] 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

15 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

20 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

25 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

30 amortiguador de fosfato (PBS), un amortiguador Tris, un amortiguador de citrato y 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.

[00174] 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 o -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 4 °C, a temperatura ambiente o a 25 °C. Las composiciones de LNP congeladas se pueden mantenerse a diversas temperaturas, por ejemplo, en hielo, a 4 °C, a temperatura ambiente, a 25 °C o a 37 °C.

Métodos para modificar genéticamente células madre, por ejemplo, HSPC; células madre modificadas genéticamente, por ejemplo, HSPC

[00175] Las composiciones de LNP descritas en la presente pueden utilizarse en métodos para modificar genéticamente células madre, por ejemplo, HSPC, por ejemplo, mediante edición génica *in vitro* de sistema de CRISPR/Cas. En algunas modalidades, la población de células modificada genéticamente

es una población de células CD34+. En algunas modalidades, se proporciona un método para producir una población de HSPC o de células CD34+ modificadas genéticamente *in vitro*, el método comprende (a) preincubar un factor de suero con una composición de LNP para administrar un ARNm de nucleasa Cas y un ARNg; (b) poner en contacto la población de HSPC o de células CD34+ con la composición de LNP preincubada *in vitro*; y (c) cultivar la población de HSPC o células CD34+ *in vitro*, mediante lo cual se produce una HSPC modificada genéticamente. En algunas modalidades, los métodos implican poner en contacto una HSPC o célula CD34+ con una composición de LNP descrita en la presente de acuerdo con los métodos de administración descritos en la presente.

[00176] En algunas modalidades, se proporcionan células madre modificadas genéticamente, por ejemplo, HSPC, por ejemplo, una HSPC o población de HSPC modificadas genéticamente. Tales células modificadas genéticamente se producen de acuerdo con los métodos descritos en la presente. En algunas modalidades, la HSPC modificada genéticamente se encuentra dentro de un tejido u órgano, por ejemplo, médula ósea, sangre u otro tejido dentro de un sujeto, por ejemplo, después del trasplante de una HSPC modificada genéticamente.

[00177] 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 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 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.

[00178] En algunas modalidades, se proporciona una población de células que comprende células 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 %, 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 indels. 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.

[00179] 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

[00180] Los métodos descritos en la presente pueden utilizarse para la edición génica en una célula madre, una HSPC o población de HSPC *in vitro*. En una modalidad, una o más composiciones de LNP descritas en la presente pueden administrarse a una célula madre, una HSPC o una población de HSPC. En una modalidad, una o más composiciones de LNP descritas en la presente pueden ponerse en contacto con una célula madre, una HSPC, una HSC o una HPC. En una modalidad, una célula modificada genéticamente puede producirse mediante la puesta en contacto de una célula con una composición de LNP de acuerdo con los métodos descritos en la presente. En algunos métodos de edición génica, la HSPC o población de HSPC se mantiene en cultivo. En algunos métodos de edición génica, la HSPC o población de HSPC se trasplanta a un paciente. En algunas modalidades, la HSPC modificada genéticamente se encuentra dentro de un tejido u órgano, por ejemplo, médula ósea, sangre u otro tejido dentro de un paciente, por ejemplo, después del trasplante de una HSPC modificada genéticamente.

[00181] En algunas modalidades, el método comprende una célula madre, una HSPC o población de HSPC que es autóloga con respecto a un paciente al que se le administrará la célula. En algunas modalidades, el método comprende una HSPC o población de HSPC que es alogénica con respecto a un paciente al que se le administrará tal célula.

[00182] En diversas modalidades, los métodos descritos en la presente consiguen una edición génica de CRISPR-Cas en la célula madre, HSPC o población de HSPC. En algunas modalidades, los métodos comprenden, además, detectar edición génica en la HSPC o población de HSPC. En algunas modalidades, la edición génica se mide como porcentaje de edición. En algunas modalidades, las ediciones génicas se miden como porcentaje de modificación de ADN. Los métodos pueden lograr al menos 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95% de edición. Los métodos pueden lograr al menos 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95% de modificación del ADN.

[00183] 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 madre, una HSPC o una población de HSPC. 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.

[00184] En una modalidad, las composiciones de LNP pueden usarse para editar un gen en una célula madre, una HSPC o una población de HSPC, lo cual da como resultado una inactivación del gen. En una modalidad, las composiciones de LNP pueden utilizarse para editar genes en una HSPC o población de HSPC, lo cual da como resultado la atenuación génica, por ejemplo, en la población de células. La atenuación o inactivación puede ser detectada mediante la medición de los niveles de proteína objetivo. La atenuación o inactivación puede ser detectada al detectar el ADN objetivo. En otra modalidad, las composiciones de LNP pueden usarse para editar un gen en una HSPC o una población de HSPC, 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.

[00185] Las composiciones de LNP se pueden administrar 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 el cultivo de célula madre o HSPC y sobre la solubilidad y la estabilidad, y la naturaleza de la forma de dosificación.

[00186] 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).

[00187] 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.

[00188] 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 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.

[00189] 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 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.

[00190] 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 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. Por ejemplo, “alrededor de 50-55” abarca “de alrededor de 50 a alrededor de 55”. Además, el uso de “comprenden”, “comprende”, “que comprende”, “contienen”, “contiene”, “que contiene”, “incluyen”, “incluye” y “que incluye” no es taxativo.

[00191] 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, 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).

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Métodos***Cultivo celular***

[00192] Las células de médula ósea CD34+ humanas criopreservadas se obtuvieron de AllCells (n.º de cat. ABM017F) o StemCell Technologies (n.º de cat. 70008). Después de descongelar y lavar dos veces en 20 ml de StemSpan SFEM (Stem Cell technologies, n.º de cat. 09650), las células se cultivaron durante 48 horas en StemSpan SFEM (StemCell Technologies, n.º de cat. 09650) que contenía trombopoyetina (TPO, 50 ng/ml, StemCell Technologies, n.º de cat. 02922), ligando Flt3 humano (Flt3l, 50 ng/ml, StemCell Technologies, n.º de cat. 78137.2), interleucina-6 humana (Il-6, 50 ng/ml, StemCell Technologies, n.º de cat. 78148.2), factor de células madre humano (SCF, 50 ng/ml, StemCell technologies, n.º de cat. 78155.2) y StemRegenin-1 (SR1, 0,75 uM), así como penicilina/estreptomicina (P/S, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomicina, Life Technologies, n.º de cat. 15140122).

Formulación de nanopartículas lipídicas (“LNP”)

[00193] Las LNP se formularon mediante disolución de componentes de nanopartículas lipídicas en etanol al 100% con las siguientes relaciones molares: 45 % molar (12,7 mM) de lípido de amina (por ejemplo, lípido A); 44 % molar (12,4 mM) de lípido auxiliar (por ejemplo, colesterol); 9 % molar (2,53 mM) de lípido neutro (por ejemplo, DSPC); y 2 % molar (0,563 mM) de lípido de PEG (por ejemplo, PEG2k-DMG o PEG2k-C11), excepto como se especifique de otro modo más adelante. La relación entre N/P (moles de lípido de amina con respecto a moles de ARN) era de 4,5. Los números de identificación para las formulaciones de LNP son los siguientes: LNP522, LNP525 (ARNm de GFP) y LNP670, LNP926 (B2M guía simple, ARNm de Cas9) y LNP899 (AAVS1 guía simple, ARNm de Cas9). Las cargas de ARN se disolvieron en amortiguador de acetato 50 mM, pH 4,5 o 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.

[00194] 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 y diluyeron ya sea en solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,4 (PBS) o Tris 50 mM, pH 7,5 (Tris) (aproximadamente 1:1) para reducir el contenido de etanol antes del procesamiento adicional. El cambio final de amortiguador se completó mediante diálisis en PBS o Tris (exceso de 100 veces de volumen de la muestra), durante la noche a 4 °C con agitación suave mediante el uso de un casete

de diálisis Slide-a-Lyzer™ G2 de 10 kDA (ThermoFisher Scientific). Estas formulaciones procesadas se diluyeron 1:1 en tris 100 mM, solución salina 90 mM, sacarosa al 5% (p/v), pH 7,5 (2x TSS). De manera alternativa, las LNP se recogieron después de la mezcla, se diluyeron en agua, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 hora y se diluyeron una segunda vez 1:1 con agua. El cambio final de amortiguador en TSS se completó con columnas desalinizadoras PD-10 (GE). De ser necesario, las formulaciones obtenidas por cualquiera de los métodos de procesamiento 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. El filtrado resultante se almacenó a 2-8 °C si el amortiguador final era PBS o -80 °C si el amortiguador final era TSS.

10 ***Transcripción in vitro (“IVT”) de ARN guía simple (ARNgs) y ARNm de nucleasa***

[00195] ARNm de Cas9 con casquetes y poliadenilado 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 residuos 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 mediante el uso de un método de precipitación de LiCl.

[00196] Para todos los métodos, la concentración de transcripto se determinó mediante la medición de la absorbancia de luz a 260 nm (Nanodrop) y se analizó el transcripto mediante electroforesis capilar mediante un Bioanalyzer (Agilent). Los ARNgs se sintetizaron químicamente.

Transfección con LNP de células de médula ósea CD34+ humanas

30 [00197] LNP que contenía ya sea ARNm de GFP o ARNm de Cas9 y guía simple dirigido a beta-2-microglobulina (B2M) se agregaron en diversas concentraciones que oscilaban de 50,0 ng a 800,0 ng a

30 000 células de médula ósea CD34+ humanas en un volumen total de 100,0 ul. La secuencia de ARNgs que se dirige a la secuencia objetivo de B2M GGCCACGGAGCGAGACATCT (SEQ ID NO:75) es: mG*mG*mC***CACGGAGCGAGACAUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC** AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO:76). En esta secuencia de ácido nucleico, A, U, G y C indican adenina, uracilo, citosina y guanina, respectivamente, “m” indica nucleótidos de 2’-O-metilo; y “*” indica enlaces fosforotioato.

[00198] Para estudios de suero específicos de la especie (estudios Triple S), se incubaron las LNP en 6,0% de suero de M. musculus (BioreclamationIVT, n.º de cat. MSESRL, n.º de lote MSE245821), M. fascicularis (BioreclamationIVT, n.º de cat. CYNRL, n.º de lote CYN197451) y H. sapiens (Sigma, agrupado, H4522-20ml, n.º de lote SLBR7629V; BioreclamationIVT, n.º de cat. HMSRL, n.º de lote BRH1278638; BioreclamationIVT, n.º de cat. HMSRL, n.º de lote BRH1227947) a 37 °C durante 5 minutos antes de la transfección celular. Se utilizó apolipoproteína E3 recombinante humana (ApoE3, R&D Systems, n.º de cat. 4144-AE) en un intervalo de concentraciones (01 ug/ml, 1,0 ug/ml, 10,0 ug/ml y 50,0 ug/ml) en amortiguador recomendado en las mismas condiciones de incubación descritas anteriormente.

Lectura de citometría de flujo de células de médula ósea CD34+ humanas transfectadas con LNP

[00199] Las células se recogieron para tinción con anticuerpo 24 horas después de la transfección de LNP-GFP o 5 días después de la transfección de LNP-B2M. Después de lavar las células en medio de muestra (PBS + FBS al 2% + EDTA 2 mM), las células se bloquearon con Human TruStain FcX (Biolegend, n.º de cat. 422302) a temperatura ambiente (TA) durante 5 minutos.

[00200] Las células teñidas con los anticuerpos y etiquetas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos y etiquetas.

<u>Anticuerpo</u>	<u>Fluoróforo</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Número de Catálogo</u>
hCD34	Brilliant Violet 421™ (BV421)	Biolegend	343610
hCD38	R-ficoeritrina (PE)	Biolegend	356604
hCD90	PE-Cy™7 (fluoróforo en tándem de tinte de PE-cianina)	Biolegend	328124
hCD45RA	Alexa Fluor® 700	Biolegend	304120

	(AF700)		
hB2M	Aloficocianina (APC)	Biolegend	316312
7-AAD	n/c	Biolegend	420404

[00201] Las células se pasaron por un Beckman Coulter CytoflexS y se analizaron mediante el uso del paquete de software FlowJo.

[00202] La supervivencia celular se evaluó con tinción con 7-AAD. La normalización para células vivas basada en la intercalación de 7-AAD en regiones de ADN ricas en GC y posterior detección en ensayos de citometría de flujo. La supervivencia celular se calculó mediante el uso de la fórmula que sigue:

$$\frac{[(\text{muestra } 1_{\text{cantidad de eventos celulares}} / \text{muestra } 1_{\text{cantidad de eventos de microesferas}}) * \text{muestra } 1_{\text{cantidad total de microesferas agregadas}}] / \text{promedio}\{[(\text{control } 1_{\text{cantidad de eventos celulares}} / \text{control } 1_{\text{cantidad de eventos de microesferas}}) * \text{control } 1_{\text{cantidad total de microesferas agregadas}}], [(\text{control } 2_{\text{cantidad de eventos celulares}} / \text{control } 1_{\text{cantidad de eventos de microesferas}}) * \text{control } 2_{\text{cantidad total de microesferas agregadas}}], \dots, \text{control } N\}}$$

[00203] En la fórmula, “muestra” se define como cualquier población de HSPC CD34+ humanas que, durante el transcurso del experimento, recibieron tratamiento con ya sea LNP, ARNm, ARNg o cualquier combinación de los anteriores y “control” se define como cualquier población de HSPC CD34+ humanas que, durante el transcurso del experimento, no recibieron ningún tratamiento con LNP, ARNm, ARNg o cualquier combinación de estos.

Secuenciación de nueva generación (“NGS”) y análisis para verificar la eficiencia de escisión

[00204] Para determinar de forma cuantitativa la eficiencia de edición en la ubicación objetivo en el genoma, se utilizó secuenciación profunda para identificar la presencia de inserciones y deleciones introducidas mediante edición genética.

[00205] Las células se recopilaron en el día 5 después de la transfección y el ADN se extrajo mediante el uso del mini kit de ADN genómico PureLink (ThermoFisher Scientific, n.º de cat. K182002). Los cebadores para el locus objetivo de B2M contenía las secuencias adaptadoras P5 y P7 de Illumina se utilizaron para amplificar un sitio genómico de interés en una reacción de PCR estándar.

[00206] Se diseñaron cebadores de PCR alrededor del sitio objetivo de B2M y se amplificó el área genómica de interés. Se enviaron muestras para la preparación de muestras (kit de reactivo Illumina MiSeq

v2, 300 ciclos, n.º de cat. 15033624) y se ejecutó la secuenciación en un instrumento Illumina MiSeq. La frecuencia de edición en el locus objetivo de interés se analizó mediante el uso de un proceso personalizado. A grandes rasgos, 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.

- 10 [00207] El porcentaje de edición (por ejemplo, la “eficiencia de edición” o “porcentaje de edición”) se proporciona 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.

Analítica de la formulación

- 15 [00208] Las formulaciones de LNP se analizan para verificar el tamaño de partícula promedio, la polidispersidad (pdi), contenido total de ARN y eficiencia de encapsulación de ARN. 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 diluyen 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.

- 20 [00209] 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 $(\text{ARN total} - \text{ARN libre})/\text{ARN total}$. 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. Se preparan curvas estándar mediante el uso de solución de ARN de partida
25 utilizada para elaborar las formulaciones y se diluyen en 1x amortiguador TE +/- 0,2% de Triton-X tinte 100. Diluted RiboGreen® (100X en 1x amortiguador TE, de acuerdo con las instrucciones del fabricante) se agregan entonces a cada uno de los estándares y muestras y se dejan incubar durante 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
30 488 nm, 515 nm y 525 nm, respectivamente. El ARN total y el ARN libre se determinan a partir de las curvas estándar adecuadas. La eficiencia de encapsulación se calcula como $(\text{ARN total} - \text{ARN libre})/\text{ARN}$

total. El mismo procedimiento se puede utilizar para determinar la eficiencia de encapsulación de un componente de la carga a base de ADN. Puede utilizarse tinte Oligogreen para ADN de cadena simple, y tinte Picogreen para ADN de cadena doble.

Ejemplo 2 – Administración de GFP a células de médula ósea CD34+

5 [00210] Las LNP se formularon como se describe en el Ejemplo 1 con ARNm de GFP en un amortiguador final de PBS y se agregaron a 30 000 células de médula ósea CD34+ humanas en un volumen total de 100,0 μ l, lo que proporcionó 0, 50,0 ng, 100,0 ng y 200,0 ng de ARNm de GFP en diversas reacciones. Antes de la administración a las células, se preincubaron LNP con suero a 6% (v/v) de M. musculus (BioreclamationIVT, n.º de cat. MSES RM, n.º de lote MSE245821) a 37 °C durante 5
10 minutos. Las células se cultivaron como se describe en el Ejemplo 1.

[00211] Las células GFP+ se cuantificaron 24 horas después de la adición de LNP a células CD34+ humanas mediante citometría de flujo. La población de células GFP+ se determinó en canal FITC (excitación máx. 490, emisión máx. 525, línea láser 488) en relación con un control de GFP (marcado “control” en la Fig. 1). El porcentaje de células GFP+ en la totalidad de células de médula ósea CD34+
15 humanas 24 horas después de la administración de ARNm de GFP mediada por LNP se muestra en la Fig. 1. Las composiciones de LNP las siguientes, Fig. 1(A): 45% de lípido A, 44% de colesterol, 9% de DSPC, 2% de PEG; Fig. 1(B): 45% de lípido A, 45% de colesterol, 9% de DSPC, 1% de PEG. Tamaño de muestra biológica n=3.

[00212] Las composiciones de LNP presentaron una administración dependiente de la dosis de ARNm a célula de médula ósea CD34+ *in vitro*.
20

Ejemplo 3 – La preincubación de LNP facilita la administración

[00213] Las pruebas demuestran que las LNP requieren de incubación con suero de ratón al 6% (v/v) antes de la transfección para administrar de manera suficiente ARNm de GFP a células de médula ósea CD34+ humanas. Las células se cultivaron y transfectaron con composiciones de LNP como se describe
25 en el Ejemplo 2 con las siguientes modificaciones:

[00214] la Fig. 2A muestra el porcentaje de células GFP+ en todas las células vivas de muestras de médula ósea CD34+ humanas con aplicación de LNP en el día 0 inmediatamente después de descongelar un vial de células criopreservadas. Las LNP con 50,0 ng, 100,0 ng o 200,0 ng de ARNm de GFP se agregaron a las células con y sin incubación con suero antes de la transfección.

30 [00215] la Fig. 2B muestra el porcentaje de células GFP+ en todas las células vivas de muestras de médula ósea CD34+ humanas con aplicación de LNP en el día 2 después de descongelar un vial de células

criopreservadas. Las LNP con 50,0 ng, 100,0 ng o 200,0 ng de ARNm de GFP se agregaron a las células con y sin incubación con suero antes de la transfección. Tamaño de muestra biológica n=3.

Ejemplo 4 – Administración de Cas9 y ARN guía por medio de LNP; edición génica en células de médula ósea CD34⁺

5 [00216] Las LNP se formularon como se describe en el Ejemplo 1 con ARNGs (G529) y ARNm de Cas9 como se describe en el Ejemplo 1 y a una relación en peso 1:1 en un amortiguador final de TSS. La composición de las LNP era 45% de lípido A, 44% de colesterol, 9% de DSPC, 2% de PEG con una relación entre N/P de 4,5.

10 [00217] Mediante el uso de métodos de administración de LNP a células de médula ósea CD34⁺ humanas transfectadas, se administró de manera eficaz un ARNm de Cas9 y un ARNGs de B2M a células mediante el uso de preincubación con porcentajes en aumento (v/v) de ya sea suero de *M. musculus* o *M. fascicularis*. Los complejos de Cas9 y ARNGs activos se administraron mediante LNP preincubadas con varios sueros.

15 [00218] La Fig. 3A muestra el análisis de FACS de células transfectadas, que muestra el porcentaje de células B2M negativas después de la administración de LNP (a 400,0 ng de ARNGs y ARNm de Cas9 (1:1 en peso)) incubadas con ya sea suero de ratón (“Mouse-S”) a 6%, 30% y 60% (v/v) o suero de primate no humano (“Cyno-S”) a 6%, 30% y 60% (v/v). Las LNP sin preincubación con suero (“solo LNP”) y células sin tratamiento (“Ctrl”) no presentan una administración eficaz (medición de la atenuación de la expresión de B2M). La preincubación con suero de ratón o primate facilita la atenuación eficaz de la expresión de
20 B2M en células de médula ósea CD34⁺.

[00219] La Fig. 3B muestra la frecuencia de edición a nivel genómico según se determina mediante NGS para células de médula ósea CD34⁺ humanas transfectadas con LNP (a 400,0 ng de ARNGs y ARNm de Cas9 (1:1 en peso)) incubadas con ya sea suero de ratón a 6%, 30% y 60% (v/v) o suero de primate no humano a 6%, 30% y 60% (v/v). Como en la Fig. 3(A), la aplicación de LNP sin preincubación con suero y las células sin tratamiento no presentan administración eficaz (medición de % de edición). Las inserciones (“In”, gris claro) y deleciones (“Del”, negro) se grafican en el eje Y, lo cual muestra una eficacia de edición mayor que alrededor de 60%, mayor que alrededor de 70%, mayor que alrededor de 80% y mayor que alrededor de 90% en las células CD34⁺. Las muestras con “solo LNP” y “Ctrl” no presentan niveles detectables de indels en el locus de B2M. Tamaño de muestra biológica n=3.

30 Ejemplo 5 – Preincubación con ApoE3 aislada de factor de suero

[00220] Para investigar si la etapa de preincubación con suero podría sustituirse mediante proteína

recombinante, las LNP, como se describe en el Ejemplo 4, que administran ARNGs de B2M y Cas9, se preincubaron con apolipoproteína E3 (ApoE3) humana recombinante, suero de ratón o suero de primate no humano durante la etapa de incubación de LNP antes de la transfección celular.

[00221] En la Fig. 4A, se muestran los porcentajes de células B2M negativas después de la aplicación de LNP (a 400 ng de ARNGs y ARNm de Cas9 (1:1)) incubadas con ya sea suero de ratón (“mouse-S”) al 6% (v/v), suero de primate no humano (“cyno-S”) al 6% (v/v), o ApoE3 a 0,1 µg/ml, 1,0 µg/ml, 10,0 µg/ml y 50,0 µg/ml. Las células de médula ósea CD34⁺ humanas sin tratamiento sirven como control negativo (“Ctrl”). ApoE3 muestra un aumento dependiente de la dosis en la administración de las células CD34⁺ y puede utilizarse en la etapa de preincubación.

[00222] De manera similar, la edición génica muestra una respuesta dependiente de la dosis a ApoE3. La Fig. 4B muestra el porcentaje de edición de objetivo B2M según se determina mediante NGS para células de médula ósea CD34⁺ humanas transfectadas con 400,0 ng de LNP incubadas con ya sea suero de ratón al 6% (v/v), suero de primate no humano al 6% (v/v) o ApoE3 a 0,1 µg/ml, 1,0 µg/ml, 10,0 µg/ml y 50,0 µg/ml. Las células de médula ósea CD34⁺ humanas sin tratamiento sirven como el control negativo, que no presentan niveles detectables de indels en el locus de B2M. Tamaño de muestra biológica n=3.

Ejemplo 6 – Preincubación sin factores de suero

[00223] Este experimento evaluó la preincubación de LNP con una variedad de apolipoproteínas, que muestra la absorción de LNP *in vitro* con isoformas de ApoE, medida como nivel de atenuación de B2M y frecuencia de edición en una población de HSPC. Antes de la transfección, las LNP (ID LNP926) se incubaron a 37C durante 5 minutos con ya sea 6% de suero de *M. fascicularis* (v/v) o las siguientes apolipoproteínas a diversas concentraciones: ApoA-I humana recombinante (Millipore Sigma, n.º de cat. SRP4693), ApoB de plasma humano (Millipore Sigma, n.º de cat. A5353), ApoC-I de plasma humano (Millipore Sigma, n.º de cat. A7785), ApoE2 humana recombinante (Millipore Sigma, n.º de cat. SRP4760), ApoE3 humana recombinante (Millipore Sigma, n.º de cat. SRP4696), ApoE4 humana recombinante (Millipore Sigma, n.º de cat. A3234). Las LNP se agregaron a células de médula ósea CD34⁺ humanas a una concentración de 200 ng de carga de ARN total (relación 1:1 p/p de guía simple y ARNm de Cas9). La expresión de B2M sobre el nivel de proteína se determinó mediante citometría de flujo mediante el uso de los mismos anticuerpos descritos anteriormente en el día 5 después de la transfección. El análisis de datos se llevó a cabo con el software FlowJo. Los datos representan una muestra biológica (N=1), promedio +/- SD de duplicados técnicos.

[00224] La Fig. 5 muestra la atenuación de B2M en una población de HSPC CD34⁺ después de la

transfección de LNP preincubadas con suero de cynomolgus, ApoE2, ApoE3 y ApoE4. Sin tratamiento, sin preincubación y con preincubación con ApoA-I, ApoB y ApoC-I no dio como resultado la atenuación de B2M. En este experimento, la preincubación de LNP con ApoE2 mostró una atenuación de B2M menor en comparación con las otras dos isoformas de ApoE.

5 Ejemplo 7 – Transcurso temporal de la exposición de LNP

[00225] Este experimento evaluó la duración de la exposición de LNP para su primer impacto sobre las tasas de viabilidad y edición. LNP899, que administra ARNm de Cas9 y AAVS1 dirigido a G562, se preincubó a 37C durante alrededor de 5 minutos con suero de primate no humano al 6% (v/v). Las LNP se agregaron a células de médula ósea CD34+ humanas a una concentración de 300ng de carga de ARN total (relación 1:1 p/p de guía simple y ARNm de Cas9). A las 2 horas, 6 horas o 24 horas después de la transfección, las células se centrifugaron y volvieron a suspender en medio nuevo sin LNP. La viabilidad celular se evaluó a los 3 días y 8 días mediante el uso de microesferas de conteo absoluto CountBright™ (Invitrogen, n.º de cat. C36950) y se midió en un citómetro de flujo CytoFLEXS (Beckman Coulter). La edición se midió mediante NGS como se describe en el Ejemplo 1. La Tabla 3 y la Fig. 6B muestran la frecuencia de edición a los 8 días después de la transducción. La Tabla 3 y la Fig. 6A muestran la viabilidad celular a los 3 días y 8 días después de la transducción.

Tabla 3 – Viabilidad y edición con exposición de LNP variable

Exposición de LNP	Viabilidad 3d (células/ml)	SD de viabilidad 3d	Viabilidad 8d (células/ml)	SD de viabilidad 8d	Frec. de indel	SD de indels
Control negativo	640341	31810	4453259	965751	0,00	0,00
2h	583279	44284	3400929	525282	0,60	0,00
6h	515561	74690	2762987	375265	0,88	0,01
24h	447350	56802	2435103	240977	0,97	0,00

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 1, 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 1, 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
10	Secuencia codificante de ARNm Cas9 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 1 (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 1, 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 1 (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 1, 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 1 (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 1, con codones de inicio y terminación

	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 1 (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 1, 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 1 (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 1, 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 1 (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 1, 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 1 (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
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
63	Secuencia 100 de poli-A
64	ARN guía simple de G209 dirigido al gen TTR de ratón
65	ORF que codifica Cas9 de <i>Neisseria meningitidis</i> mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 1, con codones de inicio y terminación
66	ORF que codifica Cas9 de <i>Neisseria meningitidis</i> mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 1 (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 <i>Neisseria meningitidis</i>)
68	Secuencia de aminoácidos de Cas9 de <i>Neisseria meningitidis</i>
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

[00226] 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: 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

[00227] 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	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACA GCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAG CAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATC AAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAA CAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAT ACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTT CAGCAACGAAATGGCAAAGGTTCGACGACAGCTTCTTCCACAGAC TGGAAGAAAGCTTCCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAG ACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACG AAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGA CAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGG CACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGAC CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCT GGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAG CAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGA GAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCC TGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAA GACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACC TGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTG TTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGA CATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGC GCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGA CACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTA CAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGA	1

	TACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTG GTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACAT TCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTG CACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAA GGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATC CCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGC ATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAAC TTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCA TCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAA GGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCT ACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAG AAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCT GAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCG AAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAAC ATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGAC ACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTG AAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCT GAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAA GCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATC CTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTCAT GCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCC AGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACA CATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATC CTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGG AAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAA AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGA ATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGA TCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGA	
--	--	--

	AAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACG TCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTC GACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGA CAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAAGAGAGGAAAGAGC GACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAAGT ACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAA CTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAA GACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTC AAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAA AGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCAC CACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCCGGAACAGCACT GATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGA GACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAG CAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACG GAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAAC AGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTC AGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGA CAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCC GAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGG GACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCAT ACAGCGTCCTGGTCGTTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAA GAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATG GAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAG CAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCT GCCGAAGTACAGCCTGTTTGAAGTGGAAAACGGAAGAAAGAGA ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGG CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCAC TACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC	
--	---	--

	AGCTGTTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATC GAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGA CAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCA CACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGAC ACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCC TGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAA ACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAA GCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG	
Secuencia 1 codificante de ADN de Cas9	ATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTC CGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCA AGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAA GAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCG CAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACAC CCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGA ACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAA GAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCC TATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGT ACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACT GACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATAT GATCAAATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACC CTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAACTGGTGCAG ACCTACAACCAACTGTTTGAAGAAAACCCAATCAATGCTAGCGG CGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCTGAAGTCGC GGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAA GAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCAC TCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGC TGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTG CTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTTCTTGCCGC TAAGAACCTTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGT GAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTA	2

	AGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCG CTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTT CGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGC GCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGA AAAGATGGACGGAACCGAAGAAGTCTGCTGGTCAAGCTGAACAGG GAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACAACGGATCCAT TCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGC GCCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAG ATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCC ACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAAT CAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGAT AAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAATGACCAACTT CGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCC TCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAAGTACTAAAGTG AAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGG AGAACAGAAGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACC GCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAA GATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAATCAGCGGGGTGGAGGACA GATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATC ATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACA TCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCG AGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGAC GATAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCGGTACACTGGTTG GGGCCGCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAAC AGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCTCTCAAATCGGATGGCTTC GCTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGAC CTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGCACAAAGTGTCGGACAGGGA GACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGC GATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACGTGAAGGTGGTCGACGAG CTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGA TTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAA	
--	--	--

	AAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAG GAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAACA CGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAAT GGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTT GTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAA GGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGA ACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAA GAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTG ATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCG CGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGC TGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTG GACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCAT CCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCGG ACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAAC AACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGG TACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTG TGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGC CAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAATACTTC TTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTG GCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACG GAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGC AACTGTTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGA AGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGAT CCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAA GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGT CGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAG AGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCAT CATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCTCG AGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAA ACTCCCCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGC GCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCT	
--	---	--

	GGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCA CTACGAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAG CAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCAT CGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACG CCAACCTCGACAAAGTCCTGTGCGGCCTACAATAAGCATAGAGAT AAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTTAC CCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATA CTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTG GACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAAC TAGGATCGATCTGTGCGCAGCTGGGTGGCGATGGCGGTGGATCTC CGAAAAAGAAGAGAAAGGTGTAATGA	
Secuencia de aminoácidos de Cas9:	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKN LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKV DDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK KLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQ LVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK NGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLA QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDE HHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSL YFYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDF LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKV DELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKE LGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMK	3

	NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVYD VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSK KLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSL FELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQSTGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV	
Marco de lectura abierto (ORF) 2 de ARNm de Cas9	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAAC AGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCG AGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGC AUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGA GAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGA AGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUC ACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGC ACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGC AUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAG CUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACC UGGCACUGGCACACAUGAUCUAGUUCAGAGGACACUUCUGA UCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCU GUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAA AACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCG CACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACC UGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAA CUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGAC	4

ACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAG ACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGA CGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUC ACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGAC GAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGAC AGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGA GCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCC AGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUAAGCCGAUCCUGGAAAAGA UGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAG ACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCC GCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAG AUCGAAAAGAUCUGACAUAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGAC CGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAA AGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGA CAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCA UUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUG UUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAA GACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUC AGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAC CACGACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACA ACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACAC UGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGA AGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAA GCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAU CCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAUCAAGGAAGACA	
---	--

UCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGA ACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUC AUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCA AGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGA AGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGC AGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAG ACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCG ACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGA CGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAG AAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUG AUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGA GGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU	
--	--

	CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGG AAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAG	
ORF 1 de ARNm de Cas9	AUGGAUAAGAAGUACUCAUUCGGGCUGGAUAUCGGAACUAAU UCCGUGGGGUUGGGCAGUGAUCACGGAUGAAUACAAAGUGCCG UCCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGGAACACCGAUAGACACAGC AUCAAGAAAAAUCUCAUCGGAGCCCUGCUGUUUGACUCCGGCG AAACCGCAGAAAGCGACCCGGCUCAAACGUACCGCGAGGCGACG CUACACCCGGCGGAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUC UUUUCGAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACC GCCUGGAAGAAUCUUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCAUG AACGGCAUCCUAUCUUUGGAAACAUCGUCGACGAAGUGGCGU ACCACGAAAAGUACCCGACCAUCUACCAUCUGCGGAAGAAGUU GGUUGACUCAACUGACAAGGCCGACCUCAGAUUGAUCUACUU GGCCCUCGCCCAUAUGAUCAAAUUCCGCGGACACUUCUGAUC GAAGGCGAUCUGAACCCUGAUAAACUCCGACGUGGAUAAGCUU	5

UUCAUUCAACUGGUGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAGAA AACCCAAUCA AUGCUAGCGGCGUCGAUGCCAAGGCCAUCCUGU CCGCCCCGGCUGUCGAAGUCGCGGCGCCUCGAAAACCUGAUCGC ACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACUUUUCGGCAACUU GAUCGCUCUCUCACUGGGACUCACUCCCAAUUUCAAGUCCAAU UUUGACCUGGCCGAGGACGCGAAGCUGCAACUCUCAAGGACA CCUACGACGACGACUUGGACAAUUUGCUGGCACAAAUUGGCG AUCAGUACGCGGAUCUGUUCCUUGCCGCUAAGAACC UUUCGGA CGCAAUCUUGCUGUCCGAUAUCCUGCGCGUGAACACCGAAAUA ACCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUCGAUGAUUAAGCGGUACGACG AGCAUCACCAGGAUCUCACGCUGCUCAAAGCGCUCGUGAGACA GCAACUGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCC AAGAAUGGGUACGCAGGGUACAUCGAUGGAGGCGCUAGCCAG GAAGAGUUCUAUAAGUUCAUCAAGCCAAUCCUGGAAAAGAUG GACGGAACCGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGGGAGGAU CUGCUCGCGGAAACAGAGAACC UUUGACAACGGAUCCA UUUCCC ACCAGAUCCAUCUGGGUGAGCUGCACGCCAU CUUGCGGCGCCA GGAGGACUUUUACCCA UUCCUCAAGGACAACCGGGAAAAGAU CGAGAAAAUUCUGACGUUCCGCAUCCCGUAUUACGUGGGCCCA CUGGCGCGCGGCAAUUCGCGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAA UCAGAGGAAACCAUCACUCCUUGGAAUUUCGAGGAAGUUGUG GAUAAGGGAGCUUCGGCACAAAGCUUCAUCGAACGAAUGACC AACUUCGACAAGAAUCUCCCAAACGAGAAGGUGCUUCCUAAGC ACAGCCUCCUUUACGAAUACUUCACUGUCUACAACGAACUGAC UAAAGUGAAAUACGUUACUGAAGGAAUGAGGAAGCCGGCCUU UCUGUCCGGAGAACAGAAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGCUGUU CAAGACCAACCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUUAAAGAGGAC UACUUCAAGAAGAUCGAGUGUUUCGACUCAGUGGAAAUCAGC GGGGUGGAGGACAGAUUCAACGCUUCGCUGGGAACCUAUCAU GAUCUCCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUUGACAAC GAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAAGAU AUCGUCCUGACCUUG	
---	--

ACCCUUUUCGAGGAUCGCGAGAUGAUCGAGGAGAGGCUUAAG ACCUACGCUCAUCUCUUCGACGAUAAGGUCAUGAAACAACUCA AGCGCCGCCGGUACACUGGUUGGGGCCGCCUCUCCCGCAAGCU GAUCAACGGUAUUCGCGAUA AACAGAGCGGUAAAACUAUCCU GGAUUUCCUCAAAUCGGAUGGCUUCGCUAAUCGUAACUUCAU GCAAUUGAUCCACGACGACAGCCUGACCUUUAAGGAGGACAUC CAAAAAGCACAAGUGUCCGGACAGGGAGACUCACUCCAUGAAC ACAUCGCGAAUCUGGCCGGUUCGCCGGCGAUUAAGAAGGGAA UUCUGCAAACUGUGAAGGUGGUCGACGAGCUGGUGAAGGUCA UGGGACGGCACAAACCGGAGAAUAUCGUGAUUGAAAUGGCCC GAGAAAACCAGACUACCCAGAAGGGCCAGAAAAACUCCCGCGA AAGGAUGAAGCGGAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAGCUGGGCAG CCAGAUCCUGAAAGAGCACCCGGUGGAAAACACGCAGCUGCAG AACGAGAAGCUCUACCUGUACUAUUUGCAAAAUGGACGGGAC AUGUACGUGGACCAAGAGCUGGACAUCAAUCGGUUGUCUGAU UACGACGUGGACCACAUCGUUCCACAGUCCUUUCUGAAGGAUG ACUCGAUCGAUAACAAGGUGUUGACUCGCAGCGACAAGAACA GAGGGAAGUCAGAUAAUGUGCCAUCGGAGGAGGUCGUGAAGA AGAUGAAGAAUUCUGGCCGGCAGCUCCUGAAUGCGAAGCUGA UUACCCAGAGAAAGUUUGACAAUCUCACUAAAGCCGAGCGCG GCGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUGGAUUCAUCAAACGGC AGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCGCAGA UCUUGGACUCCCGCAUGAACACUAAAUACGACGAGAACGAUA AGCUCAUCCGGGAAGUGAAGGUGAUUACCCUGAAAAGCAAAC UUGUGUCGGACUUUCGGAAGGACUUUCAGUUUUACAAAGUGA GAGAAUACAACAACUACCAUCACGCGCAUGACGCAUACCUCAA CGCUGUGGUCGGUACCGCCCUGAUCAAAAAGUACCCUAAACUU GAAUCGGAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUG AGGAAGAUGAUAGCCAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCA ACUGCGAAAUACUUCUUUUACUCAACAUCAUGAACUUUUUC AAGACUGAAAUAACGCUGGCCAAUGGAGAAAUCAGGAAGAGG	
--	--

	CCACUGAUCGAAACUAACGGAGAAACGGGCGAAAUCGUGUGG GACAAGGGCAGGGACUUCGCAACUGUUCGCAAAGUGCUCUCU AUGCCGCAAGUCAAUUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACC GGCGGAUUUCAAAGGAAUCGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAGC GACAAGCUCAUUGCACGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAG UACGGAGGAUUCGAUUCGCCGACUGUCGCAUACUCCGUCCUCG UGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCUCAAAU CCGUCAAAGAGCUGCUGGGGAUUACCAUCAUGGAACGAUCCUC GUUCGAGAAGAACCCGAUUGAUUUCUCCUGAGGCGAAGGGUUA CAAGGAGGUGAAGAAGGAUCUGAUCAUCAAAACUCCCCAAGUA CUCACUGUUCGAACUGGAAAAUGGUCGGAAGCGCAUGCUGGC UUCGGCCGGAGAACUCCAAAAAGGAAAUGAGCUGGCCUUGCC UAGCAAGUACGUCAACUCCUCUAUCUUGCUUCGCACUACGAA AAACUCAAGGGUCACCGGAAGAUAAACGAACAGAAGCAGCUU UUCGUGGAGCAGCACAAGCAUUAUCUGGAUGAAAUCAUCGAA CAAUCUCCGAGUUUCAAAGCGCGUGAUCCUCGCCGACGCCA ACCUCGACAAAGUCCUGUCGGCCUACAAUAAGCAUAGAGAU AGCCGAUCAGAGAACAGGCCGAGAACAUUAUCCACUUGUUCAC CCUGACUAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUCAAGUACUUCGAU ACUACUAUCGAUCGCAAAAGAUACACGUCCACCAAGGAAGUUC UGGACGCGACCCUGAUCCACCAAAGCAUCACUGGACUCUACGA AACUAGGAUCGAUCUGUCGCAGCUGGGUGGCGAUGGCGGUGG AUCUCCGAAAAAGAAGAGAAAGGUGUAAUGA	
Secuencia codificante limpia de Cas9	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGC GUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGC AAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUC AAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAA ACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGA UACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACA	10

	GACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACG AAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUA CCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUG GUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGG CACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUC AUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGC AAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACA GCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAU CGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACA UACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACC AGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC AAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACA AAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAA CACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCA AGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGG AAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGG ACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACC UGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGC ACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACA GGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU CGAAAAGA UCCUGACA UUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCG CUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAG AGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUC GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGC ACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGAC AAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAU	
--	---	--

	CCUGAGCGGAGAACAGAAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUU CAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAUUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAG CGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAG ACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGA AGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC UGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCC UGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCA UGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAA CACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAA UCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCA UGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAA GAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAA GCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCA GAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAACAGACUGAGCGAC UACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACG ACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGA AGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAG GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGAC AGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA	
--	---	--

	GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGG AAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUC	
Secuencia de	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKN	13

aminoácidos de Cas9 (sin NLS)	LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKV DDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK KLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQ LVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK NGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDDLNDLLA QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDE HHQDLTLLKALVRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSL YEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDF LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTIAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKE LGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMK NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTAKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYD VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKVKSK KLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSL FELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD	
ORF de ARNm	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAAC	14

de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 13 mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 1, con codones de inicio y terminación	AGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCG AGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGC AUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGA GAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGA AGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUC ACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGC ACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGC AUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAG CUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACC UGGCACUGGCACACAUGAUCUAGUUCAGAGGACACUUCCUGA UCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCU GUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAA AACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCG CACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACC UGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAA CUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGAC ACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAG ACCAGUACGCAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGA CGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAAUC ACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCUAGAGAUACGAC GAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGAC AGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGA GCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCC AGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUAGCCGAUCCUGGAAAAGA UGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAG ACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCC GCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAG AUCGAAAAGAUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGAC	
---	---	--

	CGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAA AGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGA CAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCA UUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUG UUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAA GACUACUUCAAGAAGAUUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUC AGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAAC CACGACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACA ACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACAC UGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGA AGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAA GCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAU CCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACA UCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGA ACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUC AUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCA AGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGA AGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGC AGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAG ACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCG ACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGA CGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAG AAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUG	
--	---	--

AUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGA GGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAACCGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUUCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA	
---	--

	CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACUAG	
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 1 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGC GUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGC AAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUC AAGAAGAACCUGAUUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAA ACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGA UACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACA GACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACG AAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUA CCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUG GUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGG CACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUC AUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGC AAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACA GCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAU CGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUAAGAGCAACUUC GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACA UACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACC AGUACGCAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC AAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACA AAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAA CACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCA AGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGG AAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGG	15

ACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACC UGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGC ACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACA GGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU CGAAAAGA UCCUGACA UUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCG CUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAG AGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUC GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGC ACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGAC AAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUU CCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUU CAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAG CGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACA UCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAG ACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGA AGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC UGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCC UGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCA UGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACA UUCAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAA CACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAA UCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCA UGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAA GAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAA GCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCA GAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA	
--	--

	CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGAC UACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACG ACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGA AGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAG GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGAC AGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG	
--	--	--

	UUCGU CGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACC GGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC	
Secuencia de aminoácidos de nickasa Cas9 (sin NLS)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKN LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKV DDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK KLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQ LVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK NGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLA QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDE HHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSSL YEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDF LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYYAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKE LGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMK NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF YKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYD	16

	VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET NGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSK KLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSL FELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD	
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 1, con codones de inicio y terminación	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAAC AGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCG AGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGC AUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGA GAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGA AGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUC ACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGC ACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGC AUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAG CUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACC UGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCCUGA UCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCU GUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAA AACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCG CACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACC UGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUAAGAGCAA CUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGAC ACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAG ACCAGUACGCAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGA CGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAAUC	17

ACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUGAAGAGAUACGAC GAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGAC AGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGA GCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCC AGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUAAGCCGAUCCUGGAAAAGA UGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAG ACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCCC GCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAG AUCGAAAAGAUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGAC CGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAA AGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGA CAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCA UUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUG UUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAA GACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUC AGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAC CACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGGACA ACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACAC UGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGA AGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAA GCUGAUGAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAU CCUGGACUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUCUUAAGGAAGACA UCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGA ACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUC	
--	--

AUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCA AGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGA AGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGC AGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAG ACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCG ACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGA CGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAG AAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUG AUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGA GGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGUA	
--	--

	CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGUUGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACUAG	
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 1 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGC GUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGC AAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUC AAGAAGAACCUGAUUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAA ACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGA UACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACA GACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACG AAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUA CCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUG GUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGG CACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUC AUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGC AAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACA GCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAU CGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUAAGAGCAACUUC	18

proteínas de fusión)	GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACA UACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACC AGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC AAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACA AAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAA CACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUUCUUCUUCGACCAGAGCA AGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGG AAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGG ACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACC UGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGC ACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACA GGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU CGAAAAGAUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCG CUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAG AGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUC GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGC ACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGAC AAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUU CCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUU CAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAG CGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAG ACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGA AGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC UGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCC UGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCA
----------------------	---

UGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAA CACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAA UCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCA UGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAA GAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAA GCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCA GAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGAC UACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACG ACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGA AGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAG GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGAC AGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU	
--	--

	ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGU CGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACC GGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC	
Secuencia de aminoácidos de dCas9 (sin NLS)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKN LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKV DDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK KLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQ LVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK NGLFGNLIASLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLA QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDE HHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFY PFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSL YEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDF LDNEENEDI EDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLK	19

	RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKE LGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMK NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF YKVBREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYD VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSK KLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSL FELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD	
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 1, con codones de inicio y terminación	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAAC AGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCG AGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGC AUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGA GAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGA AGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUC ACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGC ACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGC AUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAG CUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACC UGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUUCCUGA UCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCU GUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAA	20

AACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCG CACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACC UGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAA CUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGAC ACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAG ACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGA CGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUC ACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGAC GAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGAC AGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGA GCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCC AGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUAAGCCGAUCCUGGAAAAGA UGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAG ACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCC GCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAG AUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGAC CGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAA AGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGA CAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCA UUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUG UUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAA GACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUC AGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAC CACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACA ACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACAC UGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAGACUGA	
--	--

AGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAA GCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAU CCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACA UCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGA ACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUC AUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCA AGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGA AGCCAGAUCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGC AGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAG ACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCG ACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGA CGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAG AAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUG AUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGA GGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG	
--	--

	ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUUCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGUCAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACUAG	
Secuencia codificante de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 19 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGC GUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGC AAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUC AAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAA ACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGA UACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAU UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUUCGACGACAGCUUCUCCACA GACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACG AAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUA CCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUG	21

Tabla 1 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)	GUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGG CACUGGCACACAUGAUGAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUC AUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUGAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGC AAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACA GCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAU CGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACA UACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGGAGACC AGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC AAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACA AAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUGAAGAGAUACGACGAA CACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCA AGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGG AAGAAUUCUACAAGUUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGG ACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACC UGCUGAGAAAGCAGAGAAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGC ACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACA GGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU CGAAAAGAUGCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCG CUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAG AGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUC GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGC ACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGAC AAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUU CCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUU CAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAUUGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAG
--	--

	CGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCCAC GACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAG ACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGA AGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC UGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCC UGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCA UGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAA CACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAA UCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCA UGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAA GAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAA GCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCA GAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAACAGACUGAGCGAC UACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACG ACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGA AGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAG GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGAC AGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC	
--	--	--

	AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGGAUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGG AAGC	
Secuencia de aminoácidos de Cas9 con dos señales de localización	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKKN LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKV DDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK KLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQ LVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKK	22

nuclear como los aminoácidos del extremo C	NGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLA QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDE HHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSL YEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDF LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTIAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKE LGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMK NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF YKVBREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYD VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKKGSK KLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSL FELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD GSGSPKKKRKVDGSPKKKRKVD SG	
ORF de ARNm de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 22	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAAC AGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCG AGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGC AUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGA	23

mediante el uso de codones de uridina mínima como se indica en la Tabla 1, con codones de inicio y terminación	GAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGA AGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUC ACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGC ACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGC AUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAG CUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACC UGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGA UCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCU GUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAA AACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCG CACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACC UGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAA CUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGAC ACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAG ACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGA CGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUC ACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGAC GAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGAC AGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGA GCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCC AGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAAGCCGAUCCUGGAAAAGA UGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAG ACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCCC GCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAG AUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGAC CGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAA AGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGA	
---	---	--

	CAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCA UUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUG UUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAA GACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUC AGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAC CACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACA ACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACAC UGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGA AGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAA GCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAU CCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAAGGAAGACA UCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGA ACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUC AUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCA AGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGA AGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGC AGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAG ACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAACAGACUGAGCG ACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGA CGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAG AAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUG AUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGA GGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAAAAGCACGUCGCACAGA	
--	--	--

UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUUCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCAGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGG	
---	--

	AAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAA GAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG	
Secuencia codificante de Cas9 que codifica la SEQ ID NO: 23 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 1 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGC GUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGC AAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUC AAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAA ACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGA UACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAU UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACA GACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACG AAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUA CCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUG GUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGG CACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUC AUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGC AAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACA GCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAU CGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUAAGAGCAACUUC GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACA UACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACC AGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC AAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACA AAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAA CACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCA AGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGG AAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGG ACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACC	24

UGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGC ACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACA GGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU CGAAAAGA UCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCG CUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAG AGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUC GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGC ACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGAC AAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUU CCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUU CAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAG CGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAG ACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGA AGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC UGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCC UGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCA UGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAA CACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAA UCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCA UGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAA GAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAA GCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCA GAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGAC	
---	--

UACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACG ACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGA AGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAG GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGAC AGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACACAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUUCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC	
---	--

	AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGG AAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAA GAAGAGAAAGGUUCGACAGCGGA	
Secuencia de aminoácidos de nickasa Cas9 con dos señales de localización nuclear como los aminoácidos del extremo C	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKN LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKV DDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK KLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQ LVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK NGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLA QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDE HHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSL YEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDF LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTIAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFQMQLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKE LGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMK NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF	25

	YKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYD VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET NGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSK KLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSL FELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD GSGSPKKKRKVDGSPKKKRK 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 1, con codones de inicio y terminación	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAAC AGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCG AGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGC AUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGA GAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGA AGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUC ACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGC ACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGC AUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAG CUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACC UGGCACUGGCACACAUGAUGAAGUUCAGAGGACACUUCUGA UCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCU GUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAA AACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCG CACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACC UGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAA CUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGAC ACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAG	26

ACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGA CGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUC ACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGAC GAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGAC AGCAGCUGCCGGAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGA GCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCC AGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAAGCCGAUCCUGGAAAAGA UGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAG ACCUGCUGAGAAAGCAGAGAAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCC GCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAG AUCGAAAAGAUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGAC CGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAA AGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGA CAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCA UUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUG UUCAAGACAAACAGAAAGGUACAGUCAAGCAGCUGAAGGAA GACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUC AGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAAC CACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUCCUGGACA ACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACAC UGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGA AGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAA GCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAU CCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUCUCAAAGGAAGACA UCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGA	
--	--

ACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUC AUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCA AGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGA AGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGC AGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAG ACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCG ACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGA CGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAG AAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUG AUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGA GGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG	
---	--

	CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCAGGAGCAUUAAGUACUUCGACA CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGG AAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAA GAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG	
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 1 (sin codones de inicio o terminación;	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGC GUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGC AAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUC AAGAAGAACCUGAUUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAA ACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGA UACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAU UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACA GACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACG AAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUA CCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUG GUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUUCUACCUGG CACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUC AUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC	27

adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)	CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGC AAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACA GCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAU CGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACA UACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACC AGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC AAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACA AAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAA CACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCA AGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGG AAGAAUUCUACAAGUUCAUAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGG ACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACC UGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGC ACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACA GGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU CGAAAAGA UCCUGACA UUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCG CUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAG AGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUC GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGC ACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGAC AAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUU CCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUU CAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAG CGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACA UCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAG	
--	---	--

ACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGA AGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC UGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCC UGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUUCGCAAACAGAAACUUCA UGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAA CACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAA UCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCA UGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAA GAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAA GCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCA GAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGAC UACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACG ACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGA AGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAG GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGAC AGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG	
---	--

	ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUUCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGUCAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGC CCGAAGAAGAAGAGAAAGGUUCGACAGCGGA	
Secuencia de aminoácidos de dCas9 con dos señales de localización nuclear como los aminoácidos del extremo C	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKN LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKV DDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK KLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQ LVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK NGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLA QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDE HHQDLTLLKALVRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY	28

	KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLL YEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRNASLGTYHDLLKIIKDKDF LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTIAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKV DELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKE LGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMK NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYD VRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSK KLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSL FELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV LDATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGDGGSGPKKKRKVDGSPKKRK VDSG	
ORF de ARNm de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 28 mediante el uso de codones de uridina mínima	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAAC AGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCG AGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGC AUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGA GAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGA AGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCC	29

como se indica en la Tabla 1, con codones de inicio y terminación	ACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGC ACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGC AUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAG CUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACC UGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGA UCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCU GUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAA AACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCG CACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACC UGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAA CUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGAC ACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGGAG ACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGA CGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUC ACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGAC GAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGAC AGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGA GCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCC AGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUAAGCCGAUCCUGGAAAAGA UGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAG ACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCC GCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAG AUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGAC CGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAA AGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCG UCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGA CAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUG ACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCA	
--	---	--

UCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUG UUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAA GACUACUUCAAGAAGAUUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUC AGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAC CACGACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACA ACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACAC UGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGA AGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAA GCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAU CCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACA UCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGA ACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUC AUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCA AGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA GAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGA AGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGC AGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAG ACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCG ACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGA CGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAG AAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUG AUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGA GGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA	
--	--

	GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGC CCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG	
Secuencia	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGC	30

codificante de dCas9 que codifica la SEQ ID NO: 28 mediante el uso de codones de uridina mínima, como se indica en la Tabla 1 (sin codones de inicio o terminación; adecuados para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)	GUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGC AAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUC AAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAA ACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGA UACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACA GACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACG AAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUA CCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUG GUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGG CACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUC AUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACC CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGC AAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACA GCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAU CGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACA UACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACC AGUACGCAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC AAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACA AAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAA CACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCA AGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGG AAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGG ACGGAACAGAAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACC UGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGC ACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACA GGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU CGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCG	
--	---	--

	CUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAG AGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUC GACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGC ACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGAC AAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUU CCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUU CAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGA CUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAG CGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUG ACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAG ACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGA AGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC UGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCC UGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCA UGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAA CACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAA UCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCA UGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAA GAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAA GCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCA GAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAACAGACUGAGCGAC UACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACG ACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGA AGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA	
--	--	--

UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAG GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGAC AGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGC UGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCA GAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAA CGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUC AGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCA ACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCA AGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGAC CGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGG ACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGUA CAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCC GAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAA AAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUG UUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAA ACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACA CUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACA	
--	--

	CAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGA AACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGC CCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGA	
Promotor T7	TAATACGACTCACTATA	31
UTR 5' de beta-globina humana	ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACA GACACC	32
UTR 3' de beta-globina humana	GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCTTTGTTCC CTAAGTCCAACCTACTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGA GCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGC	33
UTR 5' de alfa-globina humana	CATAAACCCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTCTTCTGGTCCCC ACAGACTCAGAGAGAACCCACC	34
UTR 3' de alfa-globina humana	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTGGGCCTCCCCC CAGCCCCCTCCTCCCCTTCTGACCCCGTACCCCCGTGGTCTTTGA ATAAAGTCTGAGTGGGCGGC	35
UTR 5' de <i>Xenopus laevis</i>	AAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCC	36
UTR 3' de <i>Xenopus laevis</i>	ACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCTACATAAT ACCAACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCCCAAATGTAGCCA TTCGTATCTGCTCCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCT	37
UTR 5' de hormona bovina del crecimiento	CAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCAGCT	38
UTR 3' de hormona bovina del crecimiento	TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGAC CCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGG AAATTGCATCGCA	39

UTR 3' de hemoglobina alfa cadena adulta 1 (Hba-a1) de Mus musculus	GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAG	40
UTR 5' de HSD17B4	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTC	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	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAAGACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAAC	43

	GGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACC GAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTG CAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGC TGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCA AAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGT CAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATC AAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGG CACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTC TTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAG GAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTG GAAAAGATGGACGGAACAGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACA GAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAG CATCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGA GAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGA AAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCTG GACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAG AAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAAGTTCTGAAGAAGTC GTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGA CAAAGTTCTGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAA GCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGA CAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATT CCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCA AGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTA CTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAG TCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTG CTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAA ACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTC GAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCAC ACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAG ATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGA	
--	--	--

AGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCAC GACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGG TCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCT GGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTC AAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGC CGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAAT CGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAA CACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACC TGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGA ACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCG TCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTC CTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCC CGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACA GCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTTCGACAAC CTGACAAAGGCAGAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGG CAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCAC AAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAG TACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCA CACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAG TTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGA CGCATACCTGAACGCAGTCGTGGAACAGCACTGATCAAGAAGT ACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTC TACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCG GAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAAC TTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAA AGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGT CTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTG AGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGA CAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAG CGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAG	
---	--

	TACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGT CGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGC GTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCT TCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAA GGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGC CTGTTCTGAAGTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCG CAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAA GTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGA AGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTCTGA ACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACA AGGTCCTGAGCGCATAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAG AGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACTGACAAACC TGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGAC AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACAC TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGA CCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAG AAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGC CTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTA TTCATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCT AAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCT TCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
ORF de Cas9 alternativo con contenido de U del 19,36%	ATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAACATAATTC CGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCA AGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAA GAAGAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCG CAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACAC CCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGA ACGAAATGGCAAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAA GAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCC	45

TATCTTTGGAAACATCGTGGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGT ACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACT GACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATAT GATCAAATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACC CTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTGTTTCATTCAACTGGTGACG ACCTACAACCAACTGTTCTGAAGAAAACCCAATCAATGCCAGCGG CGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCTGAAGTCGC GGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAGAA GAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCAC TCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGC TGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGACAAATTTG CTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCTTGCCTG TAAGAACCTTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGT GAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTA AGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCG CTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATTTTCTT CGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGC GCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGA AAAGATGGACGGAACCGAAGAAGTCTGCTGGTCAAGCTGAACAGG GAGGATCTGCTCCGCAAACAGAGAACCTTTGACAACGGAAGCAT TCCACACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCCTG GCCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAG ATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCC ACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAAT CAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGAT AAGGGAGCTTCGGCACAATCCTTCATCGAACGAATGACCAACTT CGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCC TCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAAGTACTAAAGTG AAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGAGCGG AGAACAGAAGAAAGCGATTGTCTGATCTGCTGTTCAAGACCAACC GCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAA	
--	--

	GATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGAGTGGAGGACA GATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATC ATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACA TCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCG AGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGAC GATAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCGGTACACTGGTTG GGGCCGCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAAC AGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTC GCTAATCGTAACTTCATGCAGTTGATCCACGACGACAGCCTGAC CTTTAAGGAGGACATCCAGAAAGCACAAAGTGAGCGGACAGGGA GACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGC GATTAAGAAGGGAATCCTGCAAACCTGTGAAGGTGGTGGACGAG CTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGA TTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAA GAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAG GAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACA CGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAT GGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTT GTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAA GGATGACTCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGA ACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTTCGTGAA GAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTG ATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGG CGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGC TGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTG GACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCAT CCGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCGG ACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAAC AACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGG CACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTG TGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGC	
--	---	--

	CAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAATACTTC TTTTACTCAAACATCATGAACTTCTTCAAGACTGAAATTACGCTG GCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACG GAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGC AACTGTTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGA AGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGAT CCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAA GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGT CGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAG AGCAAGAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCAT CATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCTTG AGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAA ACTGCCCAAGTACTCACTGTTCTGAACTGGAAAATGGTCGGAAGC GCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAGAAAGGAAATGAGCT GGCCTTGCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCA CTACGAGAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAG CAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCAT CGAACAAATCTCCGAGTTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACG CCAACCTCGACAAAGTCCTGTGGCCTACAATAAGCATAGAGAT AAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTTAC CCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATA CTACTATCGACCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTG GACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAAC TAGGATCGATCTGTGCGAGCTGGGTGGCGATGGTGGCGGTGGAT CCTACCCATACGACGTGCCTGACTACGCCTCCGGAGGTGGTGGC CCCAAGAAGAAACGGAAGGTGTGATAG	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGT GTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCTGCCACCATGGATAAGAAGT ACTCGATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGTGGGCA GTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGT	46

correspondiente a la SEQ ID NO: 45, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB	CCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAGAATCTCATC GGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCG GCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAAT CGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAATGGCAAA GGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGG TGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAA CATCGTGGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCT ACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGAC CTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGC GGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGA CGTGGATAAGCTGTTCAATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAAC TGTTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCCAGCGGCGTCGATGCCAAG GCCATCCTGTCCGCCCCGGCTGTCTGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAA CCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAGAAGAACGGACTTTTCG GCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGT CCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAG GACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGG CGATCAGTACGCGGATCTGTTCTTGCCGCTAAGAACCTTTTCGG ACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATA ACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGA GCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGC AACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATTTTCTTCGACCAGTCCAAG AATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCCAGCCAGGAAG AGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGA ACCGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCG CAAACAGAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACACCAGATCC ATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTT TACCCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCT GACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCA ATTGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATC ACTCCTTGGAATTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGC	
---	--	--

ACAATCCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCC CAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATAC TTCAGTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGA AGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAA GCGATTGTGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGT CAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCG ACTCAGTGGAATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCG CTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGA CTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCG TCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAG AGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAA ACAACCTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCC GCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAACT ATCCTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTC ATGCAGTTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACAT CCAGAAAGCACAAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAA CACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAAT CCTGCAAACGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTCATGG GACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGA AAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGCGAAAGG ATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGA TCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGA GAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACG TGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTG GACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCCATCGAT AACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAG ATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTA CTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGT TTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTG GATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCA GATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAACA	
--	--

	CTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGT GATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCTGGACTTTCGGAAGGACT TTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACTACCATCACGCG CATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCTGGCACC GCCCTGATCAA GAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACA AGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGA AATCGGGAAAGCAAACCTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCA TGAACCTTCTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATC AGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAA TCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAAAGTG CTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCA AACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATA GCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAA GTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTCGCATACTCCGTCCTCGT GGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCC GTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTT CGAGAAGAACCCGATTGATTTCTTGAGGGCGAAGGGTTACAAG GAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACCTGCCAAGTACTCACT GTTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCG GAGAACTCCAGAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTA CGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAGAACTCAAAGG GTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAG CACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTT TTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCC TGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACA GGCCGAGAACATTATCCACTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAG CTCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGACCGCAAA AGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCA CCAAAGCATCACTGGACTCTACGAACTAGGATCGATCTGTCTGC AGCTGGGTGGCGATGGTGGCGGTGGATCCTACCCATACGACGTG CCTGACTACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCCCAAGAAGAAACGGA	
--	---	--

	AGGTGTGATAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTAC CATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCA TCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAA AAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCA ATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondient e a la SEQ ID NO: 45 y UTR 3' de ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGT GTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCTATGGATAAGAAGTACTCGA TCGGGCTGGATATCGGAATAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATC ACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGG GAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGCC CTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAA ACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCT GCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTGGAC GACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGA GGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTGG ACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTG CGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATT GATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCGCGGACACTT CCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATA AGCTGTTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTTCGAA GAAAACCCAATCAATGCCAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCT GTCCGCCCCGGCTGTGCAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCG CACAGCTGCCGGGAGAGAAGAAGAACGGACTTTTCGGCAACTT GATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTT TGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCT ACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAATTGGCGATCAG TACGCGGATCTGTTCCCTGCCGCTAAGAACCTTTTCGGACGCAATC TTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGC GCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACC AGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCT	47

	GAAAAGTACAAGGAGATTTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTA CGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTAT AAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAG AACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGCAAACAG AGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACACCAGATCCATCTGGG TGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCAT TCCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTT CGCATCCCGTATTACGTGGGCCCCTGCGCGCGGCAATTCGCG CTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTT GGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAATCC TTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGA GAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGT CTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGA GGAAGCCGGCCTTTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAAGCGATTGT CGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGC TTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTG GAAATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAA CCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTT GACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGA CCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTT AAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAAC CAAGCGCCGCGGTACACTGGTTGGGGCCGCTCTCCCGCAAGC TGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTATCCTG GATTCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAG TTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAGAA AGCACAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATC GCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATCCTGCA AACTGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGG CACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACC AGACTACCCAGAAGGGCCAGAAGAAGTCCCGCGAAAGGATGAA GCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTG	
--	---	--

	AAAGAGCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGC TCTACCTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGAC CAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCA CATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCCATCGATAACA AGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAA TGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGG CGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGA CAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATA AGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATT ACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAACACTAA ATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATT ACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTGCGGACTTTTCGGAAGGACTTTCA GTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATG ACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGCACCGCCCTGATCAAGAAG TACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGT CTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATC GGGAAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAA CTTCTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGA AGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGT GTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGCTCT CTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACC GGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGA CAAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTAC GGAGGATTCGATTGCGCGACTGTGCGCATACTCCGTCCTCGTGGT GGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCCGTC AAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTTCA GAAGAACCCGATTGATTTCTGAGGCGAAGGGTTACAAGGAG GTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACCTGCCAAGTACTCACTGTT CGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGA GAACTCCAGAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCTAGCAAGTACGT CAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAGAAACTCAAAGGGTC	
--	---	--

	ACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCAC AAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTC AAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGT CGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGC CGAGAACATTATCCACTTGTTCCACCCTGACTAACCTGGGAGCTC CAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGACCGCAAAAGA TACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCA AAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTGCGCAGC TGGGTGGCGATGGTGGCGGTGGATCCTACCCATACGACGTGCCT GACTACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCCCAAGAAGAAACGGAAGG TGTGATAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCAT GAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTC TTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAAC ATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTA ATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Transcrito de Cas9 que comprende ORF de Cas9 mediante el uso de codones con una expresión generalmente alta en seres humanos	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGT GTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATGCCTAAGAAAAAGCGGA AGGTTCGACGGGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGG AACTAATTCCGTGGGTGGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAG TGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACAC AGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGG CGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGA CGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGAT CTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAGCTTCTTCCACC GCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGA ACGGCATCCTATCTTTGGAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACC ACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTT GACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCT CGCCCATATGATCAAATTCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCG ATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAAC	48

TGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCTGAAGAAAACCCAATCAAT GCTAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTC GAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGA GAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACT GGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGG ACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTG GACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTT CCTTGCCGCTAAGAACCTTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATAT CCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCT CGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTG CTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGG AGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATC GATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCC AATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTCAAG CTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACA ACGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCC ATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAA CCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATT ACGTGGGCCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATG ACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTTTCGAGGA AGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAA TGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCT AAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGA ACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCC TTTCTGTCCGGAGAACAGAAGAAAGCAATTGTGATCTGCTGTT CAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGAC TACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAATCAGCGG GGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATC TCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAG AACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTT CGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCT	
---	--

	CATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCCG GTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTA TTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCCTCAAA TCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGAC GACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGCACAAGTGTC CGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCG GTTCCGCCGGCGATTAAAGAAGGGAATTCTGCAAACCTGTGAAGGTG GTCGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAACCCGGAGA ATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAA GGGCCAGAAAAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAA GGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGG TGGA AAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTAT TTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACA TCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGT CCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGC AGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGG AGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAAT GCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGC CGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTTCATCA AACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGC GCAGATCTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACG ATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAA ACTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGA GAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAAC GCTGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGA ATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGA AGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGC GAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACTGA AATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATC GAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCA GGGACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTC	
--	---	--

	AATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAA GGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCAC GCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGATTC GCCGACTGTCGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGA AGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGG GATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGATTG ATTTCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCT GATCATCAAACCTCCCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATG GTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGG AAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCT TGCTTCGCACTACGAAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACG AACAGAAGCAGCTTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGAT GAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCT CGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTTCGGCCTACAATAAGC ATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCA CTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGT ACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAG GAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACT CTACGAAACTAGGATCGATCTGTTCGCAGCTGGGTGGCGATTGAT AGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAA TAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTT CTTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAA ATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAA AAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Transcripto de Cas9 que comprende una secuencia de Kozak con ORF de Cas9	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGT GTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGCCTAAGAAAA AGCGGAAGGTCGACGGGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGA TATCGGAATAATTCCGTGGGTGGGCAGTGATCACGGATGAAT ACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGAT AGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGA	49

mediante el uso de codones con una expresión generalmente alta en seres humanos	CTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCG AGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCA AGAGATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCT TCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAG CATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAGTGGC GTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGT TGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTG GCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTTCCTGATCGA AGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCA TTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTTGAAGAAAACCCA ATCAATGCTAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCCG GCTGTGGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGC CGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTC TCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCC GAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACG ACTTGGAACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGAT CTGTTCCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCC GATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAG CGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCA CGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTAC AAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTA CATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCA AGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAAGTCTGGT CAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTT GACAACGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCA CGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGG ACAACCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCC TATTACGTGGGCCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTG GATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGAATTTTCG AGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAA CGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCT	
--	--	--

TCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGA ACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCG GCCTTTCTGTCCGGAGAACAGAAGAAAGCAATTGTGATCTGCT GTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAG GACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAATCAG CGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATG ATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAG GAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCT TTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACG CTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGC CGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGG TATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAACTATCCTGGATTTCCTCA AATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCAC GACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGCACAAG TGTCGGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTG GCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACCTGTGAA GGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAACCG GAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACTACCC AGAAGGGCCAGAAAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGA AGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCAC CCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGT ACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTG GACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCC ACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTTGA CTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATC GGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTC CTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCAC TAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGA TTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCA CGTGGCGCAGATCTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACG AGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAA	
---	--

AAGCAAACCTTGTGTCGGACTTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACA AAGTGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCATA CCTCAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTA AACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGAC GTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAG CAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCA AGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCC ACTGATCGAACTAACGGAGAAACGGGGCGAAATCGTGTGGGAC AAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCC GCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGGCGGA TTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCT CATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA TTCGATTGCGCGACTGTCGCATACTCCGTCTCTCGTGGTGGCCAAG GTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGC TGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTTCGAGAAGAAC CCGATTGATTTCTCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAA GGATCTGATCATCAAACCTCCCCAAGTACTCACTGTTCTGAACTGG AAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAA AAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCT CTATCTTGCTTCGCACTACGAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAG ATAACGAACAGAAGCAGCTTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTAT CTGGATGAAATCATCGAACAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGT GATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTTCGGCCTACA ATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACAT TATCCACTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTT CAAGTACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCA CCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACT GGACTCTACGAACTAGGATCGATCTGTTCGCAGCTGGGTGGCGA TTGATAGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATG AGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCT TTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAACA	
---	--

	TAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAA TAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
ORF de Cas9 con uniones de empalme retiradas; contenido en U del 12,75%	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACA GCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAG CAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATC AAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAA CAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAT ACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTT CAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACcggCT GGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGA CACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGA AAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGAC AGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC ACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACC TGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTG GTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGC AAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGC AAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAG AAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCT GGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAA GACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACC TGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTG TTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGA CATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGC GCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGA CACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTA CAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGA TACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCAT CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTG GTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACAT	50

TCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTG CACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAA GGACAACAGAGAAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATC CCGTACTACGTCTGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGC ATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAAC TTCGAAGAAGTCGTCTGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCA TCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAA GGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCT ACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAGGAATGAG AAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCT GAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCG AAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAAC ATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGAC ACTGACACTGTTCTGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTG AAGACATACGCACACCTGTTCTGACGACAAGGTCATGAAGCAGCT GAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAA GCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATC CTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGAAACAGAACTTCAT GCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCC AGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACA CATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATC CTGCAGACAGTCAAGGTCGTCTGACGAACTGGTCAAGGTCATGGG AAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAA AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGA ATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGA TCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGA AAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAaAACGGAAGAGACATGTACG TCGACCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTC GACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGA	
--	--

	CAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC GACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAAGT ACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAA GTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAA CTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAA GACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTC AAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAA AGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCAC CACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTGGAACAGCACT GATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGA GACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAG CAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACG GAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAAC AGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTC AGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGA CAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCC GAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGG GACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCAT ACAGCGTCCTGGTCGTGCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAA GAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATG GAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAG CAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCT GCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGA ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGG CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCAC TACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC AGCTGTTTCGTGCAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATC GAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGA	
--	--	--

	CAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCA CACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGAC ACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCC TGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAA ACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAA GCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondient e a la SEQ ID NO: 50, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGT GTCGTTGCAGGCCTTATTTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGT ACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGC AGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAG GTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGA TCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAA GAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGG CAAAGGTTCGACGACAGCTTCTTCCACcggCTGGAAGAAAGCTTCC TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGG AAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACA ATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGACAGCACAGACAAGG CAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAG TTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAA CAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACA ACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGA CGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGA CTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACG GACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCG AACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGC AGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCAA AGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTC AACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA	51

AGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGC ACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAAATCTTCT TCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGG AGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGG AAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAG AGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGC ATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAG AAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAA AAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGG ACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGA AAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCG TCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAG CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGAC AAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTC CTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCA AGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTA CTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAG TCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTG CTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAA ACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTC GAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCAC ACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAG ATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGA AGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCAC GACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGG TCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCT GGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTC AAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGC CGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAAC	
---	--

ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAAT CGAAGAAGGAATCAAGGAAGCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAA CACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACC TGTACTACCTGCAaAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAA CTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGT CCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCC TGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCC GAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAG CTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCT GACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGC AGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACA AAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGT ACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCAC ACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT TCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGAC GCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTA CCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCT ACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGG AAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACT TCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAA GAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTC TGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGA GCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGAC AGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGC GACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGT ACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTC GTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCG TCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTC GAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGG AAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTG TTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAG	
---	--

	GAGAACTGCAGAAGGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTA CGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGG GAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTGCAACA GCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA TTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGT CCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAA CAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACTGACAAACCTGGG AGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAA AGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGAT CCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTG AGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAG AGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTA CCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTC ATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAA AAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTC AATTAATAAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF correspondient e a la SEQ ID NO: 52, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGT GTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGT ACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCC GTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGG TGCTGGGCAACACCGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGAT CGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCA GACTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGAA CAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCA AGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGAGCTTCCTG GTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTTCGGCA ACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATC TACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCG ACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTC AGAGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAG	53

	CGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACC AGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCC AAGGCCATCCTGAGCGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGG AGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCT GTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACT TCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTG AGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCC AGATCGGGCACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAAC CTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACAC CGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGAGAT ACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTG AGACAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCA GAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGGCGCCAGC CAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGAT GGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGAC CTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCA CCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGACAGG AGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACAGAGAGAAGATCGAG AAGATCCTGACCTTCAGAATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGC CAGAGGCAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAG GAGACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGG GCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTCGAC AAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCT GTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGT ACGTGACCGAGGGCATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCCGA GCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGA AAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGA TCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAG ATTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCA TCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACAT CCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACAGAG	
--	---	--

AGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCCACCTGTTTCGAC GACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACCGGCT GGGGCAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGCATCAGAGACAA GCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCT TCGCCAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTG ACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGG GCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCC GCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACG AGCTGGTGAAGGTGATGGGCAGACACAAGCCCGAGAACATCGT GATCGAGATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAG AAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATC AAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGA ACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG AACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACA GACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTC CTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCG ACAAGAACAGAGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGT GGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCC AAGCTGATCACCCAGAGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCG AGAGAGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAA GAGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCC CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAGAACG ACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAA GCTGGTGAAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGA GAGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAAC GCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGA GAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAGA AAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCG CCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCG AGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGC	
---	--

	AGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGT GAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGC AAGGAGAGCATCCTGCCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCG CCAGAAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGA CAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGG AGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCT GGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGCTTCGAGAAGAACCCC ATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAG AACGGCAGAAAGAGAATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGA AGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTG TACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGG ACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTA CCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGAGA GTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTA CAACAAGCACAGAGACAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAAC ATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGC CTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCA GCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATC ACCGGCCTGTACGAGACCAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGCG GCGACGGCGGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGTGACT AGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGA GAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTT CGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCT TTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAAT GGAAAGAACCTCGAG	
Transcripto de Cas9 con UTR 5' de HSD, ORF	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGT GTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAAAAAT ACAGCATAGGGCTAGACATAGGGACGAACAGCGTAGGGTGGGC GGTAATAACGGACGAATACAAAGTACCGAGCAAAAAATTCAAA	55

correspondiente a la SEQ ID NO: 54, secuencia de Kozak y UTR 3' de ALB	GTACTAGGGAACACGGACCGACACAGCATAAAAAAAAAACCTAA TAGGGGCGCTACTATTTCGACAGCGGGGAAACGGCGGAAGCGAC GCGACTAAAACGAACGGCGCGACGACGATACACGCGACGAAAA AACCGAATATGCTACCTACAAGAAATATTCAGCAACGAAATGGC GAAAGTAGACGACAGCTTCTTCCACCGACTAGAAGAAAGCTTCC TAGTAGAAGAAGACAAAAAACACGAACGACACCCGATATTCGG GAACATAGTAGACGAAGTAGCGTACCACGAAAAATACCCGACG ATATACCACCTACGAAAAAACTAGTAGACAGCACGGACAAAG CGGACCTACGACTAATATACCTAGCGCTAGCGCACATGATAAAA TTCCGAGGGCACTTCCTAATAGAAGGGGACCTAAACCCGGACAA CAGCGACGTAGACAAACTATTCATACAACTAGTACAAACGTACA ACCAACTATTCGAAGAAAACCCGATAAACGCGAGCGGGGTAGA CGCGAAAGCGATACTAAGCGCGCGACTAAGCAAAAGCCGACGA CTAGAAAACCTAATAGCGCAACTACCGGGGGAAAAAAAAAACG GGCTATTCGGGAACCTAATAGCGCTAAGCCTAGGGCTAACGCCG AACTTCAAAAGCAACTTCGACCTAGCGGAAGACGCGAAACTAC AACTAAGCAAAGACACGTACGACGACGACCTAGACAACCTACT AGCGCAAATAGGGGACCAATACGCGGACCTATTCCTAGCGGCG AAAAACCTAAGCGACGCGATACTACTAAGCGACATACTACGAGT AAACACGGAAATAACGAAAGCGCCGCTAAGCGCGAGCATGATA AAACGATACGACGAACACCACCAAGACCTAACGCTACTAAAAG CGCTAGTACGACAACAACCTACCGGAAAAATACAAAGAAATATT CTTCGACCAAAGCAAAAACGGGTACGCGGGGTACATAGACGGG GGGGCGAGCCAAGAAGAATTCTACAAATTCATAAAACCGATACT AGAAAAAATGGACGGGACGGAAGAACTACTAGTAAACTAAAC CGAGAAGACCTACTACGAAAACAACGAACGTTTCGACAACGGGA GCATACCGCACCAAATACACCTAGGGGAACTACACGCGATACTA CGACGACAAGAAGACTTCTACCCGTTCTAAAAGACAACCGAGA AAAAATAGAAAAAATACTAACGTTCCGAATACCGTACTACGTAG GGCCGCTAGCGCGAGGGAACAGCCGATTCGCGTGGATGACGCG AAAAAGCGAAGAAACGATAACGCCGTGGAACCTTCGAAGAAGTA	
---	--	--

GTAGACAAAGGGGCGAGCGCGCAAAGCTTCATAGAACGAATGA CGAACTTCGACAAAAACCTACCGAACGAAAAAGTACTACCGAA ACACAGCCTACTATACGAATACTTCACGGTATACAACGAATAA CGAAAGTAAAATACGTAACGGAAGGGATGCGAAAACCGGCGTT CCTAAGCGGGGAACAAAAAAAAGCGATAGTAGACCTACTATTC AAAACGAACCGAAAAGTAACGGTAAAACAATAAAAGAAGACT ACTTCAAAAAAATAGAATGCTTCGACAGCGTAGAAATAAGCGG GGTAGAAGACCGATTCAACGCGAGCCTAGGGACGTACCACGAC CTACTAAAAATAATAAAAGACAAAGACTTCCTAGACAACGAAG AAAACGAAGACATACTAGAAGACATAGTACTAACGCTAACGCT ATTCTGAAGACCGAGAAATGATAGAAGAACGACTAAAAACGTAC GCGCACCTATTCGACGACAAAGTAATGAAACAATAAAACGAC GACGATACACGGGGTGGGGGCGACTAAGCCGAAAATAATAAA CGGGATACGAGACAAACAAAGCGGGAAAACGATACTAGACTTC CTAAAAAGCGACGGGTTCGCGAACCGAACTTCATGCAACTAAT ACACGACGACAGCCTAACGTTCAAAGAAGACATACAAAAAGCG CAAGTAAGCGGGCAAGGGGACAGCCTACACGAACACATAGCGA ACCTAGCGGGGAGCCCGGCGATAAAAAAAGGGATACTACAAAC GGTAAAAGTAGTAGACGAACTAGTAAAAGTAATGGGGCGACAC AAACCGGAAAACATAGTAATAGAAATGGCGCGAGAAAACCAAA CGACGCAAAAAGGGCAAAAAAACAGCCGAGAACGAATGAAAC GAATAGAAGAAGGGATAAAAGAACTAGGGAGCCAAATACTAAA AGAACACCCGGTAGAAAACACGCAACTACAAAACGAAAAACTA TACCTATACTACCTACAAAACGGGCGAGACATGTACGTAGACCA AGAACTAGACATAAACCGACTAAGCGACTACGACGTAGACCAC ATAGTACCGCAAAGCTTCCTAAAAGACGACAGCATAGACAACA AAGTACTAACGCGAAGCGACAAAAACCGAGGGGAAAAGCGACAA CGTACCGAGCGAAGAAGTAGTAAAAAAAATGAAAACTACTGG CGACAACTACTAAACGCGAACTAATAACGCAACGAAAATTCG ACAACCTAACGAAAGCGGAACGAGGGGGGCTAAGCGAACTAGA CAAAGCGGGGTTTCATAAAACGACAATACTAGTAGAAACGCGACAA	
--	--

ATAACGAAACACGTAGCGCAAATACTAGACAGCCGAATGAACA CGAAATACGACGAAAACGACAACTAATACGAGAAGTAAAAGT AATAACGCTAAAAAGCAAAGTAGTAAGCGACTTCCGAAAAGAC TTCCAATTCTACAAAGTACGAGAAATAAACAACTACCACCACGC GCACGACGCGTACCTAAACGCGGTAGTAGGGACGGCGCTAATA AAAAAATACCCGAACTAGAAAGCGAATTCGTATACGGGGACT ACAAAGTATACGACGTACGAAAAATGATAGCGAAAAGCGAACA AGAAATAGGGAAAGCGACGGCGAAATACTTCTTCTACAGCAAC ATAATGAACTTCTTCAAAACGGAAATAACGCTAGCGAACGGGG AAATACGAAAACGACCGCTAATAGAAACGAACGGGGAAACGGG GGAAATAGTATGGGACAAAGGGCGAGACTTCGCGACGGTACGA AAAGTACTAAGCATGCCGCAAGTAAACATAGTAAAAAAAACGG AAGTACAAACGGGGGGGTTCAGCAAAGAAAGCATACTACCGAA ACGAAACAGCGACAACTAATAGCGCGAAAAAAAGACTGGGAC CCGAAAAAATACGGGGGGGTTCGACAGCCCGACGGTAGCGTACA GCGTACTAGTAGTAGCGAAAGTAGAAAAAGGGAAAAGCAAAAA ACTAAAAAGCGTAAAAGAACTACTAGGGATAACGATAATGGAA CGAAGCAGCTTCGAAAAAAACCCGATAGACTTCCTAGAAGCGA AAGGGTACAAAGAAGTAAAAAAAGACCTAATAATAAACTACC GAAATACAGCCTATTCGAACTAGAAAACGGGCGAAAACGAATG CTAGCGAGCGCGGGGGAACTACAAAAAGGGAACGAACTAGCGC TACCGAGCAAATACGTAACTTCCTATACCTAGCGAGCCACTAC GAAAAACTAAAAGGGAGCCCGGAAGACAACGAACAAAAACAA CTATTCGTAGAACAACACAAACACTACCTAGACGAAATAATAGA ACAAATAAGCGAATTCAGCAAACGAGTAATACTAGCGGACGCG AACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGTACAACAAACACCGAGACA AACCGATACGAGAACAAGCGGAAAACATAATACACCTATTAC GCTAACGAACCTAGGGGCGCCGGCGGCGTTCAAATACTTCGACA CGACGATAGACCGAAAACGATACACGAGCACGAAAGAAGTACT AGACGCGACGCTAATACACCAAAGCATAACGGGGGCTATACGAA ACGCGAATAGACCTAAGCCAAGTAGGGGGGGACGGGGGGGGGA	
---	--

	GCCCGAAAAAAAAAACGAAAAGTATGACTAGCCATCACATTTAA AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAG ATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAGCC AACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTC TTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Secuencia 100 de poli-A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAA	63
ARN guía G209	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U	64
ORF que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis	ATGGCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATCAACTACATCCTGGGACT GGACATCGGAATCGCATCGGTCTGGATGGGCAATGGTCGAAATCG ACGAAGAAGAAAACCCGATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAG AGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTCCCGAAGACAGGAGACTCGCTG GCAATGGCAAGAAGACTGGCAAGATCGGTCTAGAAGACTGACAA GAAGAAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTGAA GAGAGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACCTTCGACGAAAACGGA CTGATCAAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGCAGCTGAGAGCAGC AGCACTGGACAGAAAGCTGACACCGCTGGAATGGTCGGCAGTC CTGCTGCACCTGATCAAGCACAGAGGATACCTGTCGCAGAGAAA GAACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGAACTGGGAGCACTGCTG AAGGGAGTCGCAGGAAACGCACACGCACTGCAGACAGGAGACT TCAGAACACCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTGAAAAGGA ATCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTCGCACACAT TCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTTCGAA AAGCAGAAGGAATTCGGAAACCCGCACGTCTCGGGAGGACTGA AGGAAGGAATCGAAACACTGCTGATGACACAGAGACCGGCACT GTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGCTGGGACACTGCACATTCG AACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAACACATACACAGCAGA	65

AAGATTCATCTGGCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGG AACAGGGATCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAAC ACTGATGGACGAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTGACATACGCA CAGGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGACACAGCATTCTTCA AGGGACTGAGATACGGAAAGGACAACGCAGAAGCATCGACACT GATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCTCGAGAGCACTGGAA AAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAGTCGCCGCTGAACCTGTTCG CGGAACTGCAGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAG ACAGACGAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGC CGGAAATCCTGGAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAG TTCGTCCAGATCTCGCTGAAGGCACTGAGAAGAATCGTCCCGCT GATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAAGCATGCGCAGAAATC TACGGAGACCACTACGGAAAGAAGAACACAGAAGAAAAGATCT ACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTCGTC CTGAGAGCACTGTTCGCAGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCG TCAGAAGATACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGC AAGAGAAGTCGGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAA AAGAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGAAAAGGCAGCA GCAAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGTTCGGAGAACCGAA GTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAACAGCAGCAC GGAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAAATCAACCTGGGAAGAC TGAACGAAAAGGGATACGTCGAAATCGACCACGCACTGCCGTTT TCGAGAACATGGGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCCT GGGATCGGAAAACCAGAACAAAGGGAAACCAGACACCGTACGAA TACTTCAACGGAAAGGACAACCTCGAGAGAATGGCAGGAATTCA AGGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAAGCA GAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGATTCAAGGAA AGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGATTCTGTGCCA GTTTCGTTCGACAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAAG AGAGTCTTCGCATCGAACGGACAGATCACAAACCTGCTGAGAGG ATTCTGGGGACTGAGAAAGGTCAGAGCAGAAAACGACAGACAC	
---	--

	CACGCACTGGACGCAGTCGTCGTCGCATGCTCGACAGTCGCAAT GCAGCAGAAGATCACAAGATTCGTCAGATACAAGGAAATGAAC GCATTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAGAAGTCC TGCACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATTCTTCGCA CAGGAAGTCATGATCAGAGTCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGC CGGAATTCGAAGAAGCAGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACT GCTGGCAGAAAAGCTGTCTGTCGAGACCGGAAGCAGTCCACGAA TACGTCACACCGCTGTTCGTCTCGAGAGCACCGAACAGAAAGAT GTCGGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCAAAGAGA CTGGACGAAGGAGTCTCGGTCTGAGAGTCCCGCTGACACAGCT GAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAGAAAGAGAA CCGAAGCTGTACGAAGCACTGAAGGCAAGACTGGAAGCACACA AGGACGACCCGGCAAAGGCATTCGCAGAACCGTTCTACAAGTAC GACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAGAG TCGAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTCAGAAACCACAA CGGAATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTCTTCG AAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATCTACTCGTGGCAG GTCGCAAAGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCGTCCAGGGAA AGGACGAAGAAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTTC AAGTTCTCGCTGCACCCGAACGACCTGGTTCGAAGTCATCACAAA GAAGGCAAGAATGTTCCGATACTTCGCATCGTGCCACAGAGGAA CAGGAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGACCACAAGAT CGGAAAGAACGGAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGCA CTGTCTGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACTGGGAAAGGAAAT CAGACCGTGCAGACTGAAGAAGAGACCGCCGGTCAGATCCGGA AAGAGAACAGCAGACGGATCGGAATTCGAATCGCCGAAGAAGA AGAGAAAGGTCTGAATGA	
ORF que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis	GCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATCAACTACATCCTGGGACTGGA CATCGGAATCGCATCGGTCTGGATGGGCAATGGTCGAAATCGACG AAGAAGAAAACCCGATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGT CTTCGAAAGAGCAGAAGTCCCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCA	66

(sin codones de inicio o terminación; adecuado para su inclusión en la secuencia codificante de proteínas de fusión)	ATGGCAAGAAGACTGGCAAGATCGGTCAGAAGACTGACAAGAA GAAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTGAAGAG AGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACCTTCGACGAAAACGGACTG ATCAAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGCAGCTGAGAGCAGCAG CACTGGACAGAAAGCTGACACCGCTGGAATGGTCGGCAGTCCTG CTGCACCTGATCAAGCACAGAGGATACCTGTTCGCAGAGAAAGA ACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGAAGTGGGAGCACTGCTGAA GGGAGTCGCAGGAAACGCACACGCACTGCAGACAGGAGACTTC AGAACACCGGCAGAAGTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAGGAAT CGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTCGCACACATTC TCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAAGTATCCTGCTGTTTCGAAAA GCAGAAGGAATTCGGAAACCCGCACGTCTCGGGAGGACTGAAG GAAGGAATCGAAACACTGCTGATGACACAGAGACCGGCACTGT CGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGCTGGGACACTGCACATTCGA ACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAACACATACACAGCAGAA AGATTCATCTGGCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGA ACAGGGATCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACA CTGATGGACGAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTGACATACGCAC AGGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGACACAGCATTCTTCAA GGGACTGAGATACGGAAAGGACAACGCAGAAGCATCGACACTG ATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCTCGAGAGCACTGGAAA AGGAAGGACTGAAGGACAAGAAGTCGCCGCTGAACCTGTCGCC GGAAGTGCAGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGA CAGACGAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCC GGAAATCCTGGAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGT TCGTCCAGATCTCGCTGAAGGCACTGAGAAGAATCGTCCCGCTG ATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAAGCATGCGCAGAAATCT ACGGAGACCACTACGGAAAGAAGAACACAGAAGAAAAGATCTA CCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTCGTCC TGAGAGCACTGTTCGCAGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGT CAGAAGATACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCA	
--	--	--

AGAGAAGTCGGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAA AGAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGAAAAGGCAGCAG CAAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGTTCGGAGAACCGAAG TCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAACAGCAGCACG GAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACT GAACGAAAAGGGATACGTTCGAAATCGACCACGCACTGCCGTTCT CGAGAACATGGGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCCTG GGATCGGAAAACCAGAACAGGGAAACCAGACACCGTACGAAT ACTTCAACGGAAAGGACAACCTCGAGAGAATGGCAGGAATTCAA GGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAAGCAG AGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGATTCAAGGAAA GAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGATTCTGTGCCAG TTCGTTCGACAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAAGA GAGTCTTCGCATCGAACGGACAGATCACAAACCTGCTGAGAGGA TTCTGGGGACTGAGAAAGGTCAGAGCAGAAAACGACAGACACC ACGCACTGGACGCAGTCGTTCGTTCGATGCTCGACAGTCGCAATG CAGCAGAAGATCACAAAGATTCTGTCAGATACAAGGAAATGAACG CATTTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAGAAGTCCT GCACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATTCTTCGCAC AGGAAGTCATGATCAGAGTCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCC GGAATTCGAAGAAGCAGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTG CTGGCAGAAAAGCTGTCGTTCGAGACCGGAAGCAGTCCACGAAT ACGTCACACCGCTGTTCGTCTCGAGAGCACCGAACAGAAAGATG TCGGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCAAAGAGAC TGGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCCGCTGACACAGCTG AAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAGAAAGAGAAC CGAAGCTGTACGAAGCACTGAAGGCAAGACTGGAAGCACACAA GGACGACCCGGCAAAGGCATTTCGCAGAACCGTTCTACAAGTACG ACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAGAGT CGAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTCAGAAACCACAAC GGAATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTCTTCG	
---	--

	AAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATCTACTCGTGGCAG GTCGCAAAGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCGTCCAGGGAA AGGACGAAGAAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTTC AAGTTCTCGCTGCACCCGAACGACCTGGTCTGAAGTCATCACAAA GAAGGCAAGAATGTTCCGATACTTCGCATCGTGCCACAGAGGAA CAGGAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGACCACAAGAT CGGAAAGAACGGAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGCA CTGTCGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACTGGGAAAGGAAAT CAGACCGTGCAGACTGAAGAAGAGACCGCCGGTCAGATCCGGA AAGAGAACAGCAGACGGATCGGAATTCGAATCGCCGAAGAAGA AGAGAAAGGTCGAA	
Transcripto que comprende la SEQ ID NO: 65 (que codifica Cas9 de Neisseria meningitidis)	GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGATCCG CCACCATGGCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATCAACTACATCCTG GGACTGGACATCGGAATCGCATCGGTTCGGATGGGCAATGGTCGA AATCGACGAAGAAGAAAACCCGATCAGACTGATCGACCTGGGA GTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTCCCGAAGACAGGAGACT CGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCAAGATCGGTCAGAAGACT GACAAGAAGAAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTG CTGAAGAGAGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACCTTCGACGAAA ACGGACTGATCAAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGCAGCTGAGA GCAGCAGCACTGGACAGAAAGCTGACACCGCTGGAATGGTCGG CAGTCCTGCTGCACCTGATCAAGCACAGAGGATACCTGTCGCAG AGAAAGAACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGAACTGGGAGCA CTGCTGAAGGGAGTCGCAGGAAACGCACACGCACTGCAGACAG GAGACTTCAGAACACCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTCGA AAAGGAATCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTCG CACACATTCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCT GTTGAAAAGCAGAAGGAATTCGGAACCCGCACGTCTCGGGA GGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTGATGACACAGAGAC CGGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGCTGGGACACTG CACATTCTGAACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAACACATAC	67

ACAGCAGAAAGATTCATCTGGCTGACAAAGCTGAACAACCTGA GAATCCTGGAACAGGGATCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGA AAGAGCAAACTGATGGACGAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTG ACATACGCACAGGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGACACAG CATTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAACGCAGAAGC ATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCTCGAGA GCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAGTCGCCGCTGA ACCTGTGCGCCGGAAGTGCAGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCG CTGTTCAAGACAGACGAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACA GAATCCAGCCGGAAATCCTGGAAGCACTGCTGAAGCACATCTCG TTCGACAAGTTCGTCCAGATCTCGCTGAAGGCACTGAGAAGAAT CGTCCCGCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAAGCATGC GCAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAGAACACAGAAG AAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAA CCCGGTCGTCCTGAGAGCACTGTCTGCAGGCAAGAAAGGTCATCA ACGGAGTCGTCAGAAGATACGGATCGCCGGCAAGAATCCACAT CGAAACAGCAAGAGAAGTCGGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAG GAAATCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGAA AAGGCAGCAGCAAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGTCTCG AGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAA CAGCAGCACGGAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAAATCAACC TGGGAAGACTGAACGAAAAGGGATACGTGCAAATCGACCACGC ACTGCCGTTCTCGAGAACATGGGACGACTCGTTCAACAACAAGG TCCTGGTCCTGGGATCGGAAAACCAGAACAAAGGGAAACCAGAC ACCGTACGAATACTTCAACGGAAAGGACAACCTCGAGAGAATGG CAGGAATTCAAGGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGAT CGAAGAAGCAGAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGG ATTCAAGGAAAGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGA TTCCTGTGCCAGTTCGTCTGCAGACAGAATGAGACTGACAGGAAA GGGAAAGAAGAGAGTCTTCGCATCGAACGGACAGATCACAAAC CTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGGTCAGAGCAGAAA	
--	--

ACGACAGACACCACGCACTGGACGCACTCGTCGTCGCATGCTCG ACAGTCGCAATGCAGCAGAAGATCACAAGATTCGTCAGATACA AGGAAATGAACGCATTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAAC AGGAGAAGTCCTGCACCAGAAGACACACTTCCCCGAGCCGTGG GAATTCTTCGCACAGGAAGTCATGATCAGAGTCTTCGGAAAGCC GGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAAGCAGACACACTGGAAAAG CTGAGAACTGCTGGCAGAAAAGCTGTCGTCGAGACCGGAAG CAGTCCACGAATACGTCACACCGCTGTTCTGTCGAGAGCACCG AACAGAAAGATGTCGGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGT CGGCAAAGAGACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCC GCTGACACAGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAAC AGAGAAAGAGAACCGAAGCTGTACGAAGCACTGAAGGCAAGAC TGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCATTTCGCAGAACC GTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCAGGTC AAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGG TCAGAAACCACAACGGAATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAG AGTAGACGTCTTCGAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGA TCTACTCGTGGCAGGTTCGCAAAGGGAATCCTGCCGGACAGAGCA GTCGTCCAGGGAAAGGACGAAGAAGACTGGCAGCTGATCGACG ACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGCACCCGAACGACCTGGTCCG AAGTCATCACAAAGAAGGCAAGAATGTTCCGATACTTCGCATCG TGCCACAGAGGAACAGGAAACATCAACATCAGAATCCACGACC TGGACCACAAGATCGGAAAGAACGGAATCCTGGAAGGAATCGG AGTCAAGACAGCACTGTCTGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAAC TGGGAAAGGAAATCAGACCGTGCAGACTGAAGAAGAGACCGCC GGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCAGACGGATCGGAATTCGAA TCGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCGAATGATAGCTAGCTCGAG TCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCC TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCC TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAAT GAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG	
--	--

		GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA GACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG	
Secuencia de aminoácidos de Cas9 Neisseria meningitidis		MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRFER AEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRTRRLKREGVLQ AANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRG YLSQRKNEGETADKELGALLKGVAGNAHALQTGDFRTPAELALNK FEKESGHIRNQSRDYSHTFSRKDLQAEILLLFEKQKEFGNPHVSGGL KEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAER FIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSCLTYAQARK LLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKD KKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHIS FDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTTEEKI YLPPIPADEIRNPVVLRLALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVG KSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKL RLYEQQHKGKCLYSGKEINLGRLEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNN KVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRS KKQRILLQKFDEDDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKKGK KRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVA MQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQ EVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLEKLSSRPEAVHEYVTPLE FVSRAPNRKMSGQGHMETVKSARKLDEGVSVLRVPLTQLKLKDL KMNVREREPKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAPFYKYDKAGNRT QQVKAVRVEQVQKTGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKEY LVPIYSWQVAKGILPDRAVVQKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDL VEVITKKARMFYFASCHRG TGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVK TALS FQKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPVRS GKRTADGSEFESPKKKR KVE	68
ARN guía G390		mG*mC*mC*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	69

ARN guía G502	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	70
ARN guía G509	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGUCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	71
ARN guía G534	mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	72
ARNgs que comprende patrón de modificación	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	74
ARN guía G562	mC*mC*mA*AUAUCAGGAGACUAGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	75

* = enlace PS; m = nucleótido de 2'-O-Me; N = cualquier nucleótido natural o no natural

Secuencia de GFP:

5 TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCAC
 AGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTT
 GGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACC
 ATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATT
 CGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACG
 10 CCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCC
 CAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGTCCCG

CAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCC
 ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC
 GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC
 GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCACCC
 5 TCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCA
 GCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC
 AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTG
 AACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAG
 CTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGC
 10 ATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
 CACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACC
 TGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCT
 GGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATAGGAA
 TTATGCAGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGA
 15 AAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAGCCAACACCCT
 GTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAA
 AATGGAAAGAACCTCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AATCTAGACTTAAGCTTGATGAGCTCTAGCTTGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT
 20 GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
 GCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTT
 CCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGG
 CGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTT
 GGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG
 25 GGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAA
 AGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCG
 ACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT
 GGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTT
 TCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGT
 30 AGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGC
 CTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA

GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGA
 AGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAA
 GCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGT
 AGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAG
 5 ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGGATT
 TTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAAATGAAGTTT
 TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT
 GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGT
 GTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGA
 10 GACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAG
 CGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGC
 TAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCG
 TGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCCGA
 GTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGT
 15 CAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTA
 CTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA
 GAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGC
 CACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTC
 AAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCAACTGATCTT
 20 CAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGC
 AAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATAT
 TATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA
 AAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAA
 ACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTG