

SISTEMAS DE EDICIÓN GÉNICA PARA EDITAR UN GEN REGULADOR DE LA CONDUCTANCIA TRANSMEMBRANA DE LA FIBROSIS QUÍSTICA (CFTR)

SOLICITUD RELACIONADA

5

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad según el art. 119 (e), tít. 35 del U.S.C., de la fecha de presentación de la solicitud provisional de EE. UU. con n.º de serie 62/775,637, titulada «SISTEMAS DE EDICIÓN GÉNICA PARA EDITAR UN GEN REGULADOR DE LA CONDUCTANCIA TRANSMEMBRANA DE LA FIBROSIS QUÍSTICA (CFTR)», presentada el 5 de diciembre de 2018; cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

10

ANTECEDENTES

15

La fibrosis quística (CF, por sus siglas en inglés) es la enfermedad autosómica recesiva más común en la población de raza blanca. Provoca daños graves en los pulmones, páncreas, hígado, intestinos, senos paranasales y otros órganos del cuerpo. Diversas mutaciones conocidas dentro del gen regulador de la conductancia transmembrana de la CF (CFTR, por sus siglas en inglés) causan CF. Si bien los avances tecnológicos han aumentado la esperanza de vida de los pacientes con CF, todavía no existe una cura eficaz para la enfermedad. Por lo tanto, es de gran interés desarrollar nuevos tratamientos para la CF.

20

COMPENDIO

25

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el desarrollo de sistemas de edición génica eficientes para corregir mutaciones en un gen regulador de la conductancia transmembrana de la CF (CFTR). En algunas modalidades, el sistema de edición génica se basa en la identificación de posiciones de edición efectivas en el intrón 10 del gen CFTR (p. ej., las descritas en este documento) para la inserción efectiva de un ácido nucleico que codifica los exones 11 a 27 del gen CFTR, lo que daría como resultado la corrección del 99 % de los alelos que no reaccionan ante el CFTR más frecuentes.

30

Por ello, en algunos aspectos, la divulgación se relaciona con sistemas de edición génica para modificar un gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). Dicho sistema de edición génica puede comprender: (a) un primer polinucleótido, que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica los exones 11 a 27 del gen CFTR; (b) un segundo polinucleótido, que comprende una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de ADN guiada por ARN, o la endonucleasa de ADN guiada por ARN; y (c) un tercer polinucleótido, que comprende una tercera secuencia de nucleótidos que codifica

35

un ARN guía (gRNA, por sus siglas en inglés), en donde el gRNA dirige la escisión por parte de la endonucleasa de ADN guiada por ARN en un sitio diana, que es la posición 1220, 2068, 3821, 4262, 5041, 5052, 5278, 5343, 5538, o 6150 del intrón 10 en el gen CFTR. En algunas modalidades, el primer nucleótido del primer polinucleótido de (a) no tiene secuencias de intrones.

En algunas modalidades, el primer polinucleótido de (a) puede comprender además un brazo homólogo 5' arriba con respecto a la primera secuencia de nucleótidos y/o un brazo homólogo 3' abajo con respecto a la primera secuencia de nucleótidos. El brazo homólogo 5' puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es homóloga a una región arriba con respecto al sitio diana. De manera alternativa o adicional, el brazo homólogo 3' puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es homóloga a una región arriba con respecto al sitio diana. En algunas modalidades, el brazo homólogo 5' y el brazo homólogo 3' comprenden secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- (i) SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente;
- (ii) SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20, respectivamente;
- (iii) SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, respectivamente;
- (iv) SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, respectivamente;
- (v) SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 345, respectivamente;
- (vi) SEQ ID NO: 346 y SEQ ID NO: 347, respectivamente;
- (vii) SEQ ID NO: 348 y SEQ ID NO: 349, respectivamente;
- (viii) SEQ ID NO: 350 y SEQ ID NO: 351, respectivamente;
- (ix) SEQ ID NO: 352 y SEQ ID NO: 353, respectivamente; y
- (x) SEQ ID NO: 354 y SEQ ID NO: 355, respectivamente.

En algunas modalidades, la primera secuencia de nucleótidos en (a) puede comprender además un primer fragmento arriba con respecto a la primera secuencia de nucleótidos y abajo con respecto al brazo homólogo 5', y en donde el primer fragmento contiene un sitio de empalme aceptor. Por ejemplo, el primer fragmento puede comprender la secuencia de nucleótidos de TATACACTTCTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAAT GACCTAATAATGATGGGTTTTATTTCCAG (SEQ ID NO: 1), en donde el extremo 3' AG es el sitio aceptor de empalme.

En algunas modalidades, la segunda secuencia de nucleótidos que codifica la endonucleasa de ADN guiada por ARN en (b) puede comprender además una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés), que se fusiona, en marco, con la endonucleasa de ADN guiada por ARN. En algunas modalidades, la NLS es una NLS de SV40. En algunas modalidades, la endonucleasa de ADN guiada por ARN puede ser una endonucleasa Cas9, por ejemplo, una enzima Cas9 de *Staphylococcus aureus* (saCas9, por sus siglas en inglés).

En algunas modalidades, la tercera secuencia de nucleótidos en (c), que codifica el gRNA, puede comprender una de las siguientes secuencias de nucleótidos:

- (i) ACCCAGCCTGACACCAAATTTA (SEQ ID NO: 2);
- (ii) TACTAAAAGGCAGCCTCCTAGA (SEQ ID NO: 3);
- 5 (iii) ATTGGCTACCTTGGTTGGATGA (SEQ ID NO: 4);
- (iv) GACAGCTGGCTATCCAGGATTC (SEQ ID NO: 5);
- (v) ACTTGCAGGAGGTGAGGGATTA (SEQ ID NO: 6);
- (vi) ATTAGGGAATGCAGACTCTGGG (SEQ ID NO: 7);
- (vii) TGGGTGAGATTAGAGGCCACTG (SEQ ID NO: 8);
- 10 (viii) TGCTTCCTCCCTTGTCTCCCTA (SEQ ID NO: 9);
- (iv) TGGCATATGAGAAAAGTCACAG (SEQ ID NO: 10); y
- (x) CCTTATTCTTTTGATATACTCC (SEQ ID NO: 11).

Debe entenderse que debido a que la tercera secuencia de nucleótidos que codifica el gRNA pueden ser ya sea secuencias de ADN o secuencias de ARN, cualquiera de las timinas (T) en las secuencias puede reemplazarse con un uracilo (U). En algunas modalidades, la tercera secuencia de nucleótidos en (c) puede comprender además una secuencia de andamiaje, que en algunos ejemplos puede comprender la secuencia de nucleótidos de GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCG UCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 12).

20 En algunas modalidades, (a), (b) y (c) pueden ubicarse en el mismo vector. En otras modalidades, (a), (b) y/o (c) pueden ubicarse en vectores diferentes. Por ejemplo, (a) y (c) pueden ubicarse en un primer vector, y (b) pueden ubicarse en un segundo vector que es diferente del primer vector. De manera alternativa, (a) puede ubicarse en un primer vector, y (b) y (c) pueden ubicarse en un segundo vector que es diferente del primer vector. En algunas modalidades, el vector o los vectores son un vector o vectores virales, por ejemplo, un vector o vectores virales adenoasociados (AAV, por sus siglas en inglés).

30 También se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación las partículas virales o conjuntos de partículas virales, que comprenden colectivamente cualquiera de los sistemas de edición génica descritos en este documento. En algunas modalidades, la partícula viral o el conjunto de partículas virales son partículas de AAV.

35 En incluso otros aspectos, la divulgación se relaciona con métodos para editar un gen CFTR, donde el método comprende poner en contacto una célula con (i) cualquiera de los sistemas de edición génica descritos en este documento o (ii) una partícula viral o un conjunto de partículas virales, que comprenden colectivamente el sistema de edición génica. En algunas modalidades, la célula puede comprender una mutación en uno o más de los exones 11-27 del gen CFTR. Las mutaciones de ejemplo incluyen, a modo de ejemplo, F508del, I507del, G542X, S549N, G551D, R553X, D1152H, N1303K, W1282X, 2789+5G>A, o 3849+10kbC>T.

En algunas modalidades, la etapa de contacto se realiza mediante la administración del sistema de edición génica o la o las partículas virales a un sujeto que lo necesite. En algunos ejemplos, el sistema de edición génica o la o las partículas virales se administran en el aparato respiratorio del sujeto. En algunas modalidades, el sujeto es un paciente humano que tiene fibrosis quística. En algunos ejemplos, el paciente humano es un niño.

En algunas modalidades, la célula es una célula madre, por ejemplo, una célula iPSC o una célula madre bronquioalveolar.

En algunos ejemplos, cualquiera de los métodos descritos en este documento puede comprender además administrarle la célula con el gen CFTR editado a un sujeto que lo necesite. En algunos ejemplos, la célula con el gen CFTR editado se le administra al sujeto en el aparato respiratorio (p. ej., un paciente humano que tiene fibrosis quística). En algunos ejemplos, el paciente humano es un niño.

En otros aspectos, la presente divulgación se relaciona con ácidos nucleicos, que pueden ser vectores virales como vectores AAV. El ácido nucleico puede comprender: (a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica los exones 11 a 27 de un gen CFTR; (b) un brazo homólogo 5' arriba con respecto a la primera secuencia de nucleótidos, en donde el brazo homólogo 5' comprende una secuencia de ácido nucleico que es homóloga a una región arriba con respecto a una posición diana en el intrón 10 del gen CFTR; y (c) un brazo homólogo 3' abajo con respecto a la primera secuencia de nucleótidos, en donde el brazo homólogo 3' comprende una secuencia de ácido nucleico que es homóloga a una región abajo con respecto a una posición diana en el intrón 10 del gen CFTR; en donde la posición diana se selecciona del grupo que consiste en la posición 1220, 2068, 3821, 4262, 5041, 5052, 5278, 5343, 5538, o 6150 del intrón 10 en el gen CFTR. En algunas modalidades, la primera secuencia de nucleótidos de (a) no tiene secuencias de intrones.

En otras modalidades, el ácido nucleico puede comprender: (a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de ADN guiada por ARN, y (b) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un ARN guía (gRNA), en donde el gRNA dirige la escisión por parte de la endonucleasa de ADN guiada por ARN en una posición diana de un gen CFTR, en donde la posición diana se selecciona del grupo que consiste en la posición 1220, 2068, 3821, 4262, 5041, 5052, 5278, 5343, 5538, o 6150 del intrón 10 en el gen CFTR; en donde cada una de la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos se encuentra en ligamiento operable con un promotor.

En algunas modalidades, la primera secuencia de nucleótidos en (a) puede comprender además un primer fragmento ligado al extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica los exones 11 al 27 del gen CFTR, en donde el primer fragmento comprende un sitio de empalme aceptor (p. ej., los descritos en este documento).

En algunas modalidades, el ácido nucleico puede comprender además una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un ARN guía (gRNA), en donde el gRNA dirige la escisión

por parte de la endonucleasa de ADN guiada por ARN en cualquiera de las posiciones diana descritas en este documento. También se proporcionan gRNA de ejemplo en la presente divulgación. Ver la página 14 más adelante.

En otros aspectos, la presente divulgación se relaciona con células pulmonares o células precursoras, de estas editadas genéticamente. La célula pulmonar o la célula precursora, de esta editada genéticamente puede comprender un gen CFTR endógeno editado genéticamente, en el que se inserta un ácido nucleico exógeno en el intrón 10 del gen CFTR endógeno, en donde el ácido nucleico exógeno comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica los exones 11 a 27 de un gen CFTR. En algunas modalidades, la primera secuencia de nucleótidos no tiene secuencias de intrones. En algunas modalidades, el ácido nucleico exógeno comprende además una segunda secuencia de nucleótidos ligada al extremo 5' de la primera secuencia de nucleótidos, donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende un sitio de empalme aceptor. En algunas modalidades, la segunda secuencia de nucleótidos comprende la SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, la célula pulmonar o célula precursora de esta editada es una célula humana. En algunas modalidades, la célula precursora es una célula iPSC o una célula madre bronquioalveolar.

También se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación usos de cualquiera de los sistemas de edición génica descritos en este documento, componentes de estos o cualquiera de las células modificadas genéticamente descritas en este documento para el tratamiento de la CF, así como usos de estos para fabricar un medicamento para el tratamiento médico previsto.

Los detalles de una o más modalidades de la divulgación se establecen en la siguiente descripción. Otras características o ventajas de la presente divulgación resultarán evidentes a partir de la descripción detallada de varias modalidades y también a partir de las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es un esquema que describe estrategias de edición génica CFTR. La Fig. 1A describe una estrategia de edición génica basada en una introducción de AAV duales de CRISPR-Cas9 y superexones 11-27 del CFTR. El primer (1) vector AAV expresa saCAS9 y gRNA de molécula única (sgRNA) para inducir un corte de ADN bicatenario específico en el intrón 10 del gen CFTR, y el segundo (2) vector AAV actúa como un donador molde para la HDR. La Fig. 1B describe una estrategia de edición génica basada en una introducción de un solo AAV del donador molde para la HDR y el sgRNA. LHA: brazo de homología izquierdo, por sus siglas en inglés; RHA: brazo de homología derecho, por sus siglas en inglés.

La Fig. 2 es un diagrama que muestra sitios de corte candidatos identificados a partir de un cribado de 120 Indel de gRNA de saCas9 en células progenitoras pulmonares (LPC, por sus

siglas en inglés) sometidas a electroporación. Los controles positivos y negativos fueron células sometidas a electroporación con mRNA de saCAS9 junto gRNA de VEGFA o sin gRNA, respectivamente (diamantes negros y blancos). Las tasas de Indel (eje y izquierdo) están representadas por puntos sólidos y las tasas de supervivencia celular (eje y derecho) están representadas por cuadrados huecos. Las posiciones de los nucleótidos están representadas en el eje x, donde el primer nucleótido del intrón 10 de *hsCFTR* tiene designado un valor de 1 y así sucesivamente. Las SEQ ID NO se proporcionan en la TABLA 1.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la validación de 10 sitios diana de sgRNA candidatos en el intrón 10 del gen *CFTR* (marcado de acuerdo con la Fig. 2).

La Fig. 4 es un gráfico que muestra patrones de indel de los 10 sitios diana de sgRNA candidatos (marcado de acuerdo con la Fig. 2). Los gráficos de mapas de calor muestran perfiles de patrones indel desde -25 hasta +25 nucleótidos (eje y) del sitio de corte de CRISPR-CAS9 de cada uno de los 10 sitios diana de sgRNA candidatos. Los valores blancos y negros se establecieron como 0% y 100%, respectivamente.

La Fig. 5 es un diagrama que muestra una descripción general del análisis fuera de la diana de los 10 sitios diana de sgRNA candidatos. Análisis fuera de la diana resumido de 10 gRNA candidatos mediante el uso de tecnologías de captura híbrida y secuenciación GUIDE-Sequencing. El asterisco destaca los gRNA con edición fuera de la diana significativa y/o potencial.

La Fig. 6 es un esquema que representa un flujo de trabajo experimental de ejemplo utilizado para determinar la corrección funcional en LPC luego de la inserción de AAV de superexones del *CFTR* mediada por CRISPR-CAS9. LPC: célula progenitora pulmonar; HBE: célula epitelial bronquial humana; HDR: recombinación homóloga.

La Fig. 7 es un diagrama que muestra las tasas de HDR de superexones del *CFTR* obtenidas para los 10 sitios diana de sgRNA candidatos en las LPC. Gráfico que muestra las tasas de recombinación homóloga (HDR, por sus siglas en inglés) de superexones 11-27 del *CFTR* y la supervivencia de las células. Las LPC se sometieron a electroporación con o sin saCAS9 y el sgRNA correspondiente (CRISPR/Cas9). Las células se cultivaron en un medio que contenía las concentraciones mostradas del donador de AAV de superexones del *CFTR* correspondiente. Las tasas de supervivencia de las células se muestran en porcentajes donde las células sometidas a electroporación simuladas se establecieron arbitrariamente en 100 %. El gráfico muestra la media y la SD (desviación estándar, por sus siglas en inglés) por condición experimental (n=4).

La Fig. 8 es un gráfico que muestra la corrección funcional del *CFTR* después de la inserción del donador de superexones 11-27 del *CFTR* mediada por CRISPR-CAS9 en 7 sitios en HBE. Gráfico que muestra la corrección funcional del *CFTR* y las tasas de HDR de 7 sitios de gRNA seleccionados del *CFTR* en HBE. Las LPC dF508/dF508 se sometieron a electroporación con o sin mRNA de saCAS9 y el sgRNA correspondiente (CRISPR/Cas9). Las células se

sembraron en un medio con el donador de AAV de superexones del CFTR correspondiente. Los controles positivos para la función del CFTR fueron células tratadas con una combinación triple de correctores y potenciadores del CFTR de molécula pequeña (659-TC). El gráfico muestra la media y la SD por condición experimental (n=3).

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La edición génica (incluida la edición genómica) es un tipo de ingeniería genética en la que un nucleótido o nucleótidos/ácido o ácidos nucleicos se insertan, eliminan y/o sustituyen en una secuencia de ADN, como en el genoma de una célula diana. La edición génica dirigida permite la inserción, eliminación, y/o sustitución en sitios preseleccionados en el genoma de una célula diana (p. ej., en un gen diana o secuencia de ADN diana). Cuando se edita una secuencia de un gen endógeno, por ejemplo mediante eliminación, inserción o sustitución de un nucleótido o nucleótidos/ácido o ácidos nucleicos, el gen endógeno que comprende la secuencia afectada puede inactivarse o atenuarse debido a la alteración de la secuencia. Por lo tanto, la edición dirigida puede usarse para alterar la expresión génica endógena. De manera alternativa o adicional, se puede insertar un ácido nucleico deseado en un sitio diana en una secuencia de ADN (p. ej., en un gen endógeno), lo que se conoce como integración dirigida. «Integración dirigida» se relaciona con un proceso que implica la inserción de una o más secuencias exógenas, con o sin eliminación de una secuencia endógena en el sitio de inserción. La integración dirigida puede derivar de la edición génica dirigida cuando se encuentra presente un donador molde que contiene una secuencia exógena.

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el desarrollo de sistemas de edición génica eficientes para corregir una mutación o mutaciones en un gen regulador de la conductancia transmembrana de la CF (CFTR), p. ej., mutaciones en regiones codificadas por uno de los exones 11-27 y que causan CF. según se describe en este documento, la supervivencia de las células, las tasas de indel y los patrones de indel se determinaron en 120 posiciones diana no caracterizadas previamente en el intrón 10 del gen CFTR y se identificaron una serie posiciones de edición efectivas a partir de los resultados. Por consiguiente, los sistemas de edición génica descritos en este documento se basan en la identificación de posiciones diana candidatas (p. ej., las descritas en este documento) que facilitan la inserción efectiva (según lo determinan la supervivencia de las células, las tasas de indel y los patrones de indel) de un ácido nucleico que codifica los exones 11 a 27 del gen CFTR, lo que daría como resultado la corrección del 99 % de los alelos que no reaccionan ante el CFTR más frecuentes.

Por consiguiente, en este documento se proporcionan sistemas de edición génica para la modificación eficiente de genes CFTR y usos de estos para corregir mutaciones en el gen CFTR, tratando de esta manera la CF. Los componentes de los sistemas de edición génica y las

35

células modificadas genéticamente que resultan de la aplicación de los sistemas de edición génica también se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación.

I. Sistemas de edición génica para la modificación genética de un gen CFTR

5

En algunos aspectos, la divulgación se relaciona con sistemas de edición génica para modificar un gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). Un «sistema de edición génica» se relaciona con una combinación de componentes para la edición génica de un gen diana (p. ej., CFTR), o uno o más agentes para la producción de dichos componentes. Por ejemplo, un sistema de edición génica puede comprender: (a) una nucleasa, o un agente (p. ej., un ácido nucleico que codifica la nucleasa) para producirla; (b) un ARN guía (gRNA), o un agente para producirlo (p. ej., un vector capaz de expresar el gRNA); y/o (c) un donador molde, o un agente para producirlo (p. ej., un vector capaz de producir el donador molde).

10

15

Los sistemas de edición génica según se describen en este documento pueden presentar una o más ventajas en la modificación de un gen CFTR. Por ejemplo, lograrían altas tasas de edición génica, como tasas de reparación homóloga (p. ej., al menos 5 %, al menos 6 %, al menos 7 %, al menos 8 %, al menos 9 %, al menos 10 %, al menos 11 %, al menos 12 %, al menos 13 %, al menos 14 %, al menos 15 %, al menos 16 %, al menos 17 %, al menos 18 %, al menos 19 %, al menos 20 %, al menos 21 %, al menos 22 %, al menos 23 %, al menos 24 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 % o al menos el 40 % según lo evaluado mediante métodos conocidos en la técnica (p. ej., mediante métodos según descritos en este documento). Además, las células editadas por el sistema de edición génica descrito en este documento tendrían una alta tasa de supervivencia (p. ej., 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 85%, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 %) en comparación con un control sin editar. De manera alternativa o adicional, las células editadas por el sistema de edición génica presentarían una actividad del CFTR aumentada (p. ej., al menos un 30 %, 50 %, 100 %, 2 veces, 5 veces o 10 veces mayor) en comparación con el control sin editar.

20

25

30

En una modalidad de ejemplo, un sistema de edición génica según se describe en este documento puede comprender: (a) un primer polinucleótido, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el donador molde; (b) un segundo polinucleótido, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la endonucleasa de ADN guiada por ARN; y (c) un tercer polinucleótido, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el gRNA. En otra modalidad de ejemplo, un sistema de edición génica puede comprender: (a) un primer polinucleótido, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el donador molde; (b) un polipéptido, que comprende una endonucleasa de ADN guiada por ARN; y (c) un tercer polinucleótido, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el gRNA.

35

A. Nucleasa

La edición génica dirigida se puede lograr ya sea mediante un abordaje sin nucleasas o mediante un abordaje con nucleasas. En el abordaje de edición dirigida sin nucleasas, la recombinación homóloga está guiada por secuencias homólogas que flanquean un polinucleótido exógeno para su introducción en una secuencia endógena a través del mecanismo enzimático de la célula hospedadora. El polinucleótido exógeno puede introducir eliminaciones, inserciones o sustituciones de nucleótidos en la secuencia endógena.

Alternativamente, el abordaje con nucleasas puede lograr la edición dirigida mediante la introducción de roturas de doble hebra (DSB, por sus siglas en inglés) en ubicaciones específicas mediante el uso de nucleasas específicas de secuencia (*p. ej.*, endonucleasas). Dicha edición dirigida con nucleasas también utiliza mecanismos de reparación del ADN, por ejemplo, unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés), que se produce en respuesta a las DSB. La reparación del ADN mediante NHEJ a menudo conduce a inserciones o eliminaciones (indel) aleatorias de una pequeña cantidad de nucleótidos endógenos. A diferencia de la reparación mediante NHEJ, la reparación también puede ocurrir mediante una reparación homóloga (HDR). Cuando se encuentra presente un donador molde que contiene material genético exógeno flanqueado por un par de brazos de homología, el material genético exógeno puede introducirse en el genoma mediante HDR, lo que da como resultado la integración dirigida del material genético exógeno.

Puede proporcionarse una nucleasa de un sistema de edición génica en forma de polipéptido (es decir, una forma enzimática). Alternativamente, un sistema de edición génica puede comprender un agente para la producción de una nucleasa. Por ejemplo, un sistema de edición génica puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de una nucleasa y una secuencia de nucleótidos adicional que facilita la expresión/producción de la nucleasa como un polipéptido.

Las nucleasas disponibles capaces de introducir DSB específicas y dirigidas incluyen, a modo de ejemplo, nucleasas con dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés) y endonucleasas guiadas por ARN (*p. ej.*, nucleasas CRISPR-Cas9 o CRISPR/Cas9; grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares asociadas 9). Ejemplos adicionales de nucleasas dirigidas adecuadas para su uso como se proporciona en este documento incluyen, a modo de ejemplo, Bxb1, phiC31, R4, PhiBT1, y Wβ/SPBc/TP901-1, ya sea que se utilicen individualmente o combinadas. Otros ejemplos no limitantes de nucleasas dirigidas incluyen nucleasas recombinantes y naturales, *p. ej.*, CRISPR/Cas9, endonucleasas de restricción, endonucleasas de asentamiento meganucleasas, y similares.

(i) Nucleasas de dedos de zinc (ZFN)

Las ZFN son nucleasas dirigidas que comprenden una nucleasa fusionada a un dominio de unión al ADN con dedos de zinc (ZFBD, por sus siglas en inglés), que es un dominio polipeptídico que se une al ADN de una manera específica de secuencia a través de uno o más dedos de zinc. Un dedo de zinc es un dominio de aproximadamente 30 aminoácidos dentro del dominio de unión del dedo de zinc cuya estructura se estabiliza mediante la coordinación de un ion zinc. Ejemplos de dedos de zinc incluyen, a modo de ejemplo, dedos de zinc C2H2, dedos de zinc C3H y dedos de zinc C4. Un dominio de dedos de zinc diseñado es un dominio que no ocurre en la naturaleza y cuyo diseño/composición es principalmente el resultado de criterios racionales, p. ej., la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computarizados para procesar información en una base de datos que almacena información de diseños de ZFP existentes y datos de unión. Ver, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6,140,081; 6,453,242; y 6,534,261; ver también WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496. Un dominio de dedos de zinc seleccionado es un dominio que no se encuentra en la naturaleza, cuya producción es principalmente el resultado de un proceso empírico como la expresión en fagos, la trampa de interacción o la selección de híbridos. Las ZFN se describen con mayor detalle en la patente de EE. UU. n.º 7,888,121 y la patente de EE. UU. n.º 7,972,854. El ejemplo más reconocido de una ZFN es una fusión de la nucleasa FokI con un dominio de unión al ADN con dedos de zinc.

(ii) Nucleasas TALEN

Una TALEN es una nucleasa dirigida que comprende una nucleasa fusionada a un dominio de unión al ADN efector de TAL. Un «dominio de unión al ADN efector de tipo activador de la transcripción (TAL, por sus siglas en inglés)», «dominio de unión al ADN efector de TAL» o «dominio de unión al ADN efector de tipo activador de la transcripción (TALE, por sus siglas en inglés)» es un dominio polipeptídico de proteínas efectoras de TAL que es responsable de la unión de la proteína efectora de TAL al ADN. Las proteínas efectoras de TAL son secretadas por fitopatógenos del género *Xanthomonas* durante la infección. Estas proteínas ingresan en el núcleo de la célula vegetal, se unen a secuencias de ADN específicas del efector a través de su dominio de unión al ADN y activan la transcripción génica en estas secuencias a través de sus dominios de transactivación. La especificidad del dominio de unión al ADN efector de TAL depende de un número variable de repeticiones imperfectas de efectores de 34 aminoácidos, que comprenden polimorfismos en posiciones de repetición seleccionadas llamadas dieresiduos de repetición variable (RVD, por sus siglas en inglés). Las TALEN se describen con mayor detalle en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2011/0145940. El ejemplo más reconocido de una TALEN en la técnica es un polipéptido de fusión de la nucleasa FokI con un dominio de unión al ADN con un dominio de unión al ADN efector de TAL.

(iii) Endonucleasas guiadas por ARN

Las endonucleasas guiadas por ARN son enzimas que utilizan apareamiento de bases de ARN:ADN para dirigirse a y escindir un polinucleótido. La endonucleasa guiada por ARN puede escindir ácidos polinucleicos monocatenarios o al menos una hebra de un polinucleótido bicatenario. Un sistema de edición génica puede comprender una endonucleasa guiada por ARN. Alternativamente, un sistema de edición génica puede comprender al menos dos (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez) endonucleasas guiadas por ARN.

El sistema CRISPR-Cas9 es un mecanismo de defensa natural en células procariotas que se ha reutilizado como una plataforma guiada por ARN dirigida al ADN utilizada para la edición génica. Se basa en la nucleasa Cas9 del ADN y dos ARN no codificantes, ARN crispr (crRNA, por sus siglas en inglés) y ARN transactivador (tracrRNA, por sus siglas en inglés), para dirigir la escisión del ADN. El crRNA dirige el reconocimiento de la secuencia y la especificidad del complejo CRISPR-Cas9 a través del apareamiento de bases de Watson-Crick, típicamente con una secuencia de 20 nucleótidos (nt) en el ADN diana. Cambiar la secuencia de los 5' de los 20nt en el crRNA permite dirigir el complejo CRISPR-Cas9 a *loci* específicos. El complejo CRISPR-Cas9 solo se une a las secuencias de ADN que contienen una secuencia que coincide con los primeros 20 nt del crRNA si a la secuencia diana le sigue un motivo de ADN corto específico (con la secuencia NGG) denominado motivo adyacente al protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés). El tracrRNA se hibrida con el extremo 3' del crRNA para formar una estructura de ARN dúplex que está unida por la endonucleasa Cas9 para formar el complejo CRISPR-Cas9 con actividad catalítica, que luego puede escindir el ADN diana.

Una vez que el complejo CRISPR-Cas9 se une al ADN en un sitio diana, cada uno de los dos dominios nucleasa independientes dentro de la enzima Cas9 escinde una de las hebras de ADN arriba con respecto al sitio PAM, lo que deja una rotura de doble hebra (DSB) donde ambas hebras del ADN terminan en un par de bases (un extremo romo).

Un sistema de edición génica puede comprender una endonucleasa CRISPR (p. ej., una proteína 9 asociada a CRISPR o nucleasa Cas9). En algunas modalidades, la endonucleasa es de *Streptococcus aureus* (p. ej., saCas9), aunque pueden usarse otros homólogos de CRISPR. Debe entenderse que una Cas9 puede sustituirse por otra endonucleasa guiada por ARN conocida en la técnica, como Cpf1. Finalmente, debe entenderse que se puede usar una endonucleasa guiada por ARN de tipo silvestre o se pueden usar versiones modificadas (p. ej., versiones evolucionadas de la Cas9, ortólogos de la Cas9, proteínas quiméricas/de fusión Cas9 u otras variantes funcionales de la Cas9). Por ejemplo, en algunas modalidades, la endonucleasa guiada por ARN se modifica para que comprenda una señal de localización nuclear (NLS), como una NLS de SV40 o una NLS de nucleoplasmina. Los expertos en la técnica conocen ejemplos de otras señales de localización nuclear. En algunas modalidades, la NLS comprende una NLS de SV40 y una NLS de nucleoplasmina.

B. ARN guía

La presente divulgación proporciona un ácido nucleico dirigido al genoma, o un agente para producirlo (p. ej., un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un gRNA), que puede dirigir las actividades de un polipéptido asociado (p. ej., una endonucleasa guiada por ARN) a una secuencia diana específica dentro de un ácido nucleico diana. El ácido nucleico dirigido al genoma puede ser un ARN. Un ARN dirigido al genoma se denomina en este documento «ARN guía» o «gRNA». En algunas modalidades, un sistema de edición génica comprende un gRNA. En otras modalidades, un sistema de edición génica puede comprender al menos dos gRNA (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez gRNA).

Puede proporcionarse un gRNA de un sistema de edición génica en forma sintetizada. Por ejemplo, se puede sintetizar un ARN guía por medios químicos, como se ilustra más adelante y se describe en la técnica. Si bien los procedimientos de síntesis química se amplían continuamente, las purificaciones de dichos ARN mediante procedimientos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés, que evita el uso de geles como PAGE) tienden a ser más complejas a medida que las longitudes de los polinucleótidos aumentan significativamente y superan un centenar de nucleótidos. Un enfoque utilizado para generar ARN de mayor longitud es producir dos o más moléculas que están unidas. Se generan ARN mucho más largos enzimáticamente con mayor facilidad. Se pueden introducir diversos tipos de modificaciones del ARN durante o después de la síntesis química y/o generación enzimática de ARN, p. ej., modificaciones que mejoran la estabilidad, reducen la probabilidad o el grado de respuesta inmunitaria innata y/o mejoran otros atributos, según se describe en la técnica.

Alternativamente, un sistema de edición génica puede comprender un agente para la producción de un gRNA. Por ejemplo, un sistema de edición génica puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de nucleótidos de un gRNA y una secuencia de nucleótidos adicional que facilita la expresión/producción del gRNA.

Un gRNA puede ser un ARN guía de doble molécula. Un gRNA de doble molécula comprende dos hebras de ARN. La primera hebra puede comprender, en la dirección 5' a 3', una secuencia de extensión espaciadora opcional, una secuencia espaciadora y una secuencia de andamiaje una secuencia de repetición CRISPR mínima. La segunda hebra comprende una secuencia de tracrRNA mínima (complementaria de la secuencia de repetición CRISPR mínima), una secuencia de tracrRNA 3' y una secuencia de extensión de tracrRNA opcional.

Alternativamente, un gRNA puede ser un ARN guía de una sola molécula que comprende una secuencia espaciadora y una secuencia de andamiaje. Un ARN guía de una sola molécula puede comprender además una extensión espaciadora opcional.

(i) Espaciador de gRNA

El experto en la técnica entiende que cada gRNA está diseñado para que incluya una secuencia espaciadora complementaria de su secuencia genómica diana. Ver Jinek *et al.*, Science, 337, 816-821 (2012) y Deltcheva *et al.*, Nature, 471, 602-607 (2011). Una secuencia espaciadora es una secuencia (p. ej., una secuencia de 20 nucleótidos) que define la secuencia diana (p. ej., una secuencia diana del ADN, como una secuencia genómica diana) de un ácido nucleico diana de interés. El gRNA puede comprender una secuencia espaciadora de longitud variable con 17-30 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia de gRNA. En algunas modalidades, la secuencia espaciadora tiene de 15 a 30 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia espaciadora tiene 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. En algunas modalidades, una secuencia espaciadora tiene 20 nucleótidos.

La «secuencia diana» es adyacente a una secuencia PAM y es la secuencia modificada por una nucleasa guiada por ARN (p. ej., Cas9). El «ácido nucleico diana» es una molécula bicatenaria: una hebra comprende la secuencia diana y se denomina «hebra con PAM» y la otra hebra complementaria se denomina «hebra sin PAM». Un experto en la técnica reconoce que la secuencia espaciadora de gRNA se hibrida con el complemento inverso de la secuencia diana, que está ubicado en la hebra sin PAM del ácido nucleico diana de interés. Por lo tanto, la secuencia espaciadora de gRNA es el equivalente del ARN de la secuencia diana. Por ejemplo, si la secuencia diana es 5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 13), la secuencia espaciadora de gRNA es 5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3' (SEQ ID NO: 14). El espaciador de un gRNA interactúa con un ácido nucleico diana de interés de una manera específica de secuencia mediante hibridación (*es decir*, apareamiento de bases). Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos del espaciador varía en función de la secuencia diana del ácido nucleico diana de interés.

La secuencia espaciadora está diseñada para hibridar con una región del ácido nucleico diana que se ubica en 5' de un PAM de la enzima Cas9 utilizada en el sistema. El espaciador puede aparearse perfectamente con la secuencia diana o puede tener apareamientos erróneos. Cada enzima Cas9 tiene una secuencia PAM particular que se reconoce en un ADN diana. Por ejemplo, la Cas9 *S. pyogenes* reconoce en un ácido nucleico diana un PAM que comprende la secuencia 5'-NRG-3', donde R comprende ya sea A o G, donde N es cualquier nucleótido y N se encuentra contiguo a 3' de la secuencia de ácido nucleico diana dirigida por la secuencia espaciadora.

En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico diana comprende 20 nucleótidos. En algunas modalidades, el ácido nucleico diana comprende menos de 20 nucleótidos. En algunas modalidades, el ácido nucleico diana comprende más de 20 nucleótidos. En algunas modalidades, el ácido nucleico diana comprende al menos: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 o más nucleótidos. En algunas modalidades, el ácido nucleico diana comprende al menos: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 o más nucleótidos. En

algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico diana comprende 20 bases contiguas a 5' del primer nucleótido del PAM. Por ejemplo, en una secuencia que comprende 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3', el ácido nucleico diana comprende la secuencia que corresponde a los N, en donde N es cualquier nucleótido y la secuencia NRG subrayada es el PAM de *S. aureus*.

En algunas modalidades, un gRNA para uso en el sistema de edición génica descrito en este documento puede dirigir la escisión por parte de la endonucleasa guiada por ARN a un sitio diana en la posición 1220, 2068, 3821, 4262, 5041, 5052, 5278, 5343, 5538, o 6150 del intrón 10 en el gen CFTR, en donde el número designado corresponde a la posición del nucleótido dentro del intrón 10 del gen *hscFTR* (es decir, al primer nucleótido del intrón se le da un valor de 1, al segundo un valor de 2, y así sucesivamente).

Los gRNA de ejemplo pueden comprender una de las siguientes secuencias espaciadoras:

- (i) ACCCAGCCTGACACCAAATTTA (SEQ ID NO: 2);
- (ii) TACTAAAAGGCAGCCTCCTAGA (SEQ ID NO: 3);
- (iii) ATTGGCTACCTTGGTTGGATGA (SEQ ID NO: 4);
- (iv) GACAGCTGGCTATCCAGGATTC (SEQ ID NO: 5);
- (v) ACTTGCAGGAGGTGAGGGATTA (SEQ ID NO: 6);
- (vi) ATTAGGGAATGCAGACTCTGGG (SEQ ID NO: 7);
- (vii) TGGGTGAGATTAGAGGCCACTG (SEQ ID NO: 8);
- (viii) TGCTTCCTCCCTTGTCTCCCTA (SEQ ID NO: 9);
- (iv) TGGCATATGAGAAAAGTCACAG (SEQ ID NO: 10); y
- (x) CCTTATTCTTTTGATATACTCC (SEQ ID NO: 11).

(ii) Andamiaje de gRNA

En algunas modalidades, el gRNA comprende además una secuencia de andamiaje. Una secuencia de andamiaje puede comprender la secuencia de una secuencia de repetición CRISPR mínima, un ligador guía de una sola molécula, una secuencia de tracrRNA mínima, una secuencia de tracrRNA 3' y/o una secuencia de extensión de tracrRNA opcional. En algunas modalidades, la secuencia de andamiaje comprende la secuencia de nucleótidos de GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCA AAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 12). La secuencia de andamiaje puede estar conectada al extremo 5' y/o 3' de una secuencia espaciadora. En algunas modalidades, la secuencia de andamiaje está conectada al extremo 3' de la secuencia espaciadora. En algunas modalidades, la secuencia de andamiaje está conectada al extremo 5' de la secuencia espaciadora.

(iii) Secuencias de gRNA de ejemplo

Un gRNA para su uso en el sistema de edición génica descrito en este documento puede comprender, consistir esencialmente en (p. ej., contener hasta 20 nucleótidos adicionales en el extremo 5' y/o el extremo 3' de las siguientes secuencias), o consistir en una de las siguientes secuencias de nucleótidos:

- 5 (i) acccagcctgacaccaaatttaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA
GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO:
26);
- (ii) tactaaaaggcagcctcctagaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA
10 GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO:
27);
- (iii) attggctaccttggttgatgaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAG
GCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 28);
- (iv) gacagctggctatccaggattcGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA
GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO:
15 29);
- (v) acttgcaggaggtgagggattaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA
GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO:
30);
- (vi) attaggggaatgcagactctgggGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA
20 GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO:
31);
- (vii) tgggtgagattagaggccactgGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACA
AGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO:
32);
- 25 (viii) tgcttctcccttgctccctaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAG
GCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 33);
- (iv) tggcatatgagaaaagtcacagGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA
GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO:
34); y
- 30 (x) ccttattctttgatatactccGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGG
CAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 35).

Se entiende que debido a que las secuencias de gRNA descritas anteriormente son secuencias de ARN. Cualquier T (timina) en las secuencias que se refieren a los gRNA haría referencia al U (o uracilo) en el contexto de las moléculas de ARN. Las secuencias que contienen T (timina) en este documento abarcan tanto moléculas de ADN como moléculas de ARN (en donde T hace referencia a U).

35

Además, el gRNA de una sola molécula no puede comprender uracilo en el extremo 3' de la secuencia de gRNA. El gRNA puede comprender uno o más uracilos en el extremo 3' de la secuencia de gRNA. Por ejemplo, el gRNA puede comprender 1 uracilo (U) en el extremo 3' de la secuencia de gRNA. El gRNA puede comprender 2 uracilos (UU) en el extremo 3' de la secuencia de gRNA. El gRNA puede comprender 3 uracilos (UUU) en el extremo 3' de la secuencia de gRNA. El gRNA puede comprender 4 uracilos (UUUU) en el extremo 3' de la secuencia de gRNA. El gRNA puede comprender 5 uracilos (UUUUU) en el extremo 3' de la secuencia de gRNA. El gRNA puede comprender 6 uracilos (UUUUUU) en el extremo 3' de la secuencia de gRNA. El gRNA puede comprender 7 uracilos (UUUUUUU) en el extremo 3' de la secuencia de gRNA. El gRNA puede comprender 8 uracilos (UUUUUUUU) en el extremo 3' de la secuencia de gRNA.

Se entiende además que los nucleótidos de los gRNA descritos anteriormente pueden comprender ácidos nucleicos modificados en cualquier posición de los nucleótidos. Por consiguiente, un gRNA puede ser modificado o no modificado. Por ejemplo, los gRNA modificados pueden comprender uno o más nucleótidos de 2'-O-metil fosforotioato. Los expertos en la técnica conocen ejemplos de ácidos nucleicos modificados adicionales.

(iv) Complejos de ribonucleoproteínas

En algunos casos, el sistema de edición génica descrito en este documento puede comprender un complejo de ribonucleoproteínas (RNP, por sus siglas en inglés), en el que un gRNA y una nucleasa (p. ej., según se describe anteriormente) forman un complejo. Como se usa en este documento, el término «ribonucleoproteína» o «RNP» se refiere a una proteína que está asociada estructuralmente con un ácido nucleico (ya sea ADN o ARN). Por ejemplo, en algunas modalidades, una endonucleasa guiada por ARN Cas9 y un gRNA de un sistema de edición génica están en forma de RNP.

C. Donador molde

Un donador molde comprende una secuencia de ácido nucleico que se insertará en un sitio diana en una secuencia de ADN (p. ej., en un gen endógeno). Por consiguiente, en algunas modalidades, un donador molde de un sistema de edición génica puede comprender un minigén CFTR que contiene los exones 11 a 27 de un gen de CFTR. El donador molde puede comprender además la secuencia de nucleótidos de un sitio de empalme aceptor y/o uno o más brazos homólogos.

Puede proporcionarse un donador molde de un sistema de edición génica en forma sintetizada. Alternativamente, un sistema de edición génica puede comprender un agente (p. ej., un ácido nucleico como un vector) para la producción de un donador molde. Por ejemplo, un sistema de edición génica puede comprender un ácido nucleico (p. ej., un vector) para la producción de un donador molde.

(i) *Minigén CFTR que comprende los exones 11 a 27 del CFTR*

El donador molde puede comprender un minigén CFTR que codifica los exones 11 a 27 de un gen de CFTR (p. ej., hsCFTR). El minigén CFTR puede contener uno o más del intrón 11 al intrón 26 como en un gen de CFTR de tipo silvestre. Por ejemplo, el minigén CFTR puede comprender una secuencia de nucleótidos del intrón ubicada en 3' con respecto al exón 11 del gen de CFTR y/o una secuencia de nucleótidos del intrón entre uno o más de los exones 11 y 12, exones 12 y 13, exones 13 y 14, exones 14 y 15, exones 15 y 16, exones 16 y 17, exones 17 y 18, exones 18 y 19, exones 19 y 20, exones 20 y 21, exones 21 y 22, exones 22 y 23, exones 23 y 24, exones 24 y 25, exones 25 y 26 y exones 26 y 27. En algunos casos, el minigén CFTR carece de al menos uno de los intrones 11-26.

Si el minigén CFTR contiene una secuencia de nucleótidos del intrón entre el exón 11 y el exón 27, dicha secuencia de intrones puede ser un intrón de CFTR nativo. Por ejemplo, el intrón 3' con respecto al exón 11 de CFTR puede ser un intrón 10 de CFTR de tipo silvestre. Del mismo modo, el intrón de CFTR de tipo silvestre 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y/o 26 (o cualquier combinación de estos) puede estar situado entre uno o más de los exones 11 y 12, exones 12 y 13, exones 13 y 14, exones 14 y 15, exones 15 y 16, exones 16 y 17, exones 17 y 18, exones 18 y 19, exones 19 y 20, exones 20 y 21, exones 21 y 22, exones 22 y 23, exones 23 y 24, exones 24 y 25, exones 25 y 26 y/o exones 26 y 27 (o cualquier combinación de estos).

Alternativamente, el minigén CFTR puede contener un intrón sintético (es decir, no endógeno del gen de CFTR) entre los exones 11-27. En algunas modalidades, la primera secuencia de nucleótidos comprende un intrón sintético entre los exones 11 y 12, exones 12 y 13, exones 13 y 14, exones 14 y 15, exones 15 y 16, exones 16 y 17, exones 17 y 18, 18 y 19, 19 y 20, 20 y 21, 21 y 22, 22 y 23, 23 y 24, 24 y 25, 25 y 26 y/o 26 y 27 (o cualquier combinación de estos). En algunas modalidades, un intrón sintético comprende una secuencia de nucleótidos del intrón de CFTR modificada (es decir, un intrón de CFTR nativo que se ha modificado mediante la adición o eliminación de uno o más nucleótidos).

En algunas modalidades, el minigén CFTR puede no tener ninguna secuencia de intrones (p. ej., entre los exones 11-27). En algunos casos, el minigén CFTR codifica un fragmento de un CFTR humano de tipo silvestre, que se codifica por los exones 11-27 de un gen CFTR humano de tipo silvestre. Por ejemplo, el minigén CFTR puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica el siguiente fragmento de CFTR (SEQ ID NO: 36):

```
MVIMGELEPSEGKIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYSVIKACQLEEDISKFA
EKDNIVLGEGGITLSGGQRARISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVLTEKEIFESCVCKLMANKT
RILVTSKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGTFSSELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNSILTE
TLHRFSLEGDAPVSWTETKKQSFKQTGEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLQMNGIEEDSD
EPLERRLSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNNQGNHRKTTASTRK
```

VSLAPQANLTELDIYSRRLSQETGLEISEEINEEDLKECFFDDMESIPAVTTWNTYLRITVHKS
 IFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPQLQDKGNSTHSRNNYAVIITSTSSYYVFYIYGVADTL
 LAMGFFRGLPLVHTLITVSKILHHKMLHSLVQLQAPMSTLNTLKAGGILNRFKDIALLDLLPLTIFD
 FIQLLLIVIGAIYVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRAYFLQTSQQKQLESEGRSPIFTHLVTSLKG
 5 LWTLRAFGRRQPYFETLFHKALNLHTANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIFIAVTFISILTTGEGEG
 RVGIILTAMNIMSTLQWAVNSSIDVDSLMRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKNGQLSKVMI
 IENSHVKKDDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFSISPGQRVGLLGRTGSGKSTLLSA
 FLRLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVIPQKVIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVAD
 EVGLRSVIEQFPGKLDVFLVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLSKAKILLDEPSAHLDPVTYQIIR
 10 RTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECCQFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQAISPSDRVKLF
 PHRNSSKCKSKPQIAALKEETEEVQDTRL

En un ejemplo, el minigén CFTR comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 37, que codifica el fragmento de CFTR mencionado anteriormente (SEQ ID NO: 36).

Alternativamente, el minigén CFTR puede comprender una secuencia de nucleótidos que comparte 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 por ciento de identidad con la SEQ. ID NO: 37 y codifica un fragmento de CFTR funcional (p. ej., la SEQ ID NO: 36).

(ii) *Sitio de empalme aceptor*

Un donador molde puede comprender además un fragmento de nucleótidos ubicado en 5' con respecto al minigén CFTR para proporcionar un sitio de empalme aceptor de manera que el extremo 5' del minigén CFTR se pueda conectar con precisión al exón 9 arriba mediante empalme de ARN después de ser insertado en el intrón 10 del gen CFTR. En algunos ejemplos, el fragmento de nucleótidos que porta el sitio de empalme aceptor puede ser un fragmento del extremo 3' del intrón 10 de un gen CFTR nativo. En algunas modalidades, el sitio de empalme aceptor puede ser el sitio de empalme aceptor nativo del intrón 10 del gen CFTR nativo. En otras modalidades, el sitio de empalme aceptor puede ser un sitio de empalme aceptor sintético (es decir, no nativo). Los expertos en la técnica conocen ejemplos de secuencias de nucleótidos que comprenden sitios de empalme aceptores sintéticos. Cualquiera de los fragmentos de nucleótidos que portan un sitio de empalme aceptor puede tener una longitud de 50-200 nucleótidos (p. ej., una longitud de 80-150 o 100-150 nucleótidos).

Por ejemplo, en algunas modalidades, el primer fragmento codifica para un sitio de empalme aceptor sintético comprende, de 5' a 3':

35 TATACACTTCTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAA
 GTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATGATGGGTTTTATTTCAG (SEQ ID NO: 1), en donde el extremo 3' AG es el sitio de empalme aceptor.

(iii) *Brazos homólogos*

El donador molde puede comprender además uno o más brazos homólogos que flanquean el minigén CFTR, lo que permite una recombinación homóloga (HDR) eficiente en una ubicación genómica de interés (p. ej., el intrón 10 del CFTR). La longitud de un brazo homólogo puede variar. Por ejemplo, un brazo homólogo puede tener una longitud de al menos 50, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 500, al menos 550, al menos 600, al menos 650, al menos 700, al menos 750, al menos 800, al menos 850, al menos 900, al menos 950 o al menos 1000 nucleótidos. Del mismo modo, un brazo homólogo puede tener una longitud de 50 a 100, 50 a 200, 50 a 300, 50 a 400, 50 a 500, 50 a 600, 50 a 700, 50 a 800, 50 a 900, 50 a 1000, 100 a 200, 100 a 300, 100 a 400, 100 a 500, 100 a 600, 100 a 700, 100 a 800, 100 a 900, 100 a 1000, 200 a 300, 200 a 400, 200 a 500, 200 a 600, 200 a 700, 200 a 800, 200 a 900, 200 a 1000, 300 a 400, 300 a 500, 300 a 600, 300 a 700, 300 a 800, 300 a 900, 300 a 1000, 400 a 500, 400 a 600, 400 a 700, 400 a 800, 400 a 900, 400 a 1000, 500 a 600, 500 a 700, 500 a 800, 500 a 900, 500 a 1000, 600 a 700, 600 a 800, 600 a 900, 600 a 1000, 700 a 800, 700 a 900, 700 a 1000, 800 a 900, 800 a 1000 o 900 a 1000 nucleótidos. En particular, un brazo homólogo puede tener una longitud de 500 nucleótidos.

Por ejemplo, en algunas modalidades, un donador molde comprende un brazo homólogo 5' (es decir, situado arriba con respecto a la primera secuencia de nucleótidos) y un brazo homólogo 3' (es decir, situado abajo con respecto a la primera secuencia de nucleótidos), en donde el brazo homólogo 5' comprende una secuencia de ácido nucleico que es homóloga a una región arriba con respecto a la ubicación genómica de interés, y en donde el brazo homólogo 3' comprende una secuencia de ácido nucleico que es homóloga a una región abajo con respecto a la ubicación genómica de interés. En algunas modalidades, el brazo homólogo 5' y el brazo homólogo 3' comprenden secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- (i) SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente;
- (ii) SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20, respectivamente;
- (iii) SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, respectivamente;
- (iv) SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, respectivamente;
- (v) SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 345, respectivamente;
- (vi) SEQ ID NO: 346 y SEQ ID NO: 347, respectivamente;
- (vii) SEQ ID NO: 348 y SEQ ID NO: 349, respectivamente;
- (viii) SEQ ID NO: 350 y SEQ ID NO: 351, respectivamente;
- (ix) SEQ ID NO: 352 y SEQ ID NO: 353, respectivamente; y
- (x) SEQ ID NO: 354 y SEQ ID NO: 355, respectivamente.

En otras modalidades, el donador molde puede comprender un brazo homólogo 5' y carecer de un brazo homólogo 3'. En incluso otras modalidades, el donador molde puede comprender un brazo homólogo 3' y carecer de un brazo homólogo 5'. Un brazo homólogo 5' o

3' puede comprender la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 17-25 y de las SEQ ID NO: 345-355, respectivamente.

Alternativamente, un donador molde puede carecer de brazos homólogos. Por ejemplo, en algunos casos, un donador molde puede integrarse mediante la unión de extremos de NHEJ después de la escisión en el sitio diana.

En algunos casos, el donador molde puede comprender, desde el extremo 5' al extremo 3', un brazo homólogo 5', un fragmento de nucleótidos que contiene un sitio de empalme aceptor, un minigén CFTR, y un brazo homólogo del extremo 3'. Estos componentes pueden estar ligados directamente. Alternativamente, pueden estar ligados mediante un ligador de nucleótidos.

Un donador molde puede ser ADN o ARN, monocatenario y/o bicatenario, y puede introducirse en una célula en forma lineal o circular. Si se introduce en forma lineal, los extremos de la secuencia donadora pueden protegerse (p. ej., de la degradación exonucleolítica) mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se añaden uno o más residuos de didesoxinucleótido al extremo 3' de una molécula lineal y/o se ligan oligonucleótidos autocomplementarios a uno o ambos extremos. Ver, por ejemplo, Chang et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al., (1996) Science 272:886-889. Métodos adicionales para proteger polinucleótidos exógenos de la degradación incluyen, a modo de ejemplo, la adición de un grupo o grupos amino terminales y el uso de enlaces internucleotídicos modificados como, por ejemplo, fosforotioatos, fosforamidatos y residuos de O-metil ribosa o desoxirribosa.

Se puede introducir un donador molde en una célula como parte de una molécula de vector que tiene secuencias adicionales como, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores y genes que codifican resistencia a antibióticos. Además, un donador molde puede introducirse como ácido nucleico desnudo, como ácido nucleico que forma complejos con un agente como un liposoma o poloxámero, o puede ser introducido por virus (p. ej., adenovirus, AAV, herpesvirus, retrovirus, lentivirus y lentivirus defectuoso de la integrasa (IDLV, por sus siglas en inglés)).

En algunas modalidades, se inserta un donador molde de manera que su expresión sea introducida por el promotor endógeno, como el promotor que introduce la expresión del gen endógeno en el que se inserta el donador.

Además, las secuencias exógenas también pueden incluir secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales, por ejemplo, promotores, potenciadores, aislantes, sitios internos de entrada al ribosoma, secuencias que codifican péptidos 2A y/o señales de poliadenilación.

D. Sistema de edición génica a partir de vectores virales/partículas virales

En algunas modalidades, el sistema de edición génica descrito en este documento puede comprender ácidos polinucleicos (p. ej., vectores como vectores virales) o partículas virales que

los comprenden. El o los ácidos polinucleicos producen los componentes (p. ej., una nucleasa, un gRNA y un donador molde) para editar un gen CFTR según se describe en este documento.

En algunos ejemplos, el sistema de edición génica comprende un ácido polinucleico capaz de producir todos los componentes del sistema de edición génica, incluidos una nucleasa, un gRNA y un donador molde. En otros ejemplos, el sistema de edición génica comprende dos ácidos polinucleicos, uno codifica la nucleasa y el gRNA y el otro comprende el donador molde. Alternativamente, el sistema de edición génica comprende dos ácidos polinucleicos, uno codifica la nucleasa y el otro comprende el donador molde y que codifica el gRNA. En otro ejemplo, el sistema de edición génica comprende dos ácidos polinucleicos, el primero codifica la nucleasa, el segundo codifica el gRNA y el tercero comprende el donador molde.

El ácido nucleico (o al menos un ácido nucleico en el conjunto de ácidos nucleicos) puede ser un vector como un vector viral, como un vector retroviral, un vector de adenovirus, un vector viral adenoasociado (AAV) y un vector del virus del herpes simple (VHS, por sus siglas en inglés).

En algunos ejemplos, el sistema de edición génica puede comprender una o más partículas virales que portan materiales genéticos para producir los componentes del sistema de edición génica según se describe en este documento. Una partícula viral (p. ej., una partícula AAV) puede comprender uno o más componentes (o agentes para producir uno o más componentes) de un sistema de edición génica (p. ej., según se describe en este documento). Una partícula viral (o virión) comprende un ácido nucleico, que codifica el genoma viral, y una cubierta proteínica externa (es decir, una cápsida). En algunos casos, una partícula viral comprende además una envoltura de lípidos que rodea la cubierta proteínica.

En algunos ejemplos, una partícula viral comprende un ácido polinucleico capaz de producir todos los componentes del sistema de edición génica, incluidos una nucleasa, un gRNA y un donador molde. En algunos ejemplos, una partícula viral comprende un ácido polinucleico capaz de producir uno o más componentes del sistema de edición génica. Por ejemplo, una partícula viral puede comprender un ácido polinucleico capaz de producir la nucleasa y el gRNA. Alternativamente, una partícula viral puede comprender un ácido polinucleico capaz de producir el donador molde y codificar el gRNA. En otro ejemplo, una partícula viral puede comprender un ácido polinucleico capaz de producir solo uno de la nucleasa, el gRNA o el donador molde.

Las partículas virales descritas en este documento pueden derivarse de cualquier partícula viral conocida en la técnica, incluidas, a modo de ejemplo, una partícula retroviral, una partícula de adenovirus, una partícula viral adenoasociada (AAV) o una partícula de virus del herpes simple (HSV). En algunas modalidades, la partícula viral es una partícula AAV.

En algunas modalidades, un conjunto de partículas virales comprende más de un sistema de edición génica. En algunas modalidades, cada partícula viral en el conjunto de partículas virales es una partícula AAV. En otras modalidades, un conjunto de partículas virales comprende más de un tipo de partícula viral (p. ej., una partícula retroviral, una partícula de adenovirus, una partícula viral adenoasociada (AAV) o una partícula de virus del herpes simple (HSV)).

E. Sistemas de edición génica de ejemplo adicionales

Además, el sistema de edición génica descrito en este documento puede comprender una nucleasa (p. ej., una enzima Cas9) según se describe en este documento. Dicho sistema de edición génica puede comprender además el gRNA y el donador molde. La nucleasa y el gRNA, opcionalmente combinados con el donador molde, pueden formar una RNP para su introducción. Además, el sistema de edición génica puede comprender además el gRNA y un ácido polinucleico (p. ej., un vector como los descritos en este documento) para producir el donador molde. La nucleasa y el gRNA pueden formar un complejo de RNP. Alternativa, el sistema de edición génica puede comprender además uno o más ácidos polinucleicos para producir el gRNA y el donador molde.

Alternativamente, el sistema de edición génica descrito en este documento puede comprender un agente para producir la nucleasa, por ejemplo, un vector de expresión como un vector viral según se describe en este documento capaz de expresar la nucleasa. Dicho sistema de edición génica puede comprender además el gRNA y/o el donador molde, o agentes para producirlos.

Cualquier otro formato del sistema de edición génica que comprenda los componentes descritos en este documento para modificar el gen CFTR o los agentes que los producen se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación.

II. Métodos para editar un gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR)

En algunos aspectos, la divulgación se relaciona con métodos para editar un gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) mediante el uso de cualquiera de los sistemas de edición génica descritos en este documento. Un evento de edición puede corregir una mutación en un gen CFTR. Una o más copias (es decir, alelos) de un gen (p. ej., CFTR) pueden comprender una mutación. En algunas modalidades, los métodos de edición génica descritos en este documento pueden usarse para corregir al menos una copia (es decir, un alelo) de un gen CFTR. En algunas modalidades, se editan dos copias (es decir, alelos) de un gen CFTR.

Se han descrito más de 2000 mutaciones en el CFTR que confieren una serie de fenotipos moleculares y funcionales. Ver, p. ej., Veit G. et al., Mol. Biol. Cell. 1 de feb. de 2016; 27(3): 424-33. M1V, A46D, E56K, P67L, R74W, G85E, E92K, P99L, D110H, D110E, R117C, R117H, R170G, G178R, E193K, P205S, L206W, V232D, R334W, R334W, I336K, T338I, S341P, R347P, R347H, R352Q, L467P, S492F, Δ I507, Δ F508, V520F, G542X, S549R, S549N, G551S, G551N, G551D, A455E, S549N, R553X, A559T, R560T, R560S, R560K, A561E, Y569D, D579G, D614G, R668C, L927P, S945L, S977F, L997F, F1052V, H1054D, K1060T, L1065P, R1066C, R1066M, R1066H, A1067T, R1070Q, R1070W, F1074L, H1085R, M1101K, D1270N, D1152H, L1077P, S1235R, G1244E, S1251N, S1255P, W1282X, N1303K, G1349D, Q1411X,

2789+5G>A y 3849+10kbC>T son algunos ejemplos. En algunas modalidades, los métodos descritos en este documento pueden usarse para corregir una o más mutaciones enumeradas anteriormente o conocidas de otro modo en la técnica.

Un método para editar un gen CFTR puede comprender poner en contacto una célula con: un sistema de edición génica según se describe en este documento; una partícula viral o conjunto de partículas virales que comprenden un sistema de edición génica según se describe en este documento; y/o un ácido nucleico o conjunto de ácidos nucleicos que comprenden un sistema de edición génica según se describe en este documento. Estos métodos pueden realizarse, por ejemplo, en una o más células que existen dentro de un sujeto vivo (p. ej., *in vivo*). De manera alternativa o adicional, estos métodos pueden realizarse en una o más células que existen en cultivo (p. ej., *in vitro*). En algunos casos, una célula editada en cultivo se le administra a un sujeto después (lo que en este documento se categoriza como «tratamiento basado en células»).

A. Métodos de introducción

El contacto de la célula (o sujeto) con el sistema de edición génica, partícula viral o conjunto de partículas virales y/o el ácido nucleico o conjunto de ácidos nucleicos pueden realizarse mediante diversos métodos de introducción. Por ejemplo, pueden introducirse nucleasas y/o donadores molde mediante el uso de un sistema de vector, que incluye, a modo de ejemplo, vectores plasmídicos, minicírculos de ADN, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores de adenovirus, vectores de poxvirus; vectores de virus del herpes y vectores de virus adenoasociados, y combinaciones de estos.

Pueden usarse métodos de transferencia de genes convencionales con virus y sin virus para introducir ácidos nucleicos que codifican nucleasas y donadores molde en células. Los sistemas de introducción de vectores no virales incluyen plásmidos de ADN, minicírculos de ADN, ácido nucleico desnudo y ácido nucleico que forma complejos con un vehículo de introducción como un liposoma o poloxámero. Los sistemas de introducción de vectores virales incluyen virus de ADN y ARN, que tienen genomas ya sea episomales o integrados después de la introducción en la célula.

Métodos de introducción de ácidos nucleicos no virales incluyen, a modo de ejemplo, electroporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, conjugados lípido:ácido nucleico o polimerización, ADN desnudo, ARN desnudo, ARN con caperuza, viriones artificiales e introducción de ADN potenciada por agentes. También puede usarse la sonoporación mediante el uso, p. ej., del sistema Sonitron 2000 (Rich-Mar) para la introducción de ácidos nucleicos.

Métodos para la introducción de proteínas (p. ej., endonucleasas guiadas por ARN) incluyen, a modo de ejemplo, el uso de nanovehículos y péptidos que penetran en las células.

(i) *Introducción mediante virus adenoasociado*

El ácido nucleico del donador que codifica los exones 11 a 27 del gen CFTR puede introducirse a una célula mediante el uso de un virus adenoasociado (AAV). Los AAV son pequeños virus que se integran en un sitio específico en el genoma hospedador y, por lo tanto, pueden introducir un transgén, como los exones 11 a 27 del gen CFTR. Las repeticiones terminales invertidas (ITR, por sus siglas en inglés) están presentes flanqueando el genoma del AAV y/o el transgén de interés y actúan como orígenes de replicación. También están presentes en el genoma del AAV las proteínas rep y cap que, cuando se transcriben, forman cápsidas que encapsulan el genoma del AAV para su introducción en las células diana. Receptores de superficie en estas cápsidas que confieren el serotipo de AAV, que determina a qué órganos diana se unirán principalmente las cápsidas y, por lo tanto, a qué células infectará el AAV de forma más eficiente. Actualmente se conocen doce serotipos de AAV humanos. En algunas modalidades, el AAV es AAV serotipo 6 (AAV6).

Los virus adenoasociados se encuentran entre los virus utilizados más frecuentemente para tratamientos génicos por varias razones. En primer lugar, los AAV no provocan una respuesta inmunitaria tras la administración a mamíferos, incluidos los seres humanos. En segundo lugar, los AAV se introducen eficazmente en las células diana, particularmente cuando se tiene en cuenta la selección del serotipo de AAV adecuado. Por último, los AAV tienen la capacidad de infectar células que se encuentran y que no se encuentran en proceso de división porque el genoma puede persistir en la célula hospedadora sin integración. Este rasgo los convierte en candidatos ideales para tratamientos génicos.

(ii) *Reparación homóloga (HDR)*

El ácido nucleico donador que codifica los exones 11 a 27 del gen CFTR puede insertarse en la región genómica diana de la célula editada mediante reparación homóloga (HDR). Una enzima CRISPR Cas9 corta ambas hebras del ADN en la región genómica diana. Después se produce la HDR para reparar la rotura de doble hebra (DSB) e insertar el ADN donador. Para que esto suceda correctamente, la secuencia donadora se diseña con residuos flanqueantes que son complementarios de la secuencia que rodea el sitio de la DSB en el gen diana (en adelante, «brazos de homología»). Estos brazos de homología actúan como molde para la reparación de DSB y permiten que la HDR sea un mecanismo esencialmente sin errores. La tasa de reparación homóloga (HDR) es en función de la distancia entre la mutación y el sitio de corte, por lo que es importante elegir sitios diana superpuestos o cercanos. Los moldes pueden incluir secuencias adicionales flanqueadas por las regiones homólogas o pueden contener una secuencia que difiera de la secuencia genómica, lo que permite la edición de secuencias.

(iii) *Unión de extremos no homólogos (NHEJ)*

La vía de NHEJ también puede producir, con muy baja frecuencia, insertos que contienen los exones 11-27. Dicha reparación debería corregir la expresión de CFTR cuando el inserto está en la orientación de la hebra de sentido.

5 B. Tratamiento de las células

Los métodos descritos en este documento pueden realizarse en una o más células que existen en cultivo (p. ej., *in vitro*). Por consiguiente, en algunos aspectos, la divulgación se relaciona con células editadas genéticamente que comprenden un gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) editado en el que se inserta un ácido nucleico exógeno en el intrón 10 del gen CFTR endógeno. La secuencia exógena puede comprender uno o más de los componentes del donador molde descrito anteriormente (p. ej., una secuencia de nucleótidos que codifica los exones 11 a 27 del CFTR, una secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de empalme aceptor y/o una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más brazos homólogos).

15 (i) Células con gen CFTR editado

Las células editadas genéticamente se pueden producir mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en este documento. En algunas modalidades, una o más ediciones de genes dentro de una población de células editadas dan como resultado un fenotipo asociado a cambios en la funcionalidad del CFTR.

En algunas modalidades, las células editadas genéticamente de la presente divulgación presentan una actividad del CFTR aumentada (p. ej., al menos un 30 %, 50 %, 100 %, 2 veces, 5 veces o 10 veces mayor) en comparación con el control sin editar. Por ejemplo, los niveles de actividad del CFTR pueden aumentar al menos un 30 %, al menos un 50 %, al menos un 100 %, al menos un 200 %, al menos un 500 %, al menos un 1000 % en comparación con las células de control sin editar. En algunas modalidades, los niveles de actividad del CFTR pueden aumentar al menos un 30 %-50 %, 30 %-100 %, 30 %-200 %, 30 %-500 %, 30 %-1000 %, 50 %-100 %, 50 %-200 %, 50 %-500 %, 50 %-1000 %, 100 %-200 %, 100 %-500 %, 100 %-1000 %, 200 %-500 %, 200 %-1000 % o 500 %-1000 % en comparación con las células T de control.

30 (ii) Métodos de administración

En algunos casos, se le puede administrar a un sujeto una célula editada genéticamente. La etapa de administración puede incluir la colocación (p. ej., trasplante) de células modificadas genéticamente en un sujeto, mediante un método o vía que dé como resultado la localización al menos parcial de las células introducidas en un sitio deseado, de modo que se produzca el o los efectos deseados y donde al menos una parte de las células implantadas o componentes de las células siguen siendo viables. El período de viabilidad de las células después de su administración a un sujeto puede ser tan breve como de unas pocas horas, p. ej., veinticuatro

horas, o de unos pocos días, y tan largo como de varios años, o incluso toda la vida del sujeto, es *decir.*, injerto a largo plazo. En algunas modalidades, la administración se realiza en el aparato respiratorio del sujeto.

Las vías de administración incluyen inyección, infusión, instilación o ingestión. Inyección incluye, a modo de ejemplo, inyección e infusión por vía intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subepidérmica, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, intracerebroespinal e intraesternal. En algunas modalidades, la vía es intravenosa.

En algunas modalidades, las células modificadas genéticamente se administran por vía sistémica, lo cual se refiere a la administración de una población de células de forma que no sea directa en un sitio, tejido u órgano diana, de modo que ingrese, en cambio, al sistema circulatorio del sujeto y, por lo tanto, esté sujeta al metabolismo y otros procesos similares.

Para su uso en los diversos aspectos descritos en este documento, una cantidad eficaz de células modificadas genéticamente comprende al menos 10^2 células, al menos 5×10^2 células, al menos 10^3 células, al menos 5×10^3 células, al menos 10^4 células, al menos 5×10^4 células, al menos 10^5 células, al menos 2×10^5 células, al menos 3×10^5 células, al menos 4×10^5 células, al menos 5×10^5 células, al menos 6×10^5 células, al menos 7×10^5 células, al menos 8×10^5 células, al menos 9×10^5 células, al menos 1×10^6 células, al menos 2×10^6 células, al menos 3×10^6 células, al menos 4×10^6 células, al menos 5×10^6 células, al menos 6×10^6 células, al menos 7×10^6 células, al menos 8×10^6 células, al menos 9×10^6 células, o múltiplos de estos. En algunos ejemplos descritos en este documento, las células se expanden en cultivo antes de su administración a un sujeto que lo necesite.

C. Cantidad eficaz

En algunos aspectos, la divulgación se relaciona con métodos para administrarle una cantidad eficaz de un sistema de edición génica según se describe en este documento, una partícula viral o un conjunto de partículas virales que comprenden un sistema de edición génica según se describe en este documento, un ácido nucleico o un conjunto de ácidos nucleicos que comprenden un sistema de edición génica según se describe en este documento, o una composición de células editadas según se describe en este documento a un sujeto que lo necesite.

Un sujeto puede ser cualquier sujeto para el que se desee un diagnóstico, tratamiento o terapia. En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano. En algunas modalidades, el sujeto es un paciente humano que tiene fibrosis quística. En algunas modalidades, el paciente humano es un niño.

Una cantidad eficaz se refiere a la cantidad de un sistema de edición génica, una partícula viral o un conjunto de partículas virales que comprenden un sistema de edición génica, un ácido

nucleico o un conjunto de ácidos nucleicos que comprenden un sistema de edición génica, o una población de células modificadas genéticamente necesarias para evitar o aliviar al menos uno o más signos o síntomas de una afección médica (es decir, CF), y se refiere a una cantidad suficiente de una composición para proporcionar el efecto deseado (es decir, para tratar a un sujeto que tiene FC). Una cantidad eficaz también incluye una cantidad suficiente para evitar o retrasar la aparición de un síntoma de la enfermedad, alterar el desarrollo de un síntoma de la enfermedad (por ejemplo, entre otros, enlentecer la evolución de un síntoma de la enfermedad), o revertir un síntoma de la enfermedad. Se entiende que para cualquier caso dado, un experto en la técnica puede determinar una cantidad eficaz correspondiente mediante experimentación de rutina.

Un médico experimentado puede determinar la eficacia de un tratamiento que comprende una composición para el tratamiento de una afección médica. Un tratamiento se considera un «tratamiento eficaz» si alguno o todos los signos o síntomas de, a modo de ejemplo, los niveles de funcionalidad diana se modifican de una manera beneficiosa (p. ej., aumentan al menos un 10 %) u otros síntomas o marcadores de la enfermedad (p. ej., CF) aceptados desde el punto de vista clínico mejoran o se alivian. La eficacia también se puede determinar por el hecho de que un sujeto no empeore según se evalúe por la hospitalización o la necesidad de intervenciones médicas (p. ej., se detiene o al menos se enlentece la evolución de la enfermedad). Los expertos en la técnica conocen métodos para determinar dichos indicadores y/o estos se describen en este documento. El tratamiento incluye cualquier tratamiento de una enfermedad en un sujeto e incluye: (1) inhibir la enfermedad, p. ej., detener o enlentecer la evolución de los síntomas; o (2) aliviar la enfermedad, p. ej., provocar la regresión de los síntomas; y (3) evitar o reducir la probabilidad del desarrollo de síntomas.

III. Kits de uso terapéutico

La presente divulgación también proporciona kits para el uso de las composiciones descritas en este documento. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona kits que comprenden un sistema de edición génica según se describe en este documento; una partícula viral o conjunto de partículas virales que comprenden un sistema de edición génica según se describe en este documento; un ácido nucleico o conjunto de ácidos nucleicos que comprenden un sistema de edición génica según se describe en este documento; y/o una población de células modificadas genéticamente según se describe en este documento.

En algunas modalidades, el kit puede comprender adicionalmente instrucciones de uso para cualquiera de los métodos descritos en este documento. Las instrucciones incluidas pueden comprender una descripción de: (i) la introducción de un sistema de edición génica según se describe en este documento; una partícula viral o conjunto de partículas virales que comprenden un sistema de edición génica según se describe en este documento; y/o un ácido nucleico o conjunto de ácidos nucleicos que comprenden un sistema de edición génica según se describe

en este documento; y/o (ii) la administración de una población de células modificadas genéticamente según se describe en este documento.

El kit puede comprender además una descripción de la selección de un sujeto adecuado para el tratamiento al identificar si el sujeto necesita el tratamiento. Las instrucciones pueden incluir información sobre la posología, el esquema posológico y la vía de administración para el tratamiento previsto. Los envases pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (*p. ej.*, paquetes de múltiples dosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la divulgación típicamente son instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto. La etiqueta o prospecto indica que las composiciones farmacéuticas se utilizan para tratar, retrasar la aparición y/o aliviar una enfermedad o trastorno en un sujeto.

Los kits que se proporcionan en este documento vienen en envases adecuados. Envases adecuados incluyen, a modo de ejemplo, ampollas, botellas, frascos, envases flexibles y similares. También abarcan envases para su uso combinado con un dispositivo específico, como un inhalador, un dispositivo de administración nasal o un dispositivo de infusión. Un kit puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o una ampolla con un tapón que pueda perforarse con una aguja hipodérmica). El envase también puede tener una vía de acceso estéril.

Opcionalmente, los kits pueden proporcionar componentes adicionales, como amortiguadores e información para la interpretación. Generalmente, el kit comprende un envase y una etiqueta o prospecto o prospectos en el envase o asociado a este. En alguna modalidad, la divulgación proporciona artículos de fabricación que comprenden el contenido de los kits descritos anteriormente.

IV. Técnicas generales

Al llevar a la práctica la presente divulgación se emplearán, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, comprendidas en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en publicaciones, como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, ed. 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, ed.): *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, ed., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. ed. 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, et al., ed. 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., ed., 1991); *Short Protocols in*

Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practice approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, ed., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, ed. Harwood Academic Publishers, 1995); *DNA Cloning: A practical Approach*, tomos I y II (D. N. Glover ed. 1985); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins ed. (1985»; *Transcription and Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins, ed. (1984»; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1986»; *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986»; y B. Perbal, *A practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel *et al.* (ed.).

Sin más preámbulos, se cree que un experto en la técnica puede, sobre la base de la descripción anterior, utilizar la presente divulgación con su máximo alcance. Por lo tanto, las modalidades específicas a continuación se deben interpretar como meramente ilustrativas y no limitan el resto de la descripción de forma alguna. Todas las publicaciones citadas en este documento se incorporan mediante referencia con los fines o para la materia a los que se hace referencia en este documento.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Sistemas de edición génica para la modificación genética de un gen CFTR

Métodos

Células y cultivo: las células progenitoras pulmonares (LPC) se obtuvieron de donadores de pulmón humanos diagnosticados con fibrosis quística. Los números de identificación del donador de LPC 14071 y 14335 contienen el genotipo del CFTR dF508/dF508 y dF508/G542X, respectivamente. Las LPC se obtuvieron y expandieron con el medio de crecimiento de células epiteliales bronquiales BEGM™ (Lonza) complementado con reactivos patentados de Vertex.

Las células epiteliales bronquiales humanas (HBE) se obtuvieron mediante diferenciación dirigida de LPC mediante el uso del formato de cultivo de interfaz aire-líquido (ALI, por sus siglas en inglés). Se sembraron 80 000 células LPC por pocillo en el lado apical de una placa de 96 pocillos para ALI. Las LPC se alimentaron desde el lado apical y basolateral un día sí y otro no durante 5 días con el medio de crecimiento de células epiteliales bronquiales BEGM™ (Lonza) complementado con reactivos patentados de Vertex. El día 6, se eliminó el medio apical para promover la interfaz aire-líquido. Los medios basolaterales fueron reemplazados por los medios de diferenciación de HBE patentados de Vertex. Las células se alimentaron un día sí y otro no al reemplazar el medio de diferenciación de HBE en el lado basolateral. La diferenciación completa de HBE se obtuvo después de 5 semanas de diferenciación de HBE.

Reactivos de edición génica CRISPR-Cas9: se adquirieron gRNA sintéticos de Synthego. Los gRNA se purificaron mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) y contenían

nucleótidos modificados químicamente (2'-O-metil 3'-fosforotioato) en las tres posiciones terminales en ambos extremos 5' y 3'. Los gRNA contenían una secuencia espaciadora con una longitud de 22 nucleótidos para dirigirse específicamente al intrón 10 del gen CFTR (ver TABLA 1) y una secuencia de andamiaje con una longitud de 80 nucleótidos que permite la unión a la proteína saCAS9.

El mRNA de saCas9 fue diseñado por CRISPR Therapeutics y sintetizado por TriLink Biotechnologies. El mRNA de saCas9 expresa una Cas9 de *Staphylococcus aureus* (código de registro de Uniprot J7RUA5) con señales de localización nuclear de SV40 y nucleoplasmina. El mRNA de saCas9 también contiene una estructura CAP1 y una señal poliadenilada para obtener niveles de expresión óptimos en células de mamíferos. El mRNA de saCAS9 se purificó mediante HPLC.

Intrón 10 de hsCFTR (SEQ ID NO: 38)

GTAGTTCTTTTGTCTTCACTATTAAGAACTTAATTTGGTGTCCATGTCTCTTTTTTTTTCTAG
 TTTGTAGTGCTGGAAGGTATTTTTGGAGAAATTCTTACATGAGCATTAGGAGAATGTATGG
 GTGTAGTGTCTTGTATAATAGAAATTGTTCCACTGATAATTTACTCTAGTTTTTTATTTCTC
 ATATTATTTTCAGTGGCTTTTTCTTCCACATCTTTATATTTTGACCCACATTCAACACTGTAT
 CTTGCACATGGCGAGCATTCAATAACTTTATTGAATAAACAAATCATCCATTTTATCCATTCT
 TAACCAGAACAGACATTTTTTCAGAGCTGGTCCAGGAAAATCATGACTTACATTTTGCCTTA
 GTAACCACATAAACAAAAGGTCTCCATTTTTGTTAACATTACAATTTTCAGAATAGATTTAGA
 TTTGCTTATGATATATTATAAGGAAAAATTATTTAGTGGGATAGTTTTTTGAGGAAATACATA
 GGAATGTTAATTTATTCAGTGGTCATCCTCTTCTCCATATCCCACCCTAAGAACAACCTTAAC
 CTGGCATATTTGGAGATACATCTGAAAAAATAGTAGATTAGAAAGAAAAACAGCAAAAGG
 ACCAAAACCTTTATTGTCAGGAGAAGACTTTGTAGTGATCTTCAAGAATATAACCCATTGTGT
 AGATAATGGTAAAACTTGCTCTCTTTTAACTATTGAGGAAATAAATTTAAAGACATGAAAGA
 ATCAAATTAGAGATGAGAAAGAGCTTTCTAGTATTAGAATGGGCTAAAGGGCAATAGGTAT
 TTGCTTCAGAAGTCTATAAAATGGTTCCTTGTTCCATTTGATTGTCATTTTAGCTGTGGTA
 CTTTGTAGAAATGTGAGAAAAAGTTTAGTGGTCTCTTGAAGCTTTTCAAATACTTTCTAGA
 ATTATACCGAATAATCTAAGACAAACAGAAAAAGAAAGAGAGGAAGGAAGAAAGAAGGAAA
 TGAGGAAGAAAGGAAGTAGGAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGTAAGAGGGA
 AGCAGTGCTGCTGCTGTAGGTAAAAATGTTAATGAAAATAGAAATTAAGAAAGACTCCTGA
 AAGGCAATTATTTATCAATATCTAAGATGAGGAGAACCATATTTTGAAGAATTGAATATGAG
 ACTTGGGAAACAAAATGCCACAAAAAATTTCCACTCAATAAATTTGGTGTGAGGCTGGGTG
 CAGTGGCTCACACTTGTATCCTAGCACTTTTGGAGGCAGAGGCAGGTGAATTGCTTGAGT
 CCAGGAGTTTGAGACCAGCGTGGGCAACATGGCAAACCCACCTCTACAAAAAACACAAA
 CAAAAGAAAATAGCTGGGTGTGGTGGTGTGTGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTG
 AGGTGGGAGGATCACCTGAGCCTGAGAAGTGGAGGCTGCAGTGAGCCATGATTGCACCA
 CTGTACCCTAGCCTAGGTGATAGGCTCAAAAAAAAAAAAAAATTGGTGTGTTGCAATGCTAATA

ATACAATTTGGTTGTTTCTCTCTCCAGTTGTTTTCCTACATACGAAACAGCTTTTAAACAAA
 ATAGCTGGAATTGTGCATTTTTTCTTACAAAAACATTTTCTTCTTAAATGTTATTATTTTTC
 TTTTATATCTTGTATATTACTAGCAGTGTTCACTATTAAAAAATTATACTATAGGAGGGG
 CTGATACTAAATAAGTTAGCAATGGTCTAAACAAGGATGTTTATTTATGAAAAGGTAGTAAT
 5 TGTGTTTCATAGAATTTTTTAAATTAATTCTGCGTATGTCTTCAAGATCAATTCTATGATAGA
 TGTGCAAAAATAGCTTTGGAATTACAAATTCCAAGACTTACTGGCAATTAAATTTTCAGGCAG
 TTTTATTAATAATTGATGAGCAGATAATTACTGGCTGACAGTGCAGTTATAGCTTATGAAAAG
 CAGCTATGAAGGCAGAGTTAGAGGAAGGCAGTGGTCCCTTGGGAATATTTAAACACTTCTG
 AGAAACGGAGTTTACTAACTCAATCTAGGAGGCTGCCTTTTAGTAGTATTAGGAATGGAAC
 10 ACTTTATAGTTTTTTTTTGACAAAAGATCTAGCTAAAATATAAGATTGAATAATTGAAAATATT
 AACATTTTAAGTTAAATCTTACCCACTCAATACAATTTGGTAATTTGTATCAGAAGCTTAAAA
 GATAACCTAATAGTTCTTCTACTTCTATAACTTACCCAAATATGTTTGCAGAGATCTTATGTA
 AAGCTCTTCATTATAACACTGCTTTCAGGAGCCAAAAATTGGGTGGGGGAGCCCCATAAAT
 GTTGAATAATAGGGGTTTGATTAGATAAATTTTGGTGTAGTTCTATAATGGCGTGTTATTCA
 15 GCCAATAAAAGGTTTGTTAAAGAATGACTGTGACGGATGTATATGATATACTCTTAAGTGAA
 TAAAGAGTTACAAAATGTTATGTACAAGTTACAAAATGTATGTACATTATGATCCATTTTTCA
 TAAAATCATATGTATGTATATATGTGTGTCTGGAAGGATAAATTTATCAAGTTGTTATCTCTG
 AAATTTTGGGTATATTTTATATTTCTAGATTTTCTGTTACTTTGTTACTTTACTGATAAAGTAA
 TAACGTTGTTGACTTTTGTCACTCTCCCCTATTAATAATCATCTAGGCTGCAAAAGGATCAT
 20 GTCTTCTTTATTTTTATATTCCAAGGACTGTCAACAAGTGCCTAGCACTTGACAGGTATATT
 ATAGAAATTTAACTGAATATCTTTAGGAAATAGATTTTTGTTTGTAGTTGTTCTAGTCTACAT
 TAAATGTCTTGCGCTTATGAACTTCCTTGAATTATTTTAGTGAAGCAATATTAGTATAGAAT
 TTTGCATCACTGGATGCCCTTGACTGAAAGCTGGCTTATGGCATCTCACCAGTGTGTGGG
 GAGTTTCAGTCCTTCTGTTGTCTGCATCACAGCTGAAGCAGTGCTGTTGCTGACAATTCCT
 25 GACACCACCTTGCTCTATTATTGATCATTGCCTCACTATGGTACTGAGTTTTAGCTTATTCT
 TGTAATAACTGGGACTCATATGTATAGAATAAGCTATTAGCTCACGTTTTTGCTTGCTTTTTA
 TACAGAATACATGTCTGCAATAGTTTTATCAATATTTTGAATTTTGGGAGATATGAAGTTA
 AAAACATCATTGAATATATATATATACACACACACATATATATATGACACTATACATGATTTAT
 TTTATTTAATTTTTTAAATTTTATTCTTTTTAGAGATTAGGTCTTACTCTGTCACCCAGGCTGA
 30 ACTTCAGTGGTGTGATCATAGCTCACTGTAACCTTGAACCTCCTGGGCTCAATTGACCTTTC
 CGCTTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGTTTATAGGCATGAGCCACTGTGTCTGGTCCAATATG
 CATATATATATTTTTAACCTGGATTATCAGAGCTATATTGTGTTTAGGTTTATAAAGCTGTAC
 TATGTGAAAATATCACTTCTAGGTTTAATTTTGTACAAAGGAATTTTATATAGAAATGAGGTA
 ATTCAGATTTTTTCCCATGTAATAAGAATTGTAAAATTTACTGAAACAAACATCAAAAAGATA
 35 TCTGTTACATGACCTTCCTTTCTTTTGAATATATTTTCAAGGTGATATTATTTATTAATTTAAA
 AATGAAAATTAATAATATATAAAAAGTTGAAAATTATTCCTTTCTTACTGTCTCTCATCTGTCC
 ATTTTCCATTCTCCTGCATTCCCTCATCCAACCAAGGTAGCCAATCCAGGTAACCTTTTTTTA
 GTATCTTCCCAGAGATGTTTCTCTCTATATATATAATCAATATACATTTTTTTATTATTCCCCAC

CTCTCTTTTTATGTAACAATATGCAGAGTTTTGCTTCTTGCTTTTCCCACTATCTTGGACAAC
 TTTCCATATTCAAAGCACAGAGGACTTGACATATGTTGAGACTGCTGAATATTTCTGTCTC
 TCCCCTGCCATTATATGTTGAAATCCTAATTCCCAAGGTGATGGTATTGCAGGGTGGGGC
 CTTTGGGAGGTGATTAGTCCATGAGGGTGAAGTCTTTAGTAAATGAGATTAGTGTCTTTATA
 5 AAAGAAACCTTAGAGAGACCCTCACACCTTAGAGAGACCCTCACCCCTTTCTGCCATGTGA
 GAACACAGCAGGAAGACAGCTGGCTATCCAGGATTCAGGAGTCTCTTAGCAGACCCAAAT
 CTGCTGGCACCTTGATCTTGGACTTCCCAGCCTCCAGAACTGTGAGAAATAAATTCCTGTT
 GTTTATAAGCCACACAGTTCATGGTATTTTTGTTATAGCAGCCTGAACAAGGACACACACAC
 ACACACACACACATGCACACACATTTAAATAGATGCATAGTATTCTATCATATGGATGGATA
 10 TTCTATGATATAATGAATCACTATTGATTGACATTTGGGTTGTTTCCAATATTTTGTAAACAC
 AAAGAACAACACTACAAATAACTTTATATACATATCATTTAGCACATCTGCAATTGTATCAGT
 AGGCTTCCTATAAGTGGTCAAGCATTTGTGTACTTGTGATTTTGGTAGATGTTGTCAAATGT
 CCTTCCCTGAAATTTGTACCAATTCGTAATCATGCCATACACTCTAAATAGAGTGCTGATTT
 CCCACAGCATTACTAACAGATGATATTATCTAATTTAAAAAGTTTCTCATCTTATAGGGAAA
 15 ATAGTATGTCAATGTATTCTTAACCTTGCATTTCTTTTATTATAAGTAGTGTAATATATCATTTT
 AACTTATACACAGGAGGAATTTCTCTCTATATAAAGTGATCCTAGAATCATAATGAAAAATAT
 CACCAACTCATTAGGAAAATGTACAAAGGATTGAATAGATATCTCATCAAAAATAAAAATAT
 AAGTGGCCTTTAAACATTGAAAGGTAACATTTGAACAAAGACTTGCAGGAGGTGAGGGATT
 AGGGAATGCAGACTCTGGGAAGAGTCTTCCAAGTAGCAGGTGAAGCAAGTGCAAAGCTTT
 20 CAGATGGGACTGACTATACCTGTCTGGTTTGAAGAACAGTAAGGAGGTCACTGAGGCTGG
 CATAGAGTAAGACAGGGAGGGTAGAATACTGTCAGAGAAGTAATCGGCGGTGGAGGTAG
 GGGGTAAACCATAAAGTGCTCGTAAAGACTAAGGCTTATTTCTCTGGGTGAGATTAGAGGC
 CACTGGAGAGTTTTTAAACAGAAGTAACAGGGCCACTTTGGCTAATGTTTTTAGGCTATTCT
 GTAGGGAGACAAGGGAGGAAGCAAGGAGATGAGTTAGGAGTCTATTGTGCCAGTTCAGG
 25 CAAGTGATGATGGTGGCTTGATCCAGGTAGTAGTGGAAGTAGTATAGTAGGAAGTGATCA
 GATTCAGGACATGCTTTGAAGGAAGATCCAATAGGATTAATGGATAAGTTGAACAATGGCA
 TATGAGAAAAGTCACAGAGGAGTCAAAGATGATTCCAAGCTTTCTGGACTGAGTAACTGGA
 AGGATAAATGTGCCGTTTACTAGAAAGATAATGGGAGAAACAGGTTTTGGATGGAGCTTGG
 TTTGGGAATATTAAGTTTGAATGCCTATTTGACATCCAAATAGAGATGTTAGTTGGATGTA
 30 CAAGTCTAGTTTCAAGGAAGAGGGGGCTGGTAGTGTGAAGATGGGGCTGGATAAGATTCT
 AAAGGAAAGAGGGTTGATAAGAAGAGAAAGGGGTGTAGGGGTAGCCTAAGGGCATTCTA
 AGTATTAGAGGTTAAGGAGGTGGGTGAAGAAAACCCAATAAAATAAAAGTCTGAGAAGACA
 AAGCTAGTGAATGAATGTGGTATCCCGGAACCCAAGTATGTCAAGCAGAAGGGTGTTATC
 AACTAGGTCAAATGCTCATTATCAAGTAAGATGAACTGTTATAATTAACCGGTGTCTTCT
 35 GAAATACGGAGATAACTCGTGACTTAATGAAAGCAATAGTAGAGAAGGTCAAACCTTGACCA
 GAATGAAATTAGAAAGAATAAGAGGAAAGAAAAGACCAAATACAGACAACCATTGATGCCT
 TATTCTTTTGATATACTCCTGGAGTCCACTTGCTAATACAATTGACCCTTAAACAATACAGG
 CTTGAACTGCATGGGTCCACTTATTTGTGAATTTTTTTTCAGTTAATACATTGGAAAATTTT

GGGGTTTTTTGACAATTTGAAAAAACTCACAACTGTCTAGCCTAGAAATACCGAGAAAATT
 AAGAAAAAGTAAGATATGCCATGAATGCATAAAATATATGTAGACACTAGCCTATTTTATCA
 TTTGCTACTATAAAATATACACAATCTATTATAAAAAAGTTAAAATTTATCAAACTTAACACAC
 ACTAACACCTACCCTACCTGGCACCATTACAGTAAAGAGAAATGTAAATAAACATAAAAAT
 5 GTAGTATTAACCATAATGGCATAAACTAATTGTAGTACATATGGTACTACTGTAATAATTT
 GGAAGCCACTTCCTGTTGCTATTACGGTAAGCTCAAGCATTGTGGATAGCCATTTAAAACA
 CCACGTGATGCTAATCATCTCCGTGTGAGCAGTTCTCTCTCCAGTAAATTGCATATTGCAG
 TAAAAAGTGATCTCTAGTGGTTCTCGCATATTTTTTCATCATGTTTAGTGCAATGCCATAAAC
 CTTGAATAACATCAAGCAATCCATACAAAGTGCCACTAGTGATGCACGGAAAAGTTGTAAC
 10 AGTACAAGAAAAAAGTTGAGTTGCTTGGTATTTACCATATATTGAGGTCTGCAGCTACAGTT
 GCCTGCAATTTTCGAGATAAATGAACCCAGTATAAAGACTGTTGTAACAAAAGAAAAGAAAAT
 GTGAAACCATCAGTGCAGCTATGCCAGCAGGTGTGAAGTCTTGCACTTTTTTGCAAAATACA
 AAATATGAAATATGTGTTAATTGACTGTTTATGTTATCTGTAAGGTTTCCACTCAACAATAGG
 CTATTAGTAGTTAAGTTTTTTGTGGAGTCAAAAATTATACGTGGATTTTTGACTATACAGTGG
 15 GTTGGCACCCCTAACCTTCATGTTGATAAAGGGTCAATGGTATATTATTTAATTTTTTTGTAT
 TTATATTCATAAATAAGATTAAATCTATATTTCCAAGTAATCTCTATAAGATTTTGTTATTAAT
 ATTACTATTATTTTTGAGACAGAGTCTTACTGTCACCAGGCTGGAGCACAGTGGTGCGATC
 TCGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCCGGGCTCAAGCAATTCTCCTGCCTCACCCTCCCAA
 GTAGCTGGGACTACAGGCACGCACAACCACACTCAGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGA
 20 CGGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGATGGTATTGATCTCTTGACCTCATGATCTGCCTGCCT
 CGGCCTCCCAAAGTGTTGGGATTACAGGCATGAGCCACTGTGCACAGCCATTAATATTATT
 GTTACCCAATAAAAAAATTTGGAACTTGTCTTCTTTTCCCCTGATTCTGTTTAAATAGCAC
 TGGAGTTACCTGTTTTGAATTTTTTTTCCAAGCGGTCCCTTATGAGTTTTCTCTATGTTTTAT
 TTGTTTCATTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACGGAGTCTCGCTCTGTCGCCCAG
 25 GCTGGAGTGCAGTGGCGGGATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCGCCTCCCGGGTTCACGCC
 ATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCCGCCACTACGCCCCG
 CTAATTTTTTTGTATTTTGTAGTAGAGACGGGGTTTACCAGTTTTAGCCGGGATGGTCTCGATC
 TCCTGACCTCGTGATCCGCCCCGCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAG
 CCACCGCGCCCGGCCTGTTTCATTTCTTATATCGTATTTTTGCAACTCCTTTATTGATACTTT
 30 TCTTCCTGATTAGGTTTCTACTAAAACCAACAAGCTTTCCATGAATTAGCTTTTAGATTTAC
 TTATTAGTTTAACTGTTCTGTTGATTGTAACCTAATTTTATAATTTTATCTTTATTAATTAT
 TCTATTTTTCTTCGCTTTTTTTGTTGTTTTCTAGTTTTTGAGTTAGATGTTTGACGCTTTTTTA
 AAAAGCTGTGCATTTTCTCTGGGTAATACTTTAGCTGTATATTATGTATTCTGATATATAGT
 GTTCCATTACATTGTTTTCTAGAAAATCTGTAGCTTTGATTTATATTTGTTTCCTCTTTGACC
 35 TAAGATATCCTAAGGGAAAATTTAACATTTTCCAGAAAGAAAACAAATTTTCTTTGTTTTCCA
 AGAATGTTGTTCAAATTATTTCTACTGCTTGGAATTTTTATCATTTTTGTGTATCCAGTAAATA
 GTCAATATTTGTAAGTCTCTGACCACATAAAAGAATATATTCGTGTAGTTTCTATTAATA
 GATTAGAGTTCAATTCAGATATTAAATGTACATCATTATTCATGATATTTAGGTCTTCTACAT

CTTCACTTATCTTTTTCTACTTGCTTTGCCATTAACAGATAAAGTTGAATTAAGGCTTCTA
 CTACATACATTTCTCCCTGTTATTCTTATAGGTTCTGTAATTTTTGCTTCAAGAATATTGCT
 TTTTAAATTTAATATATAGATACTTATAATTACACTCTAGCATTATAAAGAGCCTTTTCTTTT
 CATTGAATGTATTTGGGCCTGCATATGTCTAACATGAAAATTATAGTCCTTTTTTTGTTTCTT
 5 TGTGTTGATTTACAGTTTTAAGTTCCATTTTCAACCTTTATGCACTCTTTGCTTTAGGTGTGT
 CTCTTTTAGTTAGCATAAAGTTAGGTTTGTCTTTAATTTCACCTGAAGTCTTTTCTCTTAAT
 AGATGGGTAAAGCCAAGTAAAAATAAACTGACTTATATACTTTTATTTCAAGTATGTCCTC
 CACAAATATTTTTGAATAGATTAGCTTATATACTTTGGAATTTGTTAAAAAAGATTTTTATA
 AAAAATAATTGTGGTGAAATGTACATAACATAAAATTTATCATTTTGACCATTTTTAAGGGCA
 10 TAGCTCTGTGGCATAAAGTATACTCACATAGTTGTGCAACTATCACCTCCTTTTGATTTTTT
 TTAATAATTTGTAAATTTGTTTCATCTGAGCTGTCTTATTATGTTTTGTTTTATGTTTTCTT
 CCTTTATTATGAAGTCACTGTATTGTCTGTAGGCTATATGTATCTGTGAGTGTGTGTGTATA
 TGTGTGTATTATGGTTTTTAAAAAGTCTATATTTGTTTTCCAGTGGCTATACTTAATACTAA
 TAACTTTATGTTAAATTTTTATTCTATGTGACTCTAGTTCACTAATATGAGCTCTGATAAAAT
 15 CAGTGCTTTTTCGAGGTTAGGAGATCAAGACCATCCTGGCTAACACAGTGAAACTCCGTCT
 CTAATAAAATACAAAAAATTAGCCAGACGTGATGGCGGGTGCCCGTAGTCCCAGCTACTC
 GGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCGTGAACCCAGGAGGCAGAACTTGCACTGAGCCGA
 GATCGCGCCACTGCACTCTAGCCTGGGTGACAGAGTGAGACTCTGTCTCTAAATAAATAAA
 TAAATAAATAAATAAATAAATAAAATCAGTGCTTTTTCTTCTCTGCTACCTCCTTTCTTCTA
 20 CTCAGTTTTAGTCAGTAGTATTATCTTTTTTCTGATTTATCTTTGTATTGTTAAATCTGCTTAT
 GCTTCTATTACTTTTATTATTAGCTTTAAATGATACCTTTTGACTTTTCTTCTTAATAAA
 GCAATCAGCAAATTTCTTTTACACTCCACACTTATACCCCATTTCTTTGTTTGTTTATTGG
 TTTTACTTCTAACTTTTCTTATTGTCAGGACATATAACATATTTAACTTTGTTTTTCAACTC
 GAATTCTGCCATTAGTTTTAATTTTTGTTTACAGTTATATAAATCTTTGTTCACTGATAGTCC
 25 TTTTGTACTATCATCTCTTAAATGACTTTTATACTCCAAGAAAGGCTCATGGGAACAATATTAC
 CTGAATATGTCTCTATTACTTAATCTGTACCTAATAATATGAAGGTAATCTACTTTGTAGGAT
 TTCTGTGAAGATTAAATAAATTAATATAGTTAAAGCACATAGAACAGCACTCGACACAGAGT
 GAGCACTTGGCAACTGTTAGCTGTTACTAACCTTTCCCATTTCTTCTCCAAACCTATTCCAA
 CTATCTGAATCATGTGCCCTTCTCTGTGAACCTCTATCATAATACTTGTACACTGTATTG
 30 TAATTGTCTCTTTTACTTTCCCTTGTATCTTTGTGCATAGCAGAGTACCTGAAACAGGAAG
 TATTTTAAATATTTTGAATCAAATGAGTTAATAGAATCTTTACAAATAAGAATATACACTTCTG
 CTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATG
 ATGGGTTTTATTTCAG

35 TABLA 1. gRNA de cribado de Indel con sus correspondientes tasas de Indel y de supervivencia de las células.

5

10

15

20

25

30

35

ID del gRNA	Secuencias espaciadoras del gRNA	Tasas de INDEL (%)	SD (%)	Tasas de supervivencia de las células (%)	SD (%)	SEQ ID NO:
Sin SgRNA	NO PROCEDE – Control negativo	2,0	1,3	100,0	0,4	
VEGFA	CCAUUCCCUCUUUAGCCAGAGC	89,6	0,6	93,7	1,8	39
278	UGGCGAGCAUUCAUAACUUA	0,8	0,8	98,4	1,4	40
306	GUUCUGGUUAAGAAUGGAUAA	2,4	1,7	96,7	1,2	41
315	AAAUGUCUGUUCUGGUUAGA	5,2	3,6	95,5	0,9	42
320	UGAAAAAUGUCUGUUCUGGUU	4,3	0,6	89,0	3,0	43
505	AUAGUUUUUUGAGGAAAUACAU	4,8	1,9	88,5	2,5	44
550	CCAGGUUAAGUUGUUCUAGGG	1,8	0,3	96,5	2,5	45
555	AUAUGCCAGGUUAAGUUGUUCU	1,9	0,7	94,4	2,2	46
664	AGAAGACUUUGUAGUGAUCUUC	3,3	0,6	93,8	1,7	47
781	AUGAGAAAGAGCUUUCUAGUAU	2,7	0,6	93,6	3,1	48
1119	UAUUGAUAAAUAUUGCCUUC	3,0	0,3	96,1	3,3	49
1159	AGAUGAGGAGAACCAUAUUUUG	3,5	1,0	94,4	1,6	50
1220**	ACCCAGCCUGACACCAAUAUA	33,4	4,7	92,6	2,1	51
1229	ACUCAAUAAAUUUGGUGUCAAG	7,0	0,9	90,8	3,1	52

5

10

15

20

25

30

35

1760	AUAAGUUAGCAAUGGUCUAA AC	4,4	1,9	86,0	3,8	53
1799	AAAAGGUAGUAAUUGUGUUU CA	2,9	1,2	87,5	1,9	54
1829	GAAUUGAUCUUGAAGACAUA CG	3,5	0,3	97,9	1,3	55
1853*	AGCUAUUUUUGCACAUCUAU CA	8,9	0,8	96,6	0,4	56
1869	GAUAGAUGUGCAAAAAUAGC UU	4,9	0,9	96,4	2,0	57
1893	AAAUUUAAUUGCCAGUAAGU CU	5,3	0,8	95,3	2,0	58
1989	UUAUGAAAAGCAGCUAUGAA GG	5,7	1,0	92,6	1,7	59
2017	UAGAGGAAGGCAGUGGUCCC UU	3,7	0,4	92,0	2,0	60
2068**	UACUAAAAGGCAGCCUCCUA GA	35,0	4,1	93,4	3,5	61
2088	GAGGCUGCCUUUUAGUAGUA UU	6,4	0,4	97,5	2,7	62
2144	AAGAUCUAGCUAAAAUUAAG A	3,8	0,3	100,6	1,0	63
2197*	ACAAAUUACCAAUUGUAUU GA	36,3	4,9	93,2	1,7	64
2272	CAUAAGAUCUCUGCAAACAU AU	5,3	0,3	96,1	1,1.	65
2327	CACUGCUUUCAGGAGCCAAA AA	3,2	0,3	97,9	2,2	66
2351	GGGUGGGGGAGCCCCAUAAA UG	5,9	1,0	95,9	3,0	67
2360*	AGCCCCAUAAUUGUUGAAUA AU	18,8	2,9	94,4	2,5	68
2431*	UCAGCCAAUAAAAGGUUUGU UA	31,6	2,9	94,4	1,4	69
2451	GGUUUGUUAAGAAUGACUG UG	5,8	1,8	91,3	3,3	70

5	2476*	AUGAUUACUCUUAAGUGAA UA	36,1	5,8	94,3	1,5	71
	2697*	GCCUAGAUGAUUUAUAAUAG GG	16,6	2,9	89,3	1,8	72
	2698	GCCUAGAUGAUUUAUAAUAG GG	7,2	0,2	88,1	1,3	73
10	2717	UUAUAAUCAUCUAGGCUGC AA	3,8	0,2	90,1	3,6	74
	2756	CUAGGCACUUGUUGACAGUC CU	4,9	0,5	94,3	1,4	75
	2878*	GUCUUGCGCUUAUGAAACUU CC	12,5	2,0	94,1	3,0	76
15	2908*	UUUUAGUGAAGCAAUAUUAG UA	28,6	4,6	94,4	5,1	77
	2923	AUUAGUAUAGAAUUUUGCAU CA	2,3	0,6	95,6	1,2	78
	2972*	UAUGGCAUCUCACCAGUGUG UG	29,0	6,1	86,9	2,8	79
20	3042*	AUAAUAGAGACAAGGUGGUG UC	14,9	3,1	88,8	1,9	80
	3079*	UGAUCAUUGCCUCACUAUGG UA	24,0	6,0	87,4	1,1	81
	3106	ACAUUAGAGUCCCAGUUAUU AC	5,7	1,0	92,0	2,4	82
25	3122	UAAUAAACUGGGACUCAUUG UA	4,5	0,6	90,8	4,4	83
	3125*	GCUAAUAGCUUAUUCUAUAC AU	38,5	2,9	91,9	3,1	84
	3614	UUCUUAUUACAUGGGAAAAA AU	2,0	0,7	95,0	2,1	85
30	3630	UUCAGAUUUUUUCCCAUGUA AU	3,1	1,2	95,1	2,8	86
	3687	UGUUACAUGACCUUCCUUUC UU	1,5	0,8	91,6	4,2	87
	3821**	AUUGGCUACCUUGGUUGGAU GA	54,8	3,6	80,1	4,1	88

5	3829*	UUACCUGGAUUGGCUACCUU GG	7,6	0,6	95,2	3,2	89
	3922	UUGUUACAUA AAAAGAGAGG UG	1,8	0,1	97,3	0,9	90
	4000	AUAUGUGCAAGUCCUCUGUG CU	2,8	0,6	97,2	1,9	91
	4025	ACUUGCACAUAUGUUCAGAC UG	7,3	0,6	95,3	3,7	92
10	4195*	GGUGAGGGUCUCUCUAAGGU GU	23,8	3,3	96,1	4,5	93
	4215*	UUCUCACAUGGCAGAAAGGG GU	34,6	2,4	86,1	2,1	94
15	4254	AGCAGGAAGACAGCUGGCUA UC	5,9	0,9	94,4	4,5	95
	4262**	GACAGCUGGCUAUCCAGGAU UC	82,4	1,9	90,8	5,1	96
20	4264	UCUGCUAAGAGACUCCUGAA UC	1,6	0,6	101,0	2,7	97
	4271*	AUUUGGGUCUGCUAAGAGAC UC	42,0	1,4	97,0	2,7	98
	4463	CAUAGAAUAUCCA UCCAUAU GA	6,6	0,8	102,2	2,7	99
	4470	UGCAUAGUAUUCUAUCAUAU GG	4,1	0,2	101,6	1,4	100
25	4482	UGGAUGGAUAUUCUAUGAUA UA	3,0	0,6	99,4	1,6	101
	4692*	AUUUAGAGUGUAUGGCAUGA GU	28,2	3,6	92,6	3,4	102
30	4698*	CACUCUAUUUAGAGUGUAUG GC	30,1	3,3	94,4	3,4	103
	4706*	UACUCAUGCCAUACACUCUA AA	29,9	1,7	91,5	2,4	104
35	4711*	GUGGGGAAAUCAGCACUCUA UU	11,6	1,3	94,6	3,4	105
	4861	AUCAUUUCAACUUAUACACA GG	3,8	1,1	93,2	3,7	106

5	4889*	UUCUCUCUAUAUAAAGUGAU CC	15,3	2,0	96,3	2,2	107
	4947	CAUUAGGAAAAUGUACAAAG GA	2,3	0,4	101,0	4,1	108
	5041**	ACUUGCAGGAGGUGAGGGAU UA	89,4	1,7	97,1	3,6	109
	5052**	AUUAGGGAAUGCAGACUCUG GG	45,9	1,9	88,6	1,7	110
10	5057*	CUGCUACUUGGAAGACUCUU CC	46,6	3,8	95,4	1,6	111
	5169*	GGCUGGCAUAGAGUAAGACA GG	29,9	3,1	96,8	2,1	112
15	5211	GAAGUAAUCGGCGUGGAGG UA	2,2	0,4	96,6	1,7	113
	5278**	UGGGUGAGAUUAGAGGCCAC UG	43,4	2,7	90,6	3,0	114
	5343**	UGCUUCCUCCCUUGUCUCCC UA	52,2	5,4	92,4	2,5	115
20	5426*	ACUAUACUACUUCCACUACU AC	40,8	2,9	95,7	1,9	116
	5491	UUCAACUUAUCCAUUAAUCC UA	7,2	1,2	94,4	2,5	117
25	5492*	GAAGGAAGAUCCAUAAGGAU UA	18,5	2,4	95,3	2,8	118
	5538**	UGGCAUAUGAGAAAAGUCAC AG	72,4	1,0	92,4	1,6	119
30	5628	AAGAUAUUGGGAGAAACAGG UU	3,5	0,4	99,9	2,9	120
	5683*	UACAUCCAACUAACAUCUCUA U	18,6	2,1	94,4	1,9	121
	5689	GACAUCCAAAUAAGAGAUGUU AG	7,3	0,8	96,2	1,8	122
35	5744	GGCUGGUAGUGUGAAGAUG GGG	1,4	0,3	92,5	3,0	123
	5766	UUCUUAUCAACCCUCUUUCC UU	1,2	0,1	97,5	3,2	124

5

10

15

20

25

30

35

5793	AAGAGGGUUGAUAAGAAGAG AA	1,5	0,1	95,1	2,5	125
5801*	UGAUAAGAAGAGAAAGGGGU GU	13,8	2,6	102,9	5,1	126
5825	CACCUCUUAACCUCUAAUA CU	2,6	0,2	94,3	2,7	127
5837*	CUAAGUAUUAGAGGUUAAGG AG	19,8	2,6	92,0	0,5	128
5896*	UCUGAGAAGACAAAGCUAGU GA	25,9	1,1	99,9	3,6	129
5913	CUGCUUGACAUCAGUUGGGU UC	5,5	0,9	98,7	1,9	130
5921	ACACCCUUCUGCUUGACAUC AG	7,2	1,4	96,9	2,5	131
5928*	GAACCCAACUGAUGUCAAGC AG	18,1	2,8	91,4	2,0	132
6029*	CUACUAUUGCUUUCAUUAAG UC	13,0	0,6	91,6	3,3	133
6061	AGUAGAGAAGGUCAAACUUG AC	1,3	0,5	94,8	3,6	134
6083	ACUUGACCAGAAUGAAAUA GA	2,9	0,2	99,8	3,0	135
6138*	GUGGACUCCAGGAGUAUAUC AA	8,6	0,7	98,8	2,3	136
6150**	CCUUAUUCUUUUGAUUAUCU CC	44,8	5,3	93,3	2,4	137
6151*	AUUGUAUUAGCAAGUGGACU CC	22,1	0,9	89,9	1,5	138
6286*	GUUUUCUAGGCUAGACAGU UU	47,2	2,2	93,8	1,8	139
6460*	CUUUACUGUGAAUGGUGCCA GG	9,0	2,1	95,8	2,1	140
6603	UAUUACGGUAAGCUCAAGCA UU	1,9	0,4	97,3	1,5	141
7055*	CUUAACUACUAAUAGCCUAU UG	16,4	2,1	84,1	3,3	142

5	7152*	ACCCCUAACCUUCAUGUUGA UA	16,2	1,2	94,6	2,1	143
	7625	AAUAGCACUGGAGUUACCUG UU	5,1	0,3	94,1	3,6	144
	7652	UUUUUUUUCCAAGCGGUCCC UU	6,1	0,6	95,2	3,7	145
	8379	UGGAAAUGUUAAAUUUUCC CU	0,9	0,2	99,3	4,1	146
10	8519	UACUUGCUCUCUGACCACAU AA	3,0	0,3	98,2	2,3	147
	8541	CUAAUCUAUUAAUAGAAACUA C	5,3	0,6	92,6	4,3	148
15	8600	AGAUGUAGAAGACCUGAAUA UC	2,8	0,3	97,2	4,1	149
	8784	AAGAAAAGGCUCUUUAUAAU GC	4,7	0,2	98,1	1,9	150
20	8922*	UAAAAGAGACACACCUGAAAGC A	27,6	2,5	90,0	3,8	151
	9000	UGAAGUCUUUCCUCUUAUU AG	2,8	0,6	94,1	2,5	152
	9468	AUAUUAGUGAACUAGAGUCA CA	1,5	0,2	98,4	2,2	153
	9478*	AUCAGAGCUCUAUUUAGUGA AC	28,8	4,6	93,7	1,4	154
25	10303	AGCACAUAGAACAGCACUCG AC	0,0	0,0	99,7	1,2	155
	10308*	GUUGCCAAGUGCUCACUCUG UG	21,7	5,3	84,9	2,7	156
30	10375*	CCUCCAAACCUAUUCCAACU AU	18,1	5,5	92,8	1,0	157
	10377	AGGGGCACAUGAUUCAGAU GU	1,0	0,7	95,6	1,9	158

35 **Nota:** Las tasas de Indel y de supervivencia de las células representan la media de 2 experimentos independientes donde cada sgRNA se analizó por triplicado. Cada sgRNA contiene una secuencia espaciadora única de 22 nucleótidos seguida de una secuencia de andamiaje común de 80 nucleótidos. Secuencia de andamiaje del gRNA (5' – 3'):

GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCG
UCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 12)

* Los gRNA con tasas de indel por encima del umbral de 7,5 % se consideraron resultados positivos. El valor umbral se determinó agregando 4 SD a la media de control negativo.

5 ** Se seleccionaron 10 gRNA candidatos para un análisis adicional en función de la ubicación, el porcentaje de indel y las tasas de supervivencia de las células.

Diseño de construcción de donador de AAV de superexones del CFTR y transducción de AAV La construcción de donador de AAV del intrón 10 del CFTR de transducción de AAV
10 contenía: (i) brazos de homología izquierdo y derecho con una longitud de 500 nucleótidos en relación con el sitio de corte del gRNA, (ii) un sitio de empalme aceptor, (iii) cDNA del gen CFTR de tipo silvestre desde el exón 11 hasta el 27, y (iv) una secuencia de parada y poliadenilación. Las preparaciones de donador de AAV se realizaron mediante el uso de un serotipo AAV6, purificado y valorado por Vector Biolabs. La valoración de AAV se expresó en genomas virales
15 por mL. Las transducciones de AAV se realizaron mediante la adición del vector AAV6 en células en copias del genoma del vector especificado por célula durante 36 horas a 37 °C.

Electroporación: las electroporaciones se realizaron mediante el uso del sistema de Lonza 4D-Nucleofector™ acoplado a un sistema de lanzadera de 96 pocillos. $1,8 \times 10^5$ células
20 LPC se resuspendieron en 20 µL de tampón de electroporación P4 de Lonza (V4SP-4096). Se combinaron 20 µL de mezcla de células con 2 µL de mezcla de reactivo CRISPR-Cas9 que contenía 1 µg de mRNA de saCAS9 y 1 µg de gRNA. Se transfirieron 20 µL de célula y mezcla de CRISPR-Cas9 a un pocillo de una placa de electroporación de 96 pocillos. Las células se sometieron a electroporación mediante el uso del programa CM-138. Se transfirió una fracción
25 de células LPC electroporadas a un pocillo de una placa de 384 pocillos o una placa de 96 pocillos para ALI que contenía medio de cultivo de LPC. Las células se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %

Aislamiento de ADN genómico: el ADN genómico se aisló mediante la incubación de
30 células durante 30 min a 37 °C con 50 µL y 15 µL de solución Quick extract de ADN (Epicentre) por pocillo de una placa de 96 pocillos y de 384 pocillos, respectivamente. El extracto celular se mezcló y se transfirió a una placa de PCR de 96 pocillos y después se incubó durante 6 min a 65 °C y 2 min a 98 °C. El ADN genómico se utilizó inmediatamente en aplicaciones posteriores o se almacenó a 4 °C.

35

Determinación de las tasas de INDEL para el cribado de gRNA del intrón de CFTR: se utilizó el kit PrimeSTAR de PCR de largo alcance (R045B, TAKARA) para amplificar un fragmento de ADN de 12 Kb correspondiente al intrón 10 de CFTR. Las reacciones de PCR se

llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se combinaron 2,5 µL de solución de ADN genómico con 47,5 µL de mezcla maestra PrimeSTAR que contenía dNTPS, tampón 5xGXL, polimerasa GXL y los cebadores directos e inversos del intrón 10 de CFTR correspondientes (CFTR de 12 Kb F3: GCTACCAGTGTGATGGAGTAG (SEQ ID NO: 160) y CFTR de 12 Kb R3: AGCCAGGGATACAATATCTTCACAA (SEQ ID NO: 161) a 250 nM cada uno). Las reacciones de PCR se realizaron mediante el uso del siguiente protocolo de ciclos de temperatura: 1) 94 °C 30s; 2), 94 °C 10s; 3), 68 °C 10 min; 4) repetición de los pasos 2-3 32 veces.

Las reacciones de PCR para el control positivo de VEGFA se realizaron mediante el uso del kit Phire Green Hot Start II PCR Master Mix (F126L, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se combinaron 1,5 µL de solución de ADN genómico con 18,5 µL de mezcla maestra Phire con el par de cebadores directos e inversos de VEGFA correspondientes (VEGFA-F1: CCAGTCACTGACTAACCCCG (SEQ ID NO: 162) y VEGFA-R1: ACTCTGTCCAGAGACACGCG (SEQ ID NO: 163) a 625 nM cada uno). Las reacciones de PCR se realizaron mediante el uso del siguiente protocolo de ciclos de temperatura: 1) 98 °C 30s; 2) 98 °C 5s; 3) 60 °C 5s; 4) 72 °C 10s 5) repetición de los pasos 2-4 35 veces; 6), 72 °C 4 min.

Los productos del PCR se purificaron enzimáticamente y los productos del PCR del intrón 10 de CFTR se amplificaron mediante el uso de amplificación por círculo rodante (RCA, por sus siglas en inglés) en GENEWIZ. Las muestras de ADN fueron secuenciadas con el método de Sanger mediante el uso de cebadores de secuenciación que se unen cerca del sitio de corte del sgRNA analizado (TABLA 2). Cada cromatograma de secuenciación se analizó mediante el uso del software TIDE con las secuencias de referencia (tide.nki.nl). Las secuencias de referencia se obtuvieron a partir de muestras electroporadas simuladas. Los parámetros de tide se establecieron para cubrir un espectro de indel de +/- 30 nucleótidos del sitio de corte del gRNA y la ventana de descomposición se estableció para cubrir la mayor ventana posible con trazas de alta calidad. Las tasas de indel (inserciones y eliminaciones) totales se obtuvieron directamente a partir de los gráficos de TIDE. Se utilizó el software GraphPad Prism 7 para hacer Gráficos y calcular toda la Información estadística.

TABLA 2. Cebadores de secuenciación para el cribado de gRNA de indel de CFTR y control de referencia de VEGFA.

ID del gRNA	Nombre del cebador	Secuencia	Protocolo de secuenciación	SEQ ID NO:
VEGFA	VEGFA-F1	CCAGTCACTGACTAACCCCG	Secuenciación estándar	164

5

10

15

20

25

30

35

278	CFTR-F1	AACTTCTAATGGTGATGAC AGCC	RCA secuenciación estándar	+	165
306	CFTR-R1	GTCATGATTTTCCTGGACC AGC	RCA secuenciación estándar	+	166
315	CFTR-R1	GTCATGATTTTCCTGGACC AGC	RCA secuenciación estándar	+	167
320	CFTR-R1	GTCATGATTTTCCTGGACC AGC	RCA secuenciación estándar	+	168
505	CFTR-R1	GTCATGATTTTCCTGGACC AGC	RCA secuenciación estándar	+	169
550	CFTR-R1	GTCATGATTTTCCTGGACC AGC	RCA secuenciación estándar	+	170
555	CFTR-R1	GTCATGATTTTCCTGGACC AGC	RCA secuenciación estándar	+	171
664	CFTR-R2	GGGTACAGTGGTGCAATC ATGG	RCA secuenciación estándar	+	172
781	CFTR-R2	GGGTACAGTGGTGCAATC ATGG	RCA secuenciación estándar	+	173
1119	CFTR-R2	GGGTACAGTGGTGCAATC ATGG	RCA secuenciación estándar	+	174
1159	CFTR-R2	GGGTACAGTGGTGCAATC ATGG	RCA secuenciación estándar	+	175
1220**	CFTR-R2	GGGTACAGTGGTGCAATC ATGG	RCA secuenciación estándar	+	176

5

10

15

20

25

30

35

1229	CFTR-R2	GGGTACAGTGGTGCAATC ATGG	RCA secuenciación estándar	+	177
1760	CFTR-R3	AAAAGGCAGCCTCCTAGA TTGA	RCA secuenciación estándar	+	178
1799	CFTR-R3	AAAAGGCAGCCTCCTAGA TTGA	RCA secuenciación estándar	+	179
1829	CFTR-R3	AAAAGGCAGCCTCCTAGA TTGA	RCA secuenciación estándar	+	180
1853*	CFTR-R3	AAAAGGCAGCCTCCTAGA TTGA	RCA secuenciación estándar	+	181
1869	CFTR-R3	AAAAGGCAGCCTCCTAGA TTGA	RCA secuenciación estándar	+	182
1893	CFTR-R3	AAAAGGCAGCCTCCTAGA TTGA	RCA secuenciación estándar	+	183
1989	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATC AATTCT	RCA secuenciación estándar	+	184
2017	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATC AATTCT	RCA secuenciación estándar	+	185
2068**	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATC AATTCT	RCA secuenciación estándar	+	186
2088	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATC AATTCT	RCA secuenciación estándar	+	187
2144	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATC AATTCT	RCA secuenciación estándar	+	188

5

10

15

20

25

30

35

2197*	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATC AATTCT	RCA secuenciación estándar	+	189
2272	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATC AATTCT	RCA secuenciación estándar	+	190
2327	CFTR-F5	TTGGACAAAAGATCTAGCT AAAATATAAGATTGA	RCA secuenciación estándar	+	191
2351	CFTR-F5	TTGGACAAAAGATCTAGCT AAAATATAAGATTGA	RCA secuenciación estándar	+	192
2360*	CFTR-F5	TTGGACAAAAGATCTAGCT AAAATATAAGATTGA	RCA secuenciación estándar	+	193
2431*	CFTR-F5	TTGGACAAAAGATCTAGCT AAAATATAAGATTGA	RCA secuenciación estándar	+	194
2451	CFTR-F5	TTGGACAAAAGATCTAGCT AAAATATAAGATTGA	RCA secuenciación estándar	+	195
2476*	CFTR-F5	TTGGACAAAAGATCTAGCT AAAATATAAGATTGA	RCA secuenciación estándar	+	196
2697*	CFTR-R5	GGCATCCAGTGATGCAAA ATTCTATAC	RCA secuenciación estándar	+	197
2698	CFTR-R5	GGCATCCAGTGATGCAAA ATTCTATAC	RCA secuenciación estándar	+	198
2717	CFTR-R5	GGCATCCAGTGATGCAAA ATTCTATAC	RCA secuenciación estándar	+	199
2756	CFTR-R5	GGCATCCAGTGATGCAAA ATTCTATAC	RCA secuenciación estándar	+	200

5

10

15

20

25

30

35

2878*	CFTR-F6	AGTTGTTATCTCTGAAATT TTGGGT	RCA secuenciación estándar	+	201
2908*	CFTR-F6	AGTTGTTATCTCTGAAATT TTGGGT	RCA secuenciación estándar	+	202
2923	CFTR-F6	AGTTGTTATCTCTGAAATT TTGGGT	RCA secuenciación estándar	+	203
2972*	CFTR-F6	AGTTGTTATCTCTGAAATT TTGGGT	RCA secuenciación estándar	+	204
3042*	CFTR-R6	ACAATATAGCTCTGATAAT CCAGGT	RCA secuenciación estándar	+	205
3079*	CFTR-R6	ACAATATAGCTCTGATAAT CCAGGT	RCA secuenciación estándar	+	206
3106	CFTR-R6	ACAATATAGCTCTGATAAT CCAGGT	RCA secuenciación estándar	+	207
3122	CFTR-R6	ACAATATAGCTCTGATAAT CCAGGT	RCA secuenciación estándar	+	208
3125*	CFTR-R6	ACAATATAGCTCTGATAAT CCAGGT	RCA secuenciación estándar	+	209
3614	CFTR- R6B	CCCCACCCTGCAATACCA	RCA secuenciación estándar	+	210
3630	CFTR- R6B	CCCCACCCTGCAATACCA	RCA secuenciación estándar	+	211
3687	CFTR- R6B	CCCCACCCTGCAATACCA	RCA secuenciación estándar	+	212

5

10

15

20

25

30

35

3821**	CFTR-R6B	CCCCACCCTGCAATACCA	RCA + secuenciación estándar	213
3829*	CFTR-R6B	CCCCACCCTGCAATACCA	RCA + secuenciación estándar	214
3922	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	Protocolo RCA – rico en GC	215
4000	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	Protocolo RCA – rico en GC	216
4025	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	Protocolo RCA – rico en GC	217
4195*	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	Protocolo RCA – rico en GC	218
4215*	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	Protocolo RCA – rico en GC	219
4254	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	Protocolo RCA – rico en GC	220
4262**	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	Protocolo RCA – rico en GC	221
4264	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	Protocolo RCA – rico en GC	222
4271*	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	Protocolo RCA – rico en GC	223
4463	CFTR-R7	GCTGTGGGGAAATCAGCA	RCA + secuenciación estándar	224
4470	CFTR-R7	GCTGTGGGGAAATCAGCA	RCA + secuenciación estándar	225
4482	CFTR-R7	GCTGTGGGGAAATCAGCA	RCA + secuenciación estándar	226
4692*	CFTR-F8	TGCACACACATTTAAATAG ATGCATAGT	RCA + secuenciación estándar	227

5

10

15

20

25

30

35

4698*	CFTR-F8	TGCACACACATTTAAATAG ATGCATAGT	RCA secuenciación estándar	+	228
4706*	CFTR-F8	TGCACACACATTTAAATAG ATGCATAGT	RCA secuenciación estándar	+	229
4711*	CFTR-F8	TGCACACACATTTAAATAG ATGCATAGT	RCA secuenciación estándar	+	230
4861	CFTR-F8	TGCACACACATTTAAATAG ATGCATAGT	RCA secuenciación estándar	+	231
4889*	CFTR-F8	TGCACACACATTTAAATAG ATGCATAGT	RCA secuenciación estándar	+	232
4947	CFTR-R8	TTGCCTGAACTGGCACAA T	RCA secuenciación estándar	+	233
5041**	CFTR-R8	TTGCCTGAACTGGCACAA T	RCA secuenciación estándar	+	234
5052**	CFTR-R8	TTGCCTGAACTGGCACAA T	RCA secuenciación estándar	+	235
5057*	CFTR-R8	TTGCCTGAACTGGCACAA T	RCA secuenciación estándar	+	236
5169*	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGAT T	RCA secuenciación estándar	+	237
5211	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGAT T	RCA secuenciación estándar	+	238
5278**	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGAT T	RCA secuenciación estándar	+	239

5

10

15

20

25

30

35

5343**	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGAT T	RCA secuenciación estándar	+	240
5426*	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGAT T	RCA secuenciación estándar	+	241
5491	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGAT T	RCA secuenciación estándar	+	242
5492*	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGAT T	RCA secuenciación estándar	+	243
5538**	CFTR-R9	TCAGTTGGGTTCCGGGAT A	RCA secuenciación estándar	+	244
5628	CFTR-R9	TCAGTTGGGTTCCGGGAT A	RCA secuenciación estándar	+	245
5683*	CFTR-R9	TCAGTTGGGTTCCGGGAT A	RCA secuenciación estándar	+	246
5689	CFTR-R9	TCAGTTGGGTTCCGGGAT A	RCA secuenciación estándar	+	247
5744	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAG ATGATTCCAAG	RCA secuenciación estándar	+	248
5766	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAG ATGATTCCAAG	RCA secuenciación estándar	+	249
5793	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAG ATGATTCCAAG	RCA secuenciación estándar	+	250
5801*	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAG ATGATTCCAAG	RCA secuenciación estándar	+	251

5

10

15

20

25

30

35

5825	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAG ATGATTCCAAG	RCA secuenciación estándar	+	252
5837*	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAG ATGATTCCAAG	RCA secuenciación estándar	+	253
5896*	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAG ATGATTCCAAG	RCA secuenciación estándar	+	254
5913	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAG ATGATTCCAAG	RCA secuenciación estándar	+	255
5921	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAG ATGATTCCAAG	RCA secuenciación estándar	+	256
5928*	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAG ATGATTCCAAG	RCA secuenciación estándar	+	257
6029*	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGT GTAAAGT	RCA secuenciación estándar	+	258
6061	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGT GTAAAGT	RCA secuenciación estándar	+	259
6083	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGT GTAAAGT	RCA secuenciación estándar	+	260
6138*	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGT GTAAAGT	RCA secuenciación estándar	+	261
6150**	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGT GTAAAGT	RCA secuenciación estándar	+	262
6151*	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGT GTAAAGT	RCA secuenciación estándar	+	263

5

10

15

20

25

30

35

6286*	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGT GTTAAGT	RCA secuenciación estándar	+	264
6460*	CFTR-F11	TACAGGCTTGAAGTGCAT GG	RCA secuenciación estándar	+	265
6603	CFTR-F11	TACAGGCTTGAAGTGCAT GG	RCA secuenciación estándar	+	266
7055*	CFTR-F12	CCACTAGTGATGCACGGA AA	RCA secuenciación estándar	+	267
7152*	CFTR-F12	CCACTAGTGATGCACGGA AA	RCA secuenciación estándar	+	268
7625	CFTR-F20	CTCTGCCTCCCGGGCTCA AG	RCA secuenciación estándar	+	269
7652	CFTR-F20	CTCTGCCTCCCGGGCTCA AG	RCA secuenciación estándar	+	270
8379	CFTR-F13	AGCTGTGCATTTTCCTCTG G	RCA secuenciación estándar	+	271
8519	CFTR-F13	AGCTGTGCATTTTCCTCTG G	RCA secuenciación estándar	+	272
8541	CFTR-F13	AGCTGTGCATTTTCCTCTG G	RCA secuenciación estándar	+	273
8600	CFTR-F13	AGCTGTGCATTTTCCTCTG G	RCA secuenciación estándar	+	274
8784	CFTR-R13	TCTGTTAATGGCAAAGCAA GTAGAA	RCA secuenciación estándar	+	275

	8922*	CFTR-R13	TCTGTTAATGGCAAAGCAA GTAGAA	RCA secuenciación estándar	+	276
5	9000	CFTR-R13	TCTGTTAATGGCAAAGCAA GTAGAA	RCA secuenciación estándar	+	277
	9468	CFTR-F14	GATGGGTAAAGCCAACTG AAAA	RCA secuenciación estándar	+	278
10	9478*	CFTR-F14	GATGGGTAAAGCCAACTG AAAA	RCA secuenciación estándar	+	279
	10303	CFTR-R15	ATTCACCTGCCTCCAATTA TCATCCT	RCA secuenciación estándar	+	280
15	10308*	CFTR-R15	ATTCACCTGCCTCCAATTA TCATCCT	RCA secuenciación estándar	+	281
	10375*	CFTR-R15	ATTCACCTGCCTCCAATTA TCATCCT	RCA secuenciación estándar	+	282
20	10377	CFTR-R15	ATTCACCTGCCTCCAATTA TCATCCT	RCA secuenciación estándar	+	283
25						

Determinación de las tasas de inserción de superexones de CFTR mediante PCR digital en nanogotas (ddPCR, por sus siglas en inglés): la inserción del superexón 10 de CFTR mediada por HDR se evaluó mediante ddPCR (QX200, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se realizaron ensayos de ddPCR múltiple para determinar específicamente la cantidad de alelos editados mediante HDR en comparación con el total de alelos presentes en la muestra. Se utilizó el recuento de alelos de GAPDH para determinar el número total de alelos amplificados mediante ddPCR. Se realizaron ddPCR (ensayo 1x: 900 nM de cebadores y 250 nM cada sonda) mediante el uso de 2 sondas para ddPCR por ensayo (IDT, Inc.). Una sonda marcada con FAM era específica para alelos editados mediante HDR con un cebador situado fuera de la región de coincidencia del molde del superexón de CFTR para evitar la amplificación del donador molde. La segunda sonda marcada con HEX y el par de cebadores eran específicos para GAPDH. Los ensayos de ddPCR se ensamblaron y las nanogotas se generaron mediante un generador automático de nanogotas

(Bio-Rad). Los ensayos de ddPCR se realizaron mediante el uso de una supermezcla ddPCR para sondas (sin dUTP) mediante el uso del siguiente protocolo de ciclos de temperatura: 1) 95 °C 5min; 2), 94 °C 30s; 3), 58 °C 1min; 4), 72 °C 3min; 5) repetición de los pasos 2-4 39 veces; 6), 98 °C 5 min, con todos los pasos con aumentos de 2 °C/s. Para la cuantificación se utilizó QuantaSoft (Bio-Rad). La fracción de nanogotas positivas correspondientes a los canales de fluorescencia FAM y HEX determina la cantidad de alelos editados mediante HDR y de GAPDH, respectivamente. El porcentaje de alelos editados mediante HDR se calculó en comparación con los alelos de GAPDH que representan el 100 % de los alelos amplificados en la muestra. QuantaSoft calculó los intervalos de confianza para cada pocillo según la distribución de Poisson. Las secuencias de cebadores y sondas se muestran en la TABLA 3 y la TABLA 4.

TABLA 3. Cebadores y sondas para ensayos de ddPCR del intrón 10 de CFTR.

gRNA	Lado	Cebador directo	SEQ ID NO:	Cebador inverso	SEQ ID NO:	Sonda de ddPCR (FAM)	SEQ ID NO:
1220**	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCT CAC	284	ACCACTGCC TTCCTCTAAC TC	285	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	286
	5'	CACATGGCG AGCATTCAAT AAC	287	AGGCATGAT CCATGAGAA CTG	288	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	289
2068	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCT CAC	290	GGAAGTTTC ATAAGCGCA AGAC	291	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	292
	5'	AGAAAGACT CCTGAAAGG CA	293	AGGCATGAT CCATGAGAA CTG	294	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	295
3821	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCT CAC	296	GAGTGTATG GCATGAGTA CGAAT	297	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	298

5

10

15

20

25

30

35

	5'	AATTCCTGA CACCACCTT GTCTC	299	AGGCATGAT CCATGAGAA CTG	300	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	301
4262	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCT CAC	302	ACCCTCCCT GTCTTACTCT ATG	303	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	304
	5'	ATGCATATAT ATATTTTAA CCTGGATTA TCAGAGC	305	AGGCATGAT CCATGAGAA CTG	306	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	307
5041	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCT CAC	308	CTTCACCCA CCTCCTTAA CC	309	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	310
5052	5'	GTGAGAACA CAGCAGGAA GAC	311	AGGCATGAT CCATGAGAA CTG	312	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	313
5278	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCT CAC	314	AGGCATCAA TGGTTGTCT GTATT	315	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	316
5343	5'	ACTTCCCAG CCTCCAGAA CT	317	AGGCATGAT CCATGAGAA CTG	318	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	319
5538	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCT CAC	320	GTAGGGTAG GTGTTAGTG TGTGTTAAG	321	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	322
	5'	GAGTGCTGA TTTCCCCAC AG	323	AGGCATGAT CCATGAGAA CTG	324	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	325

6150	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCT CAC	326	AGCTGCACT GATGGTTTC A	327	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	328
	5'	TAGGGAGAC AAGGGAGGA AG	329	AGGCATGAT CCATGAGAA CTG	330	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	331

TABLA 4. Cebadores y sondas para GAPDH (ensayo de referencia para determinar el número total de alelos).

	Cebador directo	SEQ ID NO:	Cebador inverso	SEQ ID NO:	Sonda de ddPCR (HEX)	SEQ ID NO:
GAPDH	TGGAAGACAG AATGGAAGAA AT	332	GTCAGGTCC ACCACTGA	333	CCCCCACC ATAGGCGAGAT CCC	334

Determinación de las tasas de supervivencia de las células LPC: las células se incubaron con 5 µg/mL de Hoechst 33342 (Life technologies: H3570) y 0,5 µg/mL de yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés; Life technologies: P3566) en medios de cultivo durante 1 hora a 37 °C. Se tomaron imágenes de las células para determinar los eventos positivos para Hoescht (células vivas y muertas) y los eventos positivos para PI (células muertas) mediante el uso de un sistema de imágenes de alto contenido (Molecular devices). La tasa de supervivencia de las células relativa se calculó de la siguiente manera: [(eventos Hoescht+ - eventos PI+) de la muestra] / (eventos Hoescht+ - eventos PI+) del control] * 100. El control fueron células transfectadas simuladas y su tasa de supervivencia de las células se estableció arbitrariamente en 100 %.

Determinación de la función de CFTR en HBE: mediante el uso de cámaras se realizaron experimentos en células epiteliales de las vías respiratorias polarizadas que expresan dF508del para evaluar la eficacia funcional de las células editadas genéticamente. Se cultivaron HBE derivadas de LPC en insertos de cultivo celular Costar® Snapwell™ y se montaron en una cámara Ussing (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA). Se determinó la resistencia transepitelial y la corriente de cortocircuito en presencia de un gradiente de cloruro de dirección basolateral a apical (Isc) mediante el uso de un sistema de pinza de voltaje (Departamento de Bioingeniería, University of Iowa, IA). En resumen, las HBE derivadas de LPC se examinaron en

condiciones de registro de pinza de voltaje (fijación de voltaje $V_{hold} = 0$ mV) a 37 °C. La solución basolateral contenía (en mM) 145 de NaCl, 0,83 de K_2HPO_4 , 3,3 de KH_2PO_4 , 1,2 de $MgCl_2$, 1,2 de $CaCl_2$, 10 de glucosa, 10 de HEPES (pH ajustado a 7,35 con NaOH) y la solución apical contenía (en mM) 145 de gluconato de Na, 1,2 de $MgCl_2$, 1,2 de $CaCl_2$, 10 de glucosa, 10 de HEPES (pH ajustado a 7,35 con NaOH). Los controles positivos para la función de CFTR fueron células dF508del tratadas con cóctel de moduladores de CFTR (TC) en el lado basolateral durante 18-24 h antes del ensayo. Los controles negativos fueron células tratadas con DMSO. Se añadió forskolina (10 μ M) al lado apical durante el ensayo para estimular el transporte de cloruro mediado por CFTR. Posteriormente se añadió un cóctel de inhibidores de CFTR (30 μ M) al lado apical durante el ensayo para inhibir el transporte de cloruro mediado por CFTR. La función de CFTR se expresa como $\mu A/cm^2$ y se calcula mediante la siguiente fórmula: Corriente máxima inducida por forskolina - Corriente mínima en presencia del cóctel de inhibidores de CFTR.

Secuencias de nucleótidos de pares de sgRNA y donadores molde de ejemplo

Sitio diana 1220 del intrón 10 de CFTR

sgRNA:

accagcctgacaccaaatttaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAU
GCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 26), en donde las
letras minúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el espaciador de
sgRNA y las letras mayúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el
andamiaje de sgRNA.

Donador molde:

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCG
TCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTATTGAGGAAATAAATTTAAAG
ACATGAAAGAATCAAATTAGAGATGAGAAAGAGCTTTCTAGTATTAGAATGGGCTAAAGGG
CAATAGGTATTTGCTTCAGAAGTCTATAAAATGGTTCCTTGTTCCCATTTGATTGTCATTTTA
GCTGTGGTACTTTGTAGAAATGTGAGAAAAAGTTTAGTGGTCTCTTGAAGCTTTTCAAATA
CTTTCTAGAATTATACCGAATAATCTAAGACAAACAGAAAAAGAAAGAGAGGAAGGAAGAA
AGAAGGAAATGAGGAAGAAAGGAAGTAGGAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAG
TAAGAGGGAAGCAGTGCTGCTGCTGTAGGTAAAAATGTTAATGAAAATAGAAATTAAGAAA
GACTCCTGAAAGGCAATTATTTATCAATATCTAAGATGAGGAGAACCATATTTTGAAGAATT
GAATATGAGACTTGGGAAACAAAATGCCACAAAAAATTTCCACTCAATAA TATACACTTCTG
CTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATG
ATGGGTTTTATTTCCAGacttctctgctgatggtcatcatggcgagctggaaccagtgaggggaagatcaaactca
ggacggatttcttttgcagtcagttctcatggatcatgcctgggaccattaaggagaatatcattttggagtgtctacgatgaataccg

gtacagaagcgtgatcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagttcgcagaaaaagataacatcgtgctgggggaggg
 cgggattactctgagtgaggccagcgggcccagaatctcactggctcgcgcagtgtaacaggacgctgatctgtatctgctggactct
 cccctcggctacctggacgtgctgaccgagaaagaaatctcgagagttgctgtgaagctgatggctaacaaaacccggattctgg
 tgacatcaaagatggaacacctgaagaaagcagacaaaaatcctgattctgcatgagggtcaagctactttatgggaccttcagcg
 5 aactgcagaatctgcagcccgattttcctctaagctgatgggatgtgactccttgatcagttctctgccgaaaggcgcaactccatcct
 gactgagaccctgcacagattcagcctggaaggcgacgctcccgtgagctggacagagactaagaaacagctctttaagcagaca
 ggcgagttcggggaaaagcgaaaaatagcatcctgaaccaatcaatagtattcggaagttctcaatcgtgcagaaaactcccct
 gcagatgaacggcattgaggaagactccgatgagccactggaacgacggctgagcctgggtcccgattccgagcagggagaag
 ccatcctgcctaggatcagcgtcatttccactggcccaacccctgcaggctagaaggcgccagagtgtgctgaatctgatgacacactc
 10 agtcaaccagggccagaatatccatcggaagactaccgctctacaagaaaagtgagctggctccacaggcaaacctgactgag
 ctggacatctacagccggcggctgtcccaggagaccgggtggaatttctgaggaaatcaatgaggaagatctgaaggaatgcttt
 ttcgacgatatggagagtatccccgccgtgacaacttgaacacttacctgcgctatattaccgtccacaagtctctgattttgtcctgat
 ctgggtctggtcatcttctggctgaggtcgcagccagcctgggtgctgtggtgctgggaaacaccccactgcaggacaagggg
 aattctacacatagtagaaacaatagctacccgtgatcattacctccacaagttcatactatgtcttctacatctatgtgggcgtcgtga
 15 tacactgctggcaatggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactgtcttaagattctgcaccataaaatgtgcatt
 ctgtgctgcagggtccaatgagtaccctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatcggtttagcaaagacatcgccattctgg
 acgatctgctgcctctgaccatttttgattcatccagctgctgctgatcgtgattggagcaatcgtgtggtcgccgtgctgcagccttaca
 tttcgtcgctactgtgccagtcattgtggccttcatcatgctgcgcgcctatttctgcagaccagccagcagctgaagcagctggagct
 gaaggccggagtcgaatctttacacacctgggtgacttccctgaaaggactgtggaccctgagagccttcggcaggcagccctactttg
 20 agacactgttccacaaggctctgaacctgcatactgcaaattggttctgtatctgtctaccctgcgatggttcagatgcggatcgagat
 gattttcgtgatcttttcatgcccgtcaccttcatcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtgggcatcattctgactctg
 gccatgaacatcatgagtaccctgcagtggtgtgaatagctccattgacgtggattcactgatgcgctcagtcagccgagtggttaa
 gttcatcgacatgccacagaggggaagcctactaaatctaccaagccctacaaaaacggacagctgagcaaagtgatgatcatt
 gaaaaattccatgtcaagaaagacgacatctggcctagcggcgggcagatgaccgtgaaggatctgaccgctaaatacacagaa
 25 ggaggcaacgcaattctggagaatatctcttttctattagtcaggacagcagtggtggactgctgggacgaacaggggtcaggaaa
 gagcactctgctgccattcctgaggctgctgaatactgagggagaaatccagattgacggcgtgctcctgggattctatcacctgc
 agcagtgagaaaggcttttgagtcacccctcagaaagtgtttattttcagcggcacattcaggaagaacctggaccatacgaaca
 gtgggtccgatcaggagatctggaagtgcgagacgaagtgggactgcgctctgtgattgaacagtttctgggaagctggacttcgtc
 ctgggtgatgggggatgctgctgagccacggccataaacagctgatgtgctggcccgagtgctgtcaaggctaaaaatcctg
 30 ctgctggacgagccaagcgccacctggaccccgtagcctaccagatcattagaaggacactgaagcaggcatttccgactgca
 ccgtgatcctgtgcgagcatcgattgaagctatgctggagtccagcagttcctggtcatcgaggaaaacaaggctccggcagtatg
 actctattcagaaactgctgaatgagcggagtctgttttagacaggccatctcaccagcgatagggtgaagctgttccctcaccgcaa
 ctctagtaagtgtaaaatcaagccacagattgccgactgaaggaagagactgaaggagggtccaggatacaagactgtgactg
 actgagatacagcgtaccttcagctcacagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtga
 35 aaaaaatgctttattttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaatt
gcattcattttatgtttcagggttcagggggaggtgtgggaggtttttt**ATTTGGTGTCTAGGCTGGGTGCAGTGGC**
TCACACTTGTAATCCTAGCACTTTTGGAGGCAGAGGCAGGTGAATTGCTTGAGTCCAGGA
GTTTGAGACCAGCGTGGGCAACATGGCAAACCCACCTCTACAAAAAACACAAACAAAAG

AAAATAGCTGGGTGTGGTGGTGTGTGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGTGG
GAGGATCACCTGAGCCTGAGAAGTGGAGGCTGCAGTGAGCCATGATTGCACCACTGTACC
CTAGCCTAGGTGATAGGCTCAAAAAAAAAAAAAAATTGGTGTGTTGCAATGCTAATAACAAT
TTGGTTGTTTCTCTCTCCAGTTGTTTTCCTACATACGAAACAGCTTTTAAACAAAATAGCTG
 5 GAATTGTGCATTTTTTCTTACAAAACATTTTCTTTCTTAAATGTTATTATTTTTCTTTATAT
CTTGATATTATTACTAGCAGTGTTCACTATTAATAAATTATAGGTAACCACGTGCGGACCG
 AGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCT**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCT**
GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTT
GCCCCGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 335).

Las letras mayúsculas en negrita corresponden a la secuencia que comprende las ITR de AAV
 (SEQ ID NO: 15 para la ITR del extremo 5' y SEQ ID NO: 16 para la ITR de 3'); las letras
 mayúsculas subrayadas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende los brazos
 de homología 5' y 3' (SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente); las letras mayúsculas
 15 en cursiva corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el sitio de empalme
 aceptor (SEQ ID NO: 1); las letras minúsculas (sin negrita) corresponden a la secuencia de
 nucleótidos que comprende los exones 11-27 de CFTR (SEQ ID NO: 37); y las letras minúsculas
 en negrita corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende elementos UTR 3' (SEQ
 ID NO: 159).

Sitio diana 2068 del intrón 10 de CFTR

sgRNA:

tactaaaaggcagcctcctagaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAU
 GCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 27), en donde las
 25 letras minúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el espaciador de
 sgRNA y las letras mayúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el
 andamiaje de sgRNA.

Donador molde:

30 **CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCG**
TCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCTGCGGCCGCACGCGTCAGCTTTTAAACAAAATAGC
TGGAATTGTGCATTTTTTCTTACAAAACATTTTCTTTCTTAAATGTTATTATTTTTCTTTAT
ATCTTGTATATTATTACTAGCAGTGTTCACTATTAATAAATTATACTATAGGAGGGGCTGATA
CTAAATAAGTTAGCAATGGTCTAAACAAGGATGTTTATTTATGAAAAGGTAGTAATTGTGTTT
 35 CATAGAATTTTTAAATTAATTCTGCGTATGTCTTCAAGATCAATTCTATGATAGATGTGCAA
AAATAGCTTTGGAATTACAAATTCCAAGACTTACTGGCAATTAAATTTAGGCAGTTTTATTA
AAATTGATGAGCAGATAATTACTGGCTGACAGTGCAAGTTATAGCTTATGAAAAGCAGCTAT
GAAGGCAGAGTTAGAGGAAGGCAGTGGTCCCTTGGAATATTTAAACACTTCTGAGAAAC

gaaatttgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttc
aggttcagggggaggtgtgggaggtttttATTAGGAATGGAACACTTTTATAGTTTTTTTTGGACAAAAG
ATCTAGCTAAAATATAAGATTGAATAATTGAAAATATTAACATTTTAAGTTAAATCTTACCCA
CTCAATACAATTTGGTAATTTGTATCAGAAGCTTAAAAGATAACCTAATAGTTCTTCTACTTC
5 **TATAACTTACCCAAATATGTTTGCAGAGATCTTATGTAAAGCTCTTCATTATAACACTGCTTT**
CAGGAGCCAAAATTGGGTGGGGGAGCCCCATAAATGTTGAATAATAGGGGTTTGATTAG
ATAAATTTTGGTGTAGTTCTATAATGGCGTGTTATTCAGCCAATAAAAGGTTTGTTAAAGAAT
GACTGTGACGGATGTATATGATATACTCTTAAGTGAATAAAGAGTTACAAAATGTTATGTAC
AAGTTACAAAATGTATGTACATTATGATCCATTTTTCATAAAATCATATGTATGTATATATGT
10 **GTGTCTGGAAGGATAAATTTATCGGTAACCACGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCT**
CCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG
AGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 336).

15 Las letras mayúsculas en negrita corresponden a la secuencia que comprende las ITR de AAV
 (SEQ ID NO: 15 para la ITR del extremo 5' y SEQ ID NO: 16 para la ITR de 3'); las letras
 mayúsculas subrayadas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende los brazos
 de homología 5' y 3' (SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20, respectivamente); las letras mayúsculas
 en cursiva corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el sitio de empalme
 20 aceptor (SEQ ID NO: 1); las letras minúsculas (sin negrita) corresponden a la secuencia de
 nucleótidos que comprende los exones 11-27 de CFTR (SEQ ID NO: 37); y las letras minúsculas
 en negrita corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende elementos UTR 3' (SEQ
 ID NO: 159).

25 *Sitio diana 3821 del intrón 10 de CFTR*

sgRNA:

attggctaccttggttgatgaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUG
 CCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 28), en donde las letras
 minúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el espaciador de sgRNA
 30 y las letras mayúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el andamiaje
 de sgRNA.

Donador molde:

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCG
TCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
 35 **GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTTTAGAGATTAGGTCTTACTCT**
GTCACCCAGGCTGAACTTCAGTGGTGTGATCATAGCTCACTGTAACTTGAACCTTGAACCTCCTGGGC
TCAATTGACCTTTCCGCTTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGTTTATAGGCATGAGCCACTGTG
TCTGGTCCAATATGCATATATATATTTTAACTGGATTATCAGAGCTATATTGTGTTTAGGT

TTATAAAGCTGTACTATGTGAAAATATCACTTCTAGGTTTAATTTTGTACAAAGGAATTTTAT
ATAGAAATGAGGTAATTCAGATTTTTTCCCATGTAATAAGAATTGTAAAATTTACTGAAACAA
ACATCAAAAAGATATCTGTTACATGACCTTCCTTTCTTTTGAATATATTTTCAAGGTGATATTAT
TTATTAAAATTTAAAAATGAAAATTAATAAAAAAGTTGAAAATTATTCCTTTCTTTACT
5 GTCTCTCATCTGTCCATTTTCCATTCTCCTGCATTCCCTCATATACACTTCTGCTTAGGATG
ATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATGATGGGTTTTA
TTTCCAGacttctctgctgatggcatcatggcgagctggaaccagtgaggggaagatcaaactcaggacggattctttt
gcagtcagttctcatggatcatgcctgggaccattaaggagaatatcattttggagtgcctacgatgaataccggtacagaagcgtg
atcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagttcgagaaaaagataacatcgtgctgggggagggcgggattactctga
10 gtggaggccagcgggccagaatctcactggctcgcgagctgtacaaggacgctgatctgtatctgctggactctcccttcggctacct
ggacgtgctgaccgagaaagaaatctcgagagttgcgtctgaagctgatggctaacaaaaccggattctggtgacatcaaagat
ggaacacctgaagaaagcagacaaaatcctgattctcatgagggctcaagctactttatgggaccttcagcgaactgcagaatct
gcagcccgatttttctctaagctgatgggatgtgactccttgatcagttctctgccgaaaggcgcaactccatcctgactgagacctg
cacagattcagcctggaaggcgacgctcccgtagctggacagagactaagaaacagctctttaagcagacaggcgagttcgggg
15 aaaagcgaaaaaatagcatcctgaacccaatcaatagtattcggaagtttcaatcgtgcagaaaactccctgcagatgaacggc
attgaggaagactccgatgagccactggaacgacggctgagcctgggtgccgattccgagcagggagaagccatcctgcctagga
tcagcgtcatttccactggcccaaccctgcaggctagaaggcgccagagtgtgctgaatctgatgacacactcagtcaaccagggcc
agaatatccatcggaagactaccgcctctacaagaaaagtgagtctggctccacaggcaaaccctgactgagctggacatctacagc
cggcggctgtccaggagaccgggctggaaattctgaggaaatcaatgaggaagatctgaaggaatgcttttcgacgatatggag
20 agtatccccgctgacaacttgaacacttacctgcgctatattaccgtccacaagtctctgattttgtcctgatctgggtctggtcatct
tcctggctgaggtcgagccagcctgggtggtcctgtggctgctgggaaacaccccactgcaggacaaggggaattctacacatagta
gaaacaatagctacgccgtgatcattacctccacaagttcatactatgtctctacatctatgtgggcgtcgtgatacactgctggcaat
ggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactgtctctaagattctgcaccataaaatgctgcattctgtgctgcaggctc
caatgagtaccctgaacacactgaaggcaggggaatcctgaatcggttagcaaagacatcgccattctggacgatctgctgcctct
25 gaccatttttgatttcatccagctgctgctgatcggtgagcaatcgctgtggctgccgctgctgcagccttaccatttctgctactgtg
ccagtcattgtggccttcatcatgctgcgcgctatttctgcagaccagccagcagctgaagcagctggagtctgaaggccgggagtc
caatctttacacacctggtgacttccctgaaaggactgtggacctgagagccttcggcaggcagccctactttgagacactgttcac
aaggctctgaacctgcatactgcaaattggtttctgtatctgtctaccctgcgatggtttcagatgaggatcgagatgatttctgctatctttt
cattgccgtcaccttcatcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtgggcatcattctgactctggccatgaacatcatg
30 agtaccctgcagtgggctgtgaatagctccattgacgtggattcactgatgcgctcagtcagccgagtggttaagttcatcgacatgccc
acagaggggaagcctactaaaatctaccaagccctacaaaaacggacagctgagcaaagtatgatcattgaaaattcccatgtca
agaaagacgacatctggcctagcggcgggcagatgaccgtgaaggatctgaccgctaaatacacagaaggaggcaacgcaatt
ctggagaatatctcttttctattagtcaggacagcgagtggtgactgctgggacgaacagggtcaggaaagagcactctgctgtccg
cattcctgaggctgctgaatactgagggagaaatccagattgacggcgctgctgggattctatcacctgcagcagtgaggaaagg
35 cttttgagtcacccctcagaaagtgttttttccagggcacattcaggaagaacctggaccatacgaacagtggtccgatcaggag
atctggaagtcgcagacgaagtgggactgcgctctgtgattgaacagtttctgggaagctggactcgtcctggtggatgggggat
gcgtgctgagccacggccataaacagctgatgtgctggccggagtgctgtcgaaggctaaaatcctgctgctggacgagcca
agcggccacctggaccccgtagcctaccagatcattagaaggacactgaagcaggcatttgcgactgcaccgtgatcctgtgcga

gcatcgattgaagctatgctggagtgccagcagttcctggtcatcgaggaaaacaaggtccggcagtatgactctattcagaaactg
ctgaatgagcggagtctgttagacaggccatctcaccagcgataggggtgaagctgtccctcaccgcaactctagtaagtgtaaatc
caagccacagattgccgcactgaaggaagagactgaagaggaggtccaggatacaagactgtgactgactgagatacagcgta
cttcagctcacagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgt
5 **gaaattgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgttc**
aggttcagggggaggtgtgggaggtttttTCCAACCAAGGTAGCCAATCCAGGTAACCTTTTTTAGTAT
CTTCCCAGAGATGTTTCTCTATATATAATCAATATACATTTTTTATTATCCCCACCTCT
CTTTTTATGTAACAATATGCAGAGTTTTGCTTCTTGCTTTTCCCACTATCTTGGACAACCTTC
CATATTCAAAGCACAGAGGACTTGACATATGTTGAGACTGCTGAATATTTCTGTCTCTCCC
10 CTGCCATTATATGTTGAAATCCTAATTCCCAAGGTGATGGTATTGCAGGGTGGGGCCTTT
GGGAGGTGATTAGTCCATGAGGGTGAAGTCTTTAGTAAATGAGATTAGTGTCTTTATAAAA
GAAACCTTAGAGAGACCCTCACACCTTAGAGAGACCCTCACCCCTTTCTGCCATGTGAGAA
CACAGCAGGAAGACAGCTGGCTATCCAGGATTCAGGAGTCTCTTAGCAGACCCAAATCTG
CTGGCACCTTGATCTTGGACTTCCCAGCGGTAACCACGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGT
15 **CGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTC**
GCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGC
CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 337).

Las letras mayúsculas en negrita corresponden a la secuencia que comprende las ITR de AAV
20 (SEQ ID NO: 15 para la ITR del extremo 5' y SEQ ID NO: 16 para la ITR de 3'); las letras
mayúsculas subrayadas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende los brazos
de homología 5' y 3' (SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, respectivamente); las letras mayúsculas
en cursiva corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el sitio de empalme
aceptor (SEQ ID NO: 1); las letras minúsculas (sin negrita) corresponden a la secuencia de
25 nucleótidos que comprende los exones 11-27 de CFTR (SEQ ID NO: 37); y las letras minúsculas
en negrita corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende elementos UTR 3' (SEQ
ID NO: 159).

Sitio diana 4262 del intrón 10 de CFTR

30 **sgRNA:**
tgatcatatgagaaaagtcacagGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAU
GCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 29), en donde las
letras minúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el espaciador de
sgRNA y las letras mayúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el
35 andamiaje de sgRNA.

Donador molde:

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCG
TCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG

GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTTTATTCCITTTCTTTACTGTCTC
TCATCTGTCCATTTTCCATTCTCCTGCATTCCCTCATCCAACCAAGGTAGCCAATCCAGGTA
ACTTTTTTTAGTATCTTCCCAGAGATGTTTCTCTCTATATATAATCAATATACATTTTTTAT
TATCCCCACCTCTCTTTTTATGTAACAATATGCAGAGTTTTGCTTCTTGCTTTTCCACTAT
5 **CTTGGACAACCTTTCCATATTCAAAGCACAGAGGACTTGACATATGTTCAGACTGCTGAATA**
TTTCTGTCTCTCCCCTGCCATTTCATATGTTGAAATCCTAATTCCCAAGGTGATGGTATTGCA
GGGTGGGGCCTTTGGGAGGTGATTAGTCCATGAGGGTGAAGTCTTTAGTAAATGAGATTA
GTGTCTTTATAAAAGAAACCTTAGAGAGACCCTCACACCTTAGAGAGACCCTCACCCCTTT
CTGCCATGTGAGAACACAGCAGGAAGACAGCTGGCTATCCAGGA
10 **TATACACTTCTGCTTA**
GGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATGATGG
GTTTTATTTCCAGacttctctgctgatggcatcatggcgagctggaaccagtgaggggaagatcaaacactcaggacg
gatttcttttgcagtcagttctcatggatcatgcctgggaccattaaggagaatatcattttggagtgtcctacgatgaataccggtacag
aagcgtgatcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagttcgagaaaaagataacatcgctgtgggggagggcgggat
tactctgagtgaggccagcgggccagaatctactggctcgcgagctgtacaaggacgctgatctgatctgctggactctcccttcg
15 gctacctggacgtgctgaccgagaaagaaatcttcgagagttgctgtgtaagctgatggctaacaaaacccggattctggtgacatc
aaagatggaacacctgaagaaagcagacaaaaatcctgattctgcatgagggctcaagctactttatgggaccttcagcgaactgca
gaatctgcagcccgattttcctctaagctgatgggatgtgactccttgatcagttctctgccgaaaggcgcaactccatcctgactgag
accctgcacagattcagcctggaaggcgacgctcccgtgagctggacagagactaagaaacagctctttaagcagacagggcgagt
tcggggaaaagcgaaaaaatagcatcctgaaccaatcaatagattcggaaagttctcaatcgtcagaaaaactcccctgcagatg
20 aacggcattgaggaagactccgatgagccactggaacgacggctgagcctggcgccgattccgagcagggagaagccatcctg
cctaggatcagcgtcatttccactggcccaacctgcaggctagaaggcgccagagtggtgctgaatctgatgacacactcagtcaac
cagggccagaatatccatcggaagactaccgcctctacaagaaaagtgagctggctccacaggcaaacctgactgagctggaca
tctacagccggcggtgtcccaggagaccgggctggaatttctgaggaaatcaatgaggaagatctgaaggaatgcttttcgacg
atatggagagtatccccgcgtgacaacttgaacacttacctgcgtatattaccgtccacaagctctgattttgtcctgatctggtgtc
25 tggatcatcttctggctgaggtcgagccagcctgggtgctgtggctgctgggaaacacccactgcaggacaaggggaattctac
acatagtagaaacaatagctacgccgtgatcattacctccacaagttcatactatgtcttctacatctatgtgggctgctgatacactg
ctggcaatgggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactgtcttaagattctgcaccataaaatgctgcattctgtgct
gcaggctccaatgagtaccctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatcggttagcaaagacatcgccattctggacgac
tgctgcctctgaccattttgatttcatccagctgctgctgatcgatggagcaatcgctgtggtcgccgtgctgcagccttacatttctgc
30 gctactgtgccagtcattgtggcctcatcatgctgcgcgctatttctcgcagaccagccagcagctgaagcagctggagtctgaagg
ccggagtccaatctttacacacctggtgacttccctgaaaggactgtggaccctgagagccttcggcaggcagccctactttgagaca
ctgttccacaaggctctgaacctgcatactgcaaattggttctgtatctgtctacctgcgatggtttcagatgcggatcgagatgatttc
gtgatcttttcatgcccgtcacctcatcagcattctgaccacaggggaggaggagaaggcagagtgggcatcattctgactctggccatg
aacatcatgagtaccctgcagtggtgtgaatagctccattgacgtggattcactgatgcgctcagtcagccgagtggttaagttcatc
35 gacatgccacagaggggaagcctactaaatctaccaagccctacaaaaacggacagctgagcaaagtgatgatcattgaaaatt
cccatgtcaagaaagacgacatctggcctagcggcgggcagatgaccgtgaaggatctgaccgctaaatacacagaaggaggc
aacgcaattctggagaatatctcctttctattagtcaggacagcgagtggtgactgctgggacgaacaggggtcaggaaagagcact
ctgctgtccgattcctgaggctgctgaatactgaggagaaatccagattgacggcggtgtcctgggattctatcacctgcagcagtg

gagaaaggcttttgagtcacccagaaagtgttttttcagcggcacattcaggaagaacctggacccatacgaacagtggcc
 gatcaggagatctggaaagtcgagacgaagtgggactgcgctctgtgattgaacagtttcctgggaagctggacttcgtcctggtg
 atgggggatgcgtgctgagccacggccataaacagctgatgtgcctggccggagtgctgtcctaaaggctaaaatcctgctgctg
 acgagccaagcgcccacctggaccccgtagctaccagatcattagaaggacactgaagcaggcatttgcgactgcaccgtgat
 5 cctgtgagcatcgcatgaagctatgctggagtgcagcagttcctggatcagaggaaaacaaggccggcagtatgactctatt
 cagaaactgtgaatgagcggagctctgttagacaggccatctcaccagcgatagggtgaagctgtccctaccgcaactctagta
 agtgtaaataccaagccacagattgccgactgaaggaagagactgaagaggaggccaggatacaagactgtgactgactgaga
 tacagcgtaccttcagctcacagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaat
gctttattgtgaaattgtgatgctattgctttattgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattca
 10 **tttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggttttt**TTCAGGAGTCTCTTAGCAGACCCAAATCTGCT
GGCACCTTGATCTTGGACTTCCCAGCCTCCAGAACTGTGAGAAATAAATTCCTGTTGTTTAT
AAGCCACACAGTTTCATGGTATTTTGTATAGCAGCCTGAACAAGGACACACACACACAC
ACACACATGCACACACATTTAAATAGATGCATAGTATTCTATCATATGGATGGATATTCTAT
GATATAATGAATCACTATTGATTGACATTTGGGTTGTTTCCAATATTTTGTAAACACAAAGAA
 15 CAACACTACAAATAACTTTATATACATATCATTTAGCACATCTGCAATTGTATCAGTAGGCTT
CCTATAAGTGGTCAAGCATTGTGTACTTGTGATTTTGGTAGATGTTGTCAAATGTCCTTCC
CTGAAATTTGTACCAATTCGTACTCATGCCATACACTCTAAATAGAGTGCTGATTTCCCCAC
AGCATTACTAACAGATGATATTATCTAATTTAAGGTAACCACGTGCGGACCGAGGCTGCAG
 20 **CGTCGTCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG**
CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG
GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 338).

Las letras mayúsculas en negrita corresponden a la secuencia que comprende las ITR de AAV
 (SEQ ID NO: 15 para la ITR del extremo 5' y SEQ ID NO: 16 para la ITR de 3'); las letras
 25 mayúsculas subrayadas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende los brazos
 de homología 5' y 3' (SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, respectivamente); las letras mayúsculas
 en cursiva corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el sitio de empalme
 aceptor (SEQ ID NO: 1); las letras minúsculas (sin negrita) corresponden a la secuencia de
 nucleótidos que comprende los exones 11-27 de CFTR (SEQ ID NO: 37); y las letras minúsculas
 30 en negrita corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende elementos UTR 3' (SEQ
 ID NO: 159).

Sitio diana 5041 del intrón 10 de CFTR

sgRNA:

35 tggcatatgagaaaagtcacagGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAU
 GCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 30), en donde las
 letras minúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el espaciador de

sgRNA y las letras mayúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el andamiaje de sgRNA.

Donador molde:

5 **CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCG**
TCGGGCGACCTTTGGTGCCTCGCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGCGGCCGCACGCGTACAAAGAACAACACTACAAAT
AACTTTATATACATATCATTTAGCACATCTGCAATTGTATCAGTAGGCTTCCTATAAGTGGTC
AAGCATTTGTGTACTTGTGATTTTGGTAGATGTTGTCAAATGTCCTTCCCTGAAATTTGTAC
CAATTCGTACTCATGCCATACACTCTAAATAGAGTGCTGATTTCCCCACAGCATTACTAACA
10 GATGATATTATCTAATTTAAAAAGTTTCTCATCTTATAGGGAAAATAGTATGTCAATGTATTC
TTAACTTGCATTTCTTTTATTATAAGTAGTGTAAAATATCATTTCACTTATACACAGGAGGA
ATTTCTCTCTATATAAAGTGATCCTAGAAATCATAATGAAAAATATCACCAACTCATTAGGAAA
ATGTACAAAGGATTGAATAGATATCTCATCAAAAATAAAAATATAAGTGGCCTTTAAACATTG
AAAGGTAACATTTGAACAAAGACTTGCAGGAGGTGAGGGATATACACTTCTGCTTAGGATG
15 ATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATGATGGGTTTTA
TTTCCAGacttctctgctgatggcatcatggcgagctggaaccagtgaggggaagatcaaactcaggacggatttctttt
gcagtcagttctcatggatcatgcctgggaccattaaggagaatatcattttggagtgctctacgatgaataccggtacagaagcgtg
atcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagttcgcagaaaaagataacatcgtgctgggggagggcgggattactctga
gtggaggccagcgggccagaatctcactggctcgcgcagtgtaaggacgctgatctgtatctgctggactctccctcggctacct
20 ggacgtgctgaccgagaaagaaatcttcgagagttgctgctgaagctgatggctaacaaaacccgattctggtgacatcaaagat
ggaacacctgaagaaagcagacaaaatcctgattctcatgagggtcaagctacttttatgggacctcagcgaactgcagaatct
gcagcccgattttctctaagctgatgggatgtgactccttgatcagttctctgccgaaaggcgcaactccatcctgactgagaccctg
cacagattcagcctggaaggcgacgtcccgtagctggacagagactaagaaacagtcctttaagcagacaggcgagttcgggg
aaaagcgaaaaaatagcatcctgaacccaatcaatagatttcggaagtctcaatcgtgcagaaaactcccctgcagatgaacggc
25 attgaggaagactccgatgagccactggaacgacggctgagcctggtgccgattccgagcaggggagaagccatcctgcctagga
tcagcgtcatttccactggccaacctgcaggctagaaggcgccagagtgctgaatctgatgacacactcagtcacacaggggcc
agaatatccatcggaagactaccgcctctacaagaaaagtgagtcgtgctccacaggcaaacctgactgagctggacatctacagc
cggcggctgtcccaggagaccgggctggaatttctgaggaatcaatgaggaagatctgaaggaatgcttttcgacgatatggag
agtatccccgccgtgacaacttggaacacttacctgcgtatattaccgtccacaagtctctgattttgtcctgatctggtgtctggtcatct
30 tcttggtgaggtcgcagccagcctggtggtcctgtggtgctgggaaacaccccactgcaggacaaggggaattctacacatagta
gaaacaatagctacgccgtgatcattacctccacaagttcatactatgtcttctacatctatgtggcgctcgtgatacactgctggcaat
ggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactgtctctaagattctgcaccataaaatgctgcattctgtgctgcaggctc
caatgagtacctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatcggttagcaaagacatcgccattctggacgatctgctgcctct
gaccattttgatccatccagctgctgctgatcgtgattggagcaatcgctggtgcgctgagccttacattttctgctactgtg
35 ccagtcattgtggcctcatcatgctgcgcgctatttctgcagaccagccagcagctgaagcagctggagctgaaggccggagtc
caatctttacacacctggtgacttccctgaaaggactgtggacctgagagccttcggcaggcagccctactttgagacactgttcac
aaggctctgaacctgcatactgcaaattggtttctgtatctgtctaccctgcgatggttcagatcggtatcgagatgatttctgcatctttt
cattgccgtcaccttcatcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtgggcatcattctgactctggccatgaacatcatg

agtacctgcagtgggctgtgaatagctccattgacgtggattcactgatgcgctcagtcagccgagtggttaagttcatcgacatgccc
 acagaggggaagcctactaaatctaccaagccctacaaaaacggacagctgagcaaagtgatgattgaaaattcccatgtca
 agaaagacgacatctggcctagcggcgggcagatgaccgtgaaggatctgaccgctaaatacacagaaggaggcaacgcaatt
 ctggagaatatctcttttctattagtcaggacagcgagtggtgactgctgggacgaacagggtcaggaaagagcactctgctgtccg
 5 cattctgaggctgctgaatactgaggagaaatccagattgacggcgtgctctgggattctatcacctgcagcagtgaggaaagg
 ctttgagtgatccctcagaaagtgttttttcagcggcacattcaggaagaacctggaccatacgaacagtgggtccgatcaggag
 atctggaaagtgcagacgaagtgggactgcgctctgtgattgaacagtttctgggaagctggactcgtcctggatgggggat
 gcgtgctgagccacggccataaacagctgatgtgctggccggagtgctgtcaaaaggctaaaatcctgctgctggacgagcca
 agcggccacctggaccccgtagctaccagatcattagaaggacactgaagcaggcatttgcgactgcaccgtgatcctgtgca
 10 gcatcgcatgaagctatgctggagtgcagcagttcctggatcagaggaaaacaagggtccggcagtatgactctattcagaaactg
 ctgaatgagcggagctgttttagacaggccatctcaccagcgatagggtgaagctgttcctcaccgcaactctagtaagtgtaaatc
 caagccacagattgccgcactgaaggaagagactgaagaggagggtccaggatacaagactgtgactgactgagatacagcgta
 cttcagctcacagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgt
gaaatttgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttc
 15 **aggttcagggggaggtgtgggaggttttt**TTAGGGAATGCAGACTCTGGGAAGAGTCTTCCAAGTAG
CAGGTGAAGCAAGTGCAAAGCTTTCAGATGGGACTGACTATACCTGTCTGGTTTGAAGAAC
AGTAAGGAGGTCAGTGAGGCTGGCATAGAGTAAGACAGGGAGGGTAGAATACTGTCAGAG
AAGTAATCGGCGGTGGAGGTAGGGGGTAAACCATAAAGTGCTCGTAAAGACTAAGGCTTA
TTTCTCTGGGTGAGATTAGAGGCCACTGGAGAGTTTTTAAACAGAAGTAACAGGGCCACTTT
 20 GGCTAATGTTTTTAGGCTATTCTGTAGGGAGACAAGGGAGGAAGCAAGGAGATGAGTTAG
GAGTCTATTGTGCCAGTTCAGGCAAGTGATGATGGTGGCTTGATCCAGGTAGTAGTGAA
GTAGTATAGTAGGAAGTGATCAGATTCAGGACATGCTTTGAAGGAAGATCCAATAGGATTA
ATGGATAAGTTGAACAATGGCATATGAGAAAAGTCACAGGGTAACCACGTGCGGACCGAG
 25 GCTGCAGCGTCGTCCTCCCT**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC**
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGC
CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 339).

Las letras mayúsculas en negrita corresponden a la secuencia que comprende las ITR de AAV
 (SEQ ID NO: 15 para la ITR del extremo 5' y SEQ ID NO: 16 para la ITR de 3'); las letras
 30 mayúsculas subrayadas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende los brazos
 de homología 5' y 3' (SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 345, respectivamente); las letras mayúsculas
 en cursiva corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el sitio de empalme
 aceptor (SEQ ID NO: 1); las letras minúsculas (sin negrita) corresponden a la secuencia de
 nucleótidos que comprende los exones 11-27 de CFTR (SEQ ID NO: 37); y las letras minúsculas
 35 en negrita corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende elementos UTR 3' (SEQ
 ID NO: 159).

sgRNA:

tgccatagagaaaaagtcacagGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCCAAAAU
 GCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 31), en donde las
 letras minúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el espaciador de
 5 sgRNA y las letras mayúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el
 andamiaje de sgRNA.

Donador molde:

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCG
TCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
 10 **GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTT**GCGGCCGCACGCGTAATAACTTTATATACATATCAT
TTAGCACATCTGCAATTGTATCAGTAGGCTTCCTATAAGTGGTCAAGCATTGTGTACTTGT
GATTTTGGTAGATGTTGTCAAATGTCCTTCCTGAAATTTGTACCAATTCGTACTCATGCCA
TACACTCTAAATAGAGTGCTGATTTCCCCACAGCATTACTAACAGATGATATTATCTAATTTA
AAAAGTTTCTCATCTTATAGGGAAAATAGTATGTCAATGTATTCTTAAGTTGCATTTCTTTTA
 15 TTATAAGTAGTGTAATAATATCATTTCAACTTATACACAGGAGGAATTTCTCTCTATATAAAGT
GATCCTAGAATCATAATGAAAAATATCACCAACTCATTAGGAAAATGTACAAAGGATTGAAT
AGATATCTCATCAAAAATAAAAATATAAGTGGCCTTTAAACATTGAAAGGTAACATTTGAACA
AAGACTTGCAGGAGGTGAGGGATTAGGGAATGCAGACTCTTATACACTTCTGCTTAGGATG
ATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATGATGGGTTTTA
 20 TTTCCAGacttctctgctgatggcatcatgggagctggaaccagtgaggggaagatcaaactcaggacggattctttt
gcagtcagttctcatggatcatgcctgggaccattaaggagaatatcatttttgagtgctctacgatgaataccggtacagaagcgtg
atcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagttcgagaaaaagataacatcgtgctgggggagggcgaggattactctga
gtggaggccagcgggccagaatctcactggctcgcgagtgtaaggacgctgatctgtatctgctggactctcccttcggctacct
ggacgtgtgaccgagaaagaaatctcgagagttgctgtgaagctgatggtaacaaaacccgattctggtgacatcaaagat
 25 ggaacacctgaagaaagcagacaaaatcctgattctcatgagggctcaagctacttttatgggacctcagcgaactgcagaatct
gcagcccgattttctctaagctgatgggatgtgactccttgcagttctctgccgaaaggcgcaactccatcctgactgagaccctg
cacagattcagcctggaaggcgacgtcccgtagctggacagagactaagaaacagtcctttaagcagacaggcgagttcgggg
aaaagcgaaaaaatagcatcctgaaccaatcaatagtattcggaagtctcaatcgtgcagaaaactcccctgcagatgaacggc
attgaggaagactccgatgagccactggaacgacggctgagcctgggtgccgattccgagcaggggagaagccatcctgcctagga
 30 tcagcgtcatttccactggccaaccctgcaggctagaaggcgccagagtgctgaatctgatgacacactcagtcacacagggcc
agaatatccatcggaagactaccgcctctacaagaaaagtgagttctggctccacaggcaaacctgactgagctggacatctacagc
cggcggtgtcccaggagaccgggctggaaattctgaggaatcaatgaggaagatctgaaggaatgcttttcgacgatatggag
agtatccccgccgtgacaacttgaacacttacctgcgtatattaccgtccacaagtctctgattttgtcctgatctggtgtctgtcatct
tcttggtgaggtcgagccagcctggtggtcgtggtggtggaacacccactgcaggacaaggggaattctacacatagta
 35 gaaacaatagctacgccgtgatctacctccacaagttcatactatgtcttctacatctatgtgggcgtcgtgatacactgtcggcaat
ggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactgtcttaagattctgcaccataaaatgctgcattctgtctgcaggctc
caatgagtaccctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatcggttagcaaagacatcgccattctggacgatctgctgcctct
gaccatttttgatttcatccagctgctgctgatcgtgattggagcaatcgctgtggtcgccgtgctgcagccttacattttcgtcgtactgtg

ccagtcattgtggccttcatcatgctgcgcgcctatttctgcagaccagccagcagctgaagcagctggagctgaaggccggagtc
 caatctttacacacctggtgacttccctgaaaggactgtggacctgagagcctcggcaggcagccctactttgagacactgttccac
 aaggctctgaacctgcatactgcaaattggttctgtatctgtctaccctgcgatggttcagatgcggatcgagatgatttcgtgatctttt
 cattgccgtcaccttcatcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtgggcatcattctgactctggccatgaacatcatg
 5 agtaccctgcagtgaggctgtgaatagctccattgacgtggattcactgatgcgctcagtcagccgagtggttaagttcatcgacatgccc
 acagaggggaagcctactaaatctaccaagccctacaaaaacggacagctgagcaaagtgatgatcattgaaaattcccatgtca
 agaaagacgacatctggcctagcggcgggcagatgaccgtgaaggatctgaccgctaaatacacagaaggaggcaacgcaatt
 ctggagaatatctcttttctattagtcaggacagcgagtgaggactgtctgggacgaacagggtcaggaaagagcactctgtgtccg
 cattctgaggctgtgaatactgaggagaaatccagattgacggcgtgtctgggattctatcacctgcagcagtgaggaaagg
 10 ctttggagtcacccctcagaaagtgttttttcagcggcacattcaggaagaacctggaccatacgaacagtggtccgatcaggag
 atctggaaagtcgacagcaagtgggactgcgctctgtgattgaacagtttctgggaagctggactcgtcctggtggatgggggat
 gcgtgtgagccacggccataaacagctgatgtgcctggccggagtgctgtcaaggctaaaatcctgtctggacgagcca
 agcggccacctggaccccgtagctaccagatcattagaaggacactgaagcaggcatttgcgactgcaccgtgatcctgtgcga
 gcatcgcatgaagctatgctggagtgccagcagttcctgggtcatcgaggaaaacaaggctccggcagtatgactctattcagaaactg
 15 ctgaatgagcggagctgttttagacaggccatctcaccagcgatagggtgaagctgttccctaccgcaactctagtaagtgtaaatc
 caagccacagattgccgcactgaaggaagagactgaagaggagggtccaggatacaagactgtgactgactgagatacagcgta
 cttcagctcacagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgt
gaaattgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagtttaacaacaacaattgcattcattttatgtttc
aggttcaggggggaggtgtgggaggttttttGGGAAGAGTCTTCCAAGTAGCAGGTGAAGCAAGTGCAA
 20 AGCTTTCAGATGGGACTGACTATACCTGTCTGGTTTGAAGAACAGTAAGGAGGTCACTGAG
GCTGGCATAGAGTAAGACAGGGAGGGTAGAATACTGTCAGAGAAGTAATCGGCGGTGGA
GGTAGGGGGTAAACCATAAAGTGCTCGTAAAGACTAAGGCTTATTTCTCTGGGTGAGATTA
GAGGCCACTGGAGAGTTTTAAACAGAAGTAACAGGGCCACTTTGGCTAATGTTTTTAGGCT
ATTCTGTAGGGAGACAAGGGAGGAAGCAAGGAGATGAGTTAGGAGTCTATTGTGCCAGTT
 25 CAGGCAAGTGATGATGGTGGCTTGATCCAGGTAGTAGTGGAAGTAGTATAGTAGGAAGTG
ATCAGATTCAGGACATGCTTTGAAGGAAGATCCAATAGGATTAATGGATAAGTTGAACAAT
GGCATATGAGAAAAGTCACAGAGGAGTCAAAGATGATTCGGTAACCACGTGCGGACCGAG
GCTGCAGCGTCGTCCTCCCT**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC**
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGC
 30 **CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG** (SEQ ID NO: 340).

Las letras mayúsculas en negrita corresponden a la secuencia que comprende las ITR de AAV
 (SEQ ID NO: 15 para la ITR del extremo 5' y SEQ ID NO: 16 para la ITR de 3'); las letras
 mayúsculas subrayadas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende los brazos
 35 de homología 5' y 3' (SEQ ID NO: 346 y SEQ ID NO: 347, respectivamente); las letras
 mayúsculas en cursiva corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el sitio de
 empalme aceptor (SEQ ID NO: 1); las letras minúsculas (sin negrita) corresponden a la
 secuencia de nucleótidos que comprende los exones 11-27 de CFTR (SEQ ID NO: 37); y las

letras minúsculas en negrita corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende elementos UTR 3' (SEQ ID NO: 159).

Sitio diana 5278 del intrón 10 de CFTR

5 **sgRNA:**

tgggtgagattagaggccactgGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAU
GCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 32), en donde las
letras minúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el espaciador de
sgRNA y las letras mayúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el
10 andamiaje de sgRNA.

Donador molde:

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCG
TCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGCGGCCGCACGCGTTAGGGAAAATAGTATGTCAAT
15 GTATTCTTAACCTTGCATTTCTTTATTATAAGTAGTGTAATATCATTTCACCTTATACACAG
GAGGAATTTCTCTCTATATAAAGTGATCCTAGAAATCATAATGAAAAATATCACCAACTCATT
GGAAAATGTACAAAGGATTGAATAGATATCTCATCAAAAAATAAAATATAAGTGGCCTTTAA
ACATTGAAAGGTAACATTTGAACAAAGACTTGACAGGAGGTGAGGGATTAGGGAATGCAGA
CTCTGGGAAGAGTCTTCCAAGTAGCAGGTGAAGCAAGTGCAAAGCTTTCAGATGGGACTG
20 ACTATACCTGTCTGGTTTGAAGAACAGTAAGGAGGTCACTGAGGCTGGCATAGAGTAAGA
CAGGGAGGGTAGAATACTGTCAGAGAAGTAATCGGCGGTGGAGGTAGGGGGTAAACCAT
AAAGTGCTCGTAAAGACTAAGGCTTATTTCTCTGGGTGAGATTAGAGGCCA TATACACTTC
TGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAA
TGATGGGTTTTATTTCCAG acttctctgctgatggtcatcatgggagctggaacccagtgaggggaagatcaaacact
25 caggacggatttcttttgcagtcagttctcatggatcatgctgggaccattaaggagaatatcatttttgagtgctctacgatgaatacc
ggtacagaagcgtgatcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagttcgagaaaaagataacatcgtgctgggggagg
gcgggattactctgagtgaggccagcgggccagaatctactggctcgcgagtgatcaaggacgctgatctgtatctgctggactc
tcccttcggctacctggacgtgctgaccgagaaagaaatctcgagagttgctgctgtaagctgatggctaacaaaacccggattctg
gtgacatcaaagatggaacacctgaagaaagcagacaaaatcctgattctgcatgagggctcaagctacttttatgggaccttcagc
30 gaactgcagaatctgcagcccgatcttcttaagctgatgggatgtgactccttgatcagttctctgcccgaaggcgcaactccatcc
tgactgagaccctgcacagattcagcctggaaggcgagcgtcccgtgagctggacagagactaagaaacagctctttaagcagac
aggcgagttcggggaaaagcgaaaaatagcatcctgaacccaatcaatagttatcggaagttctcaatcgtgcagaaaactcccc
tgcagatgaacggcattgaggaagactccgatgagccactggaacgacggctgagcctggtgcccgatccgagcagggagaag
ccatctgcctaggtacagcgtcattccactggcccaaccctgcaggctagaaggcgccagagtgctgtaactctgatgacacactc
35 agtcaaccagggccagaatatccatcggaagactaccgcctctacaagaaaagtgagctggtccacaggcaaacctgactgag
ctggacatctacagccggcggtgtcccaggagaccgggtggaaattctgaggaaatcaatgaggaagatctgaaggaatgcttt
ttcgacgatatggagagtatccccgccgtgacaacttggaacacttacctgcgtatattaccgtccacaagttctgattttgtcctgat
ctggtgtctggtcatcttctggtgaggtcgagccagcctggtggtcctgtggtgctgggaaacacccactgcaggacaagggg

aattctacacatagtagaaacaatagctacgccgtgatcattacctccacaagttcatactatgtcttctacatctatgtgggcgtcgctga
tacactgctggcaatggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactgtcttaagattctgcaccataaaatgtgcatt
ctgtgctgcaggctccaatgagtagccctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatcggtttagcaaagacatgccattctgg
acgatctgctgcctctgaccatttttgattcatccagctgctgctgatcgtagtgaggcaatcgctgtggtcgccgtgctgcagccttaca
5 tttcgtcgctactgtgccagtcattgtggccttcatcatgctgcgcgcctatttctgcagaccagccagcagctgaagcagctggagtct
gaaggccggagtgcaatctttacacacctggtgacttccctgaaaggactgtggaccctgagagccttcggcaggcagccctactttg
agacactgttcacaaggctctgaacctgcatactgcaaattggttctgtatctgtctaccctgcgatggttcagatgcggatcgagat
gattttcgtgatcttttcattgccgtcaccttcatcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtgggcatcattctgactctg
gccatgaacatcatgagtaccctgcagtggtgctgaatagctccattgacgtggattcactgatgcgctcagtcagccgagtgttaa
10 gttcatcgacatgcccacagaggggaagcctactaaatctaccaagccctacaaaacggacagctgagcaaagtgatgatcatt
gaaaattcccatgtcaagaaagacgacatctggcctagcggcgggcagatgaccgtgaaggatctgaccgctaaatacacagaa
ggaggcaacgcaattctggagaatatctcctttctattagtcaggacagcgagtgggactgctgggacgaacagggtcaggaaa
gagcactctgctgtccgattctctgaggctgctgaatactgaggggagaaatccagattgacggcgtgtcctggattctatcacctgc
agcagtgaggaaaggcttttgagtcacctcagaaagtgtttattttcagcggcacattcaggaagaacctggaccatacgaaca
15 gtggtccgatcaggagatctggaaagtcgcagacgaagtgggactgcgctctgtgattgaacagtttctgggaagctggactcgtc
ctgggtgatgggggatgcgtgctgagccacggccataaacagctgatgtgcctggcccgagtgctgtgcaaggctaaaaatcctg
ctgctggacgagccaagcgccacctggaccccgtagctaccagatcattagaaggacactgaagcaggcatttgccgactgca
ccgtgatcctgtgcgagcatcgattgaagctatgctggagtccagcagttcctggtcatcgaggaaaacaaggctccggcagtag
actctattcagaaactgctgaatgagcggagtctgttttagacaggccatctcaccagcgatagggtagagctgttccctcaccgcaa
20 ctctagtaagtgtaaatccaagccacagattgccgcactgaaggaagagactgaagaggaggtccaggatacaagactgtgactg
actgagatacagcgtacctcagctcagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtga
aaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaatt
gcattcattttatgtttcaggttcagggggagggtgtgggagggtttttCTGGAGAGTTTTAAACAGAAGTAACAG
GGCCACTTTGGCTAATGTTTTAGGCTATTCTGTAGGGAGACAAGGGAGGAAGCAAGGAG
25 ATGAGTTAGGAGTCTATTGTGCCAGTTCAGGCAAGTGATGATGGTGGCTTGATCCAGGTA
GTAGTGGAAGTAGTATAGTAGGAAGTGATCAGATTGAGGACATGCTTTGAAGGAAGATCCA
ATAGGATTAATGGATAAGTTGAACAATGGCATATGAGAAAAGTCACAGAGGAGTCAAAGAT
GATTCCAAGCTTTCTGGACTGAGTAACTGGAAGGATAAATGTGCCGTTTACTAGAAAGATA
ATGGGAGAAACAGGTTTTGGATGGAGCTTGTTTTGGGAATATTAAGTTTGAAATGCCTATT
30 TGACATCCAAATAGAGATGTTAGTTGGATGTACAAGTCTAGTTTCAAGGAAGAGGGGGCTG
GTAGTGTGAAGATGGGGCTGGATAAGATTCTAAAGGAAAGAGGGTTGAGGTAACACGTG
CGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCT**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC**
CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCC
GGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ
35 ID NO: 341).

Las letras mayúsculas en negrita corresponden a la secuencia que comprende las ITR de AAV (SEQ ID NO: 15 para la ITR del extremo 5' y SEQ ID NO: 16 para la ITR de 3'); las letras

mayúsculas subrayadas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende los brazos de homología 5' y 3' (SEQ ID NO: 348 y SEQ ID NO: 349, respectivamente); las letras mayúsculas en cursiva corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el sitio de empalme aceptor (SEQ ID NO: 1); las letras minúsculas (sin negrita) corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende los exones 11-27 de CFTR (SEQ ID NO: 37); y las letras minúsculas en negrita corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende elementos UTR 3' (SEQ ID NO: 159).

Sitio diana 5343 del intrón 10 de CFTR

sgRNA:

tgcttctccctgtctccctaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCCAAAUGC CGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 33), en donde las letras minúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el espaciador de sgRNA y las letras mayúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el andamiaje de sgRNA.

Donador molde:

**CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCG
TCGGGCGACCTTTGGTGCCTCGCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTTATCATTTCAACTTATACACA
GGAGGAATTTCTCTCTATATAAAGTGATCCTAGAAATCATAATGAAAAATATCACCAACTCAT
TAGGAAAATGTACAAAGGATTGAATAGATATCTCATCAAAAATAAAAAATATAAGTGGCCTTT
AAACATTGAAAGGTAACATTTGAACAAAGACTTGCCAGGAGGTGAGGGATTAGGGAATGCA
GACTCTGGGAAGAGTCTTCCAAGTAGCAGGTGAAGCAAGTGCAAAGCTTTCAGATGGGAC
TGACTATACCTGTCTGGTTTGAAGAACAGTAAGGAGGTCACTGAGGCTGGCATAGAGTAA
GACAGGGAGGGTAGAATACTGTCAGAGAAGTAATCGGCGGTGGAGGTAGGGGGTAAACC
ATAAAGTGCTCGTAAAGACTAAGGCTTATTTCTCTGGGTGAGATTAGAGGCCACTGGAGAG
TTTTAAACAGAAGTAACAGGGCCACTTTGGCTAATGTTTTTAGGCTATTCTGTAGTATACAC
TTCTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAA
TAATGATGGGTTTTATTTCCAGacttctctgctgatggatcatcatggcgagctggaaccagtgaggggaagatcaa
acactcaggacggtattcttttgcagtcagttctcatggatcatgctgggaccattaaggagaatatcattttggagtgtcctacgatga
ataccggtacagaagcgtgatcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagttcgagaaaaagataacatcgtgctggg
ggagggcgggattactctgagtgaggccagcgggcccagaatctcactggctcgcgagtgacaaggacgctgatctgtatctgct
ggactctcccttcggctacctggacgtgctgaccgagaaagaaatcttcgagagttgctgctgtaagctgatggctaacaaaaccgg
attctggtgacatcaaagatggaacacctaagaaagcagacaaaatcctgattctgcatgagggctcaagctactttatgggacctt
cagcgaactgcagaatctgcagcccgaattttcctctaagctgatgggatgtgactccttgatcagttctgcccgaaggcgcaactc
catcctgactgagaccctgcacagattcagcctggaaggcgagcgtcccgtgagctggacagagactaagaaacagctctttaagc
agacaggcgagttcggggaaaagcgaaaaaatagcatcctgaacccaatcaatagtattcggaagttctcaatcgtgcagaaaac
tccctgcagatgaacggcattgaggaagactccgatgagccactggaacgacggctgagcctgggcccgaattccgagcagggga**

gaagccatcctgcctagatcagcgtcatttccactggcccaaccctgcaggctagaaggcgccagagtgtgctgaatctgatgaca
 cactcagtcacacaggccagaaatccatcggaagactaccgctctacaagaaaagtgagctggtccacaggcaaacctga
 ctgagctggacatctacagccggcggctgtcccaggagaccgggtggaaatttctgaggaaatcaatgaggaagatctgaagga
 atgcttttctgacgatatggagagatccccgcggtgacaacttgaacacttacctgcgctatattaccgtccacaagtctctgattttgt
 5 cctgatctggtgtctggtcatcttctggtgaggtgcagccagcctggtggtcctgtggtgctgggaaacacccactgcaggaca
 aggggaattctacacatagtagaaacaatagctacgccgtgatcattacctccacaagttcatactatgtcttctacatctatggtggcgt
 cgctgatacactgctggcaatggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactgtcttaagattctgcaccataaaatg
 ctgcattctgtgctgcaggctcaatgagtaccctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatcggttagcaaaagacatcgcc
 attctggacgatctgctgccttgaccattttgatttcatccagctgctgctgatcgtgattggagcaatcgctgtggtcgccgtgctgcag
 10 ccttacatttctgcgctactgtgccagtcattgtgaccttcatcatgtgcgcgctatttctgcagaccagccagcagctgaagcagct
 ggagtctgaaggccggagtccaatctttacacacctggtgacttccctgaaaggactgtggacctgagagccttcggcaggcagcc
 ctactttgagacactgttcacaaggctctgaacctgcatactgcaaattggttctgtatctgtctaccctcgatggttccagatgcggat
 cgagatgatttctgtatcttttattgccgtcaccttcatcagcattctgaccacagggggaggagaaggcagagtgggcatcattctg
 actctggccatgaacatcatgagtaccctgcagtggtgctgaatagctccattgacgtggattcactgatgcgctcagtcagccgagt
 15 gtttaagttcatcgacatgcccacagaggggaagcctactaaatctaccaagccctacaaaacggacagctgagcaaagtgatg
 atcattgaaaattcccatgtaagaaagacgacatctggcctagcggcgggagatgaccgtgaaggatctgaccgtaaatacac
 agaaggaggcaacgaattctggagaatatctcttttctattagtcaggacagcgagtgggactgctgggacgaacagggtcag
 gaaagagcactctgctgtccgattcctgaggctgctgaatactgaggggagaaatccagattgacggcgtgtcctgggattctatcac
 cctgcagcagtgagaaaggcttttgagtcacccctagaaagtgtttatttccagcggcacattcaggaagaacctggaccatac
 20 gaacagtggtccgatcaggagatctggaaagtcgcagacgaagtgggactgcgctctgtgattgaacagtttctgggaagctgga
 ctctgctggttgatgggggatgctgctgagccacggccataaacagctgatgtgcctggccggagtgtgctgtcaaaggctaa
 aatcctgctgctggacgagccaagcggccacctggaccccgtagcctaccagatcattagaaggacactgaagcaggcatttgcg
 actgcaccgtgatcctgtgcgagcatcgcatgaagctatgctggagtgcagcagttcctggtcatcgaggaaaacaaggctccggc
 agtatgactctattcagaaactgctgaatgagcggagtctgtttagacaggccatctcaccagcgataggggtgaagctgttcctcac
 25 cgcaactctagtaagtgtaaatccaagccacagattgccgactgaaggaagagactgaagaggaggtccaggatacaagactgt
 gactgactgagatacagcgtaccttcagctca**cagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactagaatgca**
gtgaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaa
caattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggtttttGGAGACAAGGGAGGAAGCAAGGA
GATGAGTTAGGAGTCTATTGTGCCAGTTCAGGCAAGTGATGATGGTGGCTTGATCCAGGT
 30 **AGTAGTGGAAGTAGTATAGTAGGAAGTGATCAGATTCAGGACATGCTTTGAAGGAAGATCC**
AATAGGATTAATGGATAAGTTGAACAATGGCATATGAGAAAAGTCACAGAGGAGTCAAAGA
TGATTCCAAGCTTTCTGGACTGAGTAACTGGAAGGATAAATGTGCCGTTTACTAGAAAGAT
AATGGGAGAAACAGGTTTTGGATGGAGCTTGGTTTGGGAATATTAAGTTTGAAATGCCTAT
TTGACATCCAAATAGAGATGTTAGTTGGATGTACAAGTCTAGTTTCAAGGAAGAGGGGGCT
 35 **GGTAGTGTGAAGATGGGGCTGGATAAGATTCTAAAGGAAAGAGGGTTGATAAGAAGAGAA**
AGGGGTGTAGGGGTTAGCCTAAGGGCATTCTAAGTATTAGAGGTTAAGGAGGGTAACCA
CGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCC
ACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGAC

GCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
(SEQ ID NO: 342).

Las letras mayúsculas en negrita corresponden a la secuencia que comprende las ITR de AAV (SEQ ID NO: 15 para la ITR del extremo 5' y SEQ ID NO: 16 para la ITR de 3'); las letras mayúsculas subrayadas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende los brazos de homología 5' y 3' (SEQ ID NO: 350 y SEQ ID NO: 351, respectivamente); las letras mayúsculas en cursiva corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el sitio de empalme aceptor (SEQ ID NO: 1); las letras minúsculas (sin negrita) corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende los exones 11-27 de CFTR (SEQ ID NO: 37); y las letras minúsculas en negrita corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende elementos UTR 3' (SEQ ID NO: 159).

Sitio diana 5538 del intrón 10 de CFTR

15 **sgRNA:**

tgccatagagaaaagtcacagGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCCAAAU
GCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 34), en donde las
letras minúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el espaciador de
sgRNA y las letras mayúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el
andamiaje de sgRNA.

Donador molde:

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCG
TCGGGCGACCTTTGGTGCCTCGCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGGATTAGGGAATGCAGACTC
25 TGGGAAGAGTCTTCCAAGTAGCAGGTGAAGCAAGTGCAAAGCTTTCAGATGGGACTGACT
ATACCTGTCTGGTTTGAAGAACAGTAAGGAGGTCACTGAGGCTGGCATAGAGTAAGACAG
GGAGGGTAGAATACTGTCAGAGAAGTAATCGGCGGTGGAGGTAGGGGGTAAACCATAAA
GTGCTCGTAAAGACTAAGGCTTATTTCTCTGGGTGAGATTAGAGGCCACTGGAGAGTTTTA
AACAGAAGTAACAGGGCCACTTTGGCTAATGTTTTTAGGCTATTCTGTAGGGAGACAAGGG
30 AGGAAGCAAGGAGATGAGTTAGGAGTCTATTGTGCCAGTTCAGGCAAGTGATGATGGTGG
CTTGATCCAGGTAGTAGTGGAAGTAGTATAGTAGGAAGTGATCAGATTGAGGACATGCTTT
GAAGGAAGATCCAATAGGATTAATGGATAAGTTGAACAATGGCATATGAGAAAAGTCATAT
ACACTTCTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGAC
CTAATAATGATGGGTTTTATTTCCAGacttctctgctgatggtcatcatgggagctggaaccagtgaggggaag
35 atcaaactcaggacggattcttttgcagtcagttctcatggatcatgctgggaccattaaggagaatatcattttggagtgctctac
gatgaataccggtacagaagcgtgatcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagttcgagaaaaagataacatcgtg
ctgggggagggcgggattactctgagtgaggccagcgggccagaatctcactggctcgcgagtgataaggacgctgatctgta
tctgctgactctccctcggctacgtgacgtgctgaccgagaaagaaatctcgagagttgctgctgtaagctgatggctaacaaaa

cccggattctggtgacatcaaagatggaacacctgaagaaagcagacaaaatcctgattctgcatgagggtcaagctactttatgg
 gaccttcagcgaactgcagaatctgcagccccgattttcctctaagctgatgggatgtgactccttgatcagttctctgccaaaggcgc
 aactccatcctgactgagacctgcacagattcagcctggaaggcgacgctcccgtagctggacagagactaagaaacagtcttt
 aagcagacaggcgagttcggggaaaagcgaaaaaatagcatcctgaacccaatcaatagtattcggaagttctcaatcgtgcaga
 5 aaactcccctgcagatgaacggcattgaggaagactccgatgagccactggaacgacggctgagcctggtgccgattccgagca
 gggagaagccatcctgcctagatcagcgtcatttccactggccaacctgcaggctagaaggcgccagagtgtgctgaatctgat
 gacacactcagtcaaccagggccagaatatccatcggaagactaccgctctacaagaaaagtgagctggctccacaggcaaa
 cctgactgagctggacatctacagccggcgtgtcccaggagaccgggctggaaatttctgaggaaatcaatgaggaagatctga
 aggaatgcttttcgacgatatggagagtatccccgccgtgacaactggaacactacctgcgctatattaccgtccacaagtctctgat
 10 tttgtcctgatctggtgctgctatcttctggctgaggtcgagccagcctggtggtcctgtggtgctgggaaacacccactgcag
 gacaaggggaattctacacatagtagaacaatagctacgccgtgatcattacctccacaagttcatactatgtcttctacatctatgtg
 ggcgtcgctgatacactgctggcaatggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactgtcttaagattctgcaccata
 aaatgctgcattctgtgctgcaggctccaatgagtaccctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatcggttagcaaagaca
 tcgccattctggacgatctgctgcctctgaccattttgattcatccagctgctgctgatcgtgattggagcaatcgctgtggtcgccgtgct
 15 gcagccttacatttctgctactgtgccagtcattgtggccttcatcatgctgcgcctatttctgcagaccagccagcagctgaag
 cagctggagtctgaaggccggagtccaatctttacacacctggtgacttccctgaaaggactgtggacctgagagccttcggcagg
 cagccctactttgagacactgttcacaaggctctgaacctgcatactgcaaattggttctgtatctgtctaccctgcgatggttcagatg
 cggatcgagatgatttctgatcttttattgcccgtcaccttcatcagcattctgaccacaggggagggaaggcagagtgggcatc
 attctgactctggccatgaacatcatgagtaccctgcagtggtgtgaatagctccattgacgtggattcactgatgcgctcagtcagc
 20 cgagtgtttaagttcatcgacatgccacagaggggaagcctactaaatctaccaagccctacaaaaacggacagctgagcaaag
 tgatgatcattgaaaattcccatgtcaagaaagacgacatctggcctagcggcgggcagatgaccgtgaaggatctgaccgctaaat
 acacagaaggaggcaacgcaattctggagaatatctccttttctattagtccaggacagcagtgaggactgctgggacgaacaggggt
 caggaaagagcactctgctgtccgcatttctgaggctgctgaatactgaggagaaatccagattgacggcgtgtcctgggattctat
 caccctgcagcagtgagaaaggcttttgagtcacccctcagaaagtgtttattttcagcggcacattcaggaagaacctggacca
 25 tacgaacagtggtccgatcaggagatctgaaagtcgcagacgaagtgggactgcgctctgtgattgaacagtttctgggaagctg
 gacttcgtcctggtggatggggatgcgtgctgagccacggccataaacagctgatgtgcctggccggagtgctgtctcaaaggct
 aaaatcctgctgctggacgagccaagcgccacctggaccccgtagctaccagatcattagaaggacactgaagcaggcatttg
 ccgactgcaccgtgatcctgtgcgagcatcgattgaagctatgtggagtgcagcagttcctggtcatcaggaaaacaagggtcc
 ggcagtatgactctattcagaaactgctgaatgagcggagtctgttagacaggccatctcaccagcgataggggtgaagctgttccct
 30 caccgcaactctagtaagtgtaaatccaagccacagattgccgcactgaaggaagagactgaagaggaggtccaggatacaaga
 ctgtgactgactgagatacagcgtaccttcagctcacagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactagaat
gcagtgaaaaaaatgctttattgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaa
caacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggtttttCAGAGGAGTCAAAGATGATTC
CAAGCTTTCTGGACTGAGTAACTGGAAGGATAAATGTGCCGTTTACTAGAAAGATAATGGG
 35 AGAAACAGGTTTTGGATGGAGCTTGGTTTGGGAATATTAAGTTTGAAATGCCTATTTGACAT
CCAAATAGAGATGTTAGTTGGATGTACAAGTCTAGTTTCAAGGAAGAGGGGGCTGGTAGT
GTGAAGATGGGGCTGGATAAGATTCTAAAGGAAAGAGGGTTGATAAGAAGAGAAAGGGGT
GTAGGGGTTAGCCTAAGGGCATTCTAAGTATTAGAGGTTAAGGAGGTGGGTGAAGAAAAC

CCAATAAAATAAAAGTCTGAGAAGACAAAGCTAGTGAATGAATGTGGTATCCCGGAACCCA
 ACTGATGTCAAGCAGAAGGGTGTATCAACTAGGTCAAATGCTCATTTCATCAAGTAAGATG
 AACTGTTATAATTAACCGGTGTCTTCTGAAATACGGAGATAACTCGTGACTTAGGTAACCA
 CGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCTCCCT**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCC**
 5 **ACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGAC**
GCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
 (SEQ ID NO: 343).

Las letras mayúsculas en negrita corresponden a la secuencia que comprende las ITR de AAV
 10 (SEQ ID NO: 15 para la ITR del extremo 5' y SEQ ID NO: 16 para la ITR de 3'); las letras
 mayúsculas subrayadas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende los brazos
 de homología 5' y 3' (SEQ ID NO: 352 y SEQ ID NO: 353, respectivamente); las letras
 mayúsculas en cursiva corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el sitio de
 empalme aceptor (SEQ ID NO: 1); las letras minúsculas (sin negrita) corresponden a la
 15 secuencia de nucleótidos que comprende los exones 11-27 de CFTR (SEQ ID NO: 37); y las
 letras minúsculas en negrita corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende
 elementos UTR 3' (SEQ ID NO: 159).

Sitio diana 6150 del intrón 10 de CFTR

sgRNA:

ccctattctttgatatactccGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAUGCC
 GUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 35), en donde las letras
 minúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el espaciador de sgRNA
 y las letras mayúsculas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el andamiaje
 25 de sgRNA.

Donador molde:

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCG
TCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCTGCGGCCGCACGCGTGGAATATTAAGTTTGAAATGC
 30 CTATTTGACATCCAAATAGAGATGTTAGTTGGATGTACAAGTCTAGTTTCAAGGAAGAGGG
GGCTGGTAGTGTGAAGATGGGGCTGGATAAGATTCTAAAGGAAAGAGGGTTGATAAGAAG
AGAAAGGGGTGTAGGGGTTAGCCTAAGGGCATTCTAAGTATTAGAGGTTAAGGAGGTGGG
TGAAGAAAACCCAATAAAATAAAAGTCTGAGAAGACAAAGCTAGTGAATGAATGTGGTATC
CCGGAACCCAACTGATGTCAAGCAGAAGGGTGTATCAACTAGGTCAAATGCTCATTTCATC
 35 AAGTAAGATGAACTGTTATAATTAACCGGTGTCTTCTGAAATACGGAGATAACTCGTGACT
TAATGAAAGCAATAGTAGAGAAGGTCAAACCTTGACCAGAATGAAATTAGAAAGAATAAGAG
GAAAGAAAAGACCAAATACAGACAACCATTGATGCCTTATTCTTTTGATATAC TATACACTT
CTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATA

ATGATGGGTTTTATTTCCAGacttctctgtgatggtcatcatgggcgagctggaacccagtgaggggaagatcaaaca
 ctcaggacggatttcttttgcagtcagttctcatggatcatgctgggaccattaaggagaatatcattttggagtgctctacgatgaata
 ccggtacagaagcgtgatcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagttcgagaaaaagataacatcgtgctggggga
 gggcgggattactctgagtgaggccagcgggccagaatctactggctcgcgagtgtagaaggacgctgatctgtatctgctgga
 5 ctctcccttcggctacctggacgtgctgaccgagaaagaaatcttcgagagttgctgtgtaagctgatggctaacaaaacccggattc
 tggtagacatcaaagatggaacacctgaagaaagcagacaaaaatcctgattctgcatgagggtcaagctactttatgggaccttcag
 cgaactgcagaatctgcagcccgattttctctaagctgatgggatgtgactcctttgatcagttctgcccgaaggcgcaactccatc
 ctgactgagacctgcacagattcagcctggaaggcgacgctcccgtagctggacagagactaagaaacagctctttaagcagac
 aggcgagttcggggaaaagcgaaaaatagcatcctgaacccaatcaatagtattcggaagttctaatcgtgcagaaaactcccc
 10 tgcagatgaacggcattgaggaagactccgatgagccactggaacgacggctgagcctgggtgccgattccgagcagggagaag
 ccatcctgcctaggatcagcgtcatttccactggcccaacccctgcaggctagaaggcgccagagtgctgtaactgtatgacacactc
 agtcaaccagggccagaatatccatcggaagactaccgctctacaagaaaagtgagctggctccacaggcaaacctgactgag
 ctggacatctacagccggcggctgtccaggagaccgggctggaatttctgaggaaatcaatgaggaagatctgaaggaatgcttt
 ttcgacgatatggagagtatccccgccgtgacaacttgaacacttacctgcgctatattaccgtccacaagtctctgattttgtcctgat
 15 ctgggtctggtcatcttctggctgaggtcgagccagcctgggtgctgtggtgctgggaaacaccccactgcaggacaagggg
 aattctacacatagtagaaacaatagctacgccgtgatcattacctccacaagttcatactatgtcttctacatctatgtgggctgctga
 tacactgctggcaatggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactgtcttaagattctgcaccataaaatgtgctcatt
 ctgtgctgcagggtccaatgagtacctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatcggtttagcaaagacatcgccattctgg
 acgatctgctgcctctgacctttttgatttcatccagctgctgctgatcgatggagcaatcgctgtggtcgccgtgctgcagccttaca
 20 tttcgtcgctactgtgccagtcattgtggccttcatcatgctgcgcgcctatttctgcagaccagccagcagctgaagcagctggagct
 gaaggccggagtcgaatctttacacacctgggtgacttccctgaaaggactgtggaccctgagagccttcggcaggcagccctactttg
 agacactgttccacaaggctctgaacctgcatactgaaaattggtttctgtatctgtctaccctgcgatggttcagatgcggatcgagat
 gattttcgtgatcttttcatgcccgtcaccttcatcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtgggcatcattctgactctg
 gccatgaacatcatgagtacctgcagtggtgtgaatagctccattgacgtggattcactgatcgctcagtcagccgagtggttaa
 25 gttcatcgacatgccacagaggggaagcctactaaatctaccaagccctacaaaaacggacagctgagcaaagtgtatgacatt
 gaaaattcccatgtcaagaaagacgacatctggcctagcggcgggcagatgaccgtgaaggatctgaccgctaaatacacagaa
 ggaggcaacgcaattctggagaatatctcttttctattagtcaggacagcgagtgggactgctgggacgaacaggggtcaggaaa
 gagcactctgctgccattcctgaggctgctgaatactgagggagaaatccagattgacggcgtgtcctgggattctatcacctgc
 agcagtgaggaaaaggcttttggagtcacccctcagaaagtgttttattttcagggcacattcaggaagaacctggaccatacgaaca
 30 gtggccgatcaggagatctggaagtcgcagacgaagtgggactgcgctctgtgattgaacagtttctgggaagctggactctgc
 ctgggtgatgggggatgctgctgagccacggccataaacagctgatgtgcctggcccgagtgctgtcaaggctaaaaatcctg
 ctgctggacgagccaagcgcccacctggaccccgtagcctaccagatcattagaaggacactgaagcaggcatttgcgactgca
 ccgtgatcctgtgagcagcatcgattgaagctatgctggagtccagcagttcctggtcatcgaggaaaacaagggtccggcagtatg
 actctattcagaaaactgctgaatgagcggagtctgttttagacaggccatctcaccagcgatagggtgaagctgttccctcacccgaa
 35 ctctagtaagtgtaaaatcaaagccacagattgccgactgaaggaagagactgaagaggaggtccaggatacaagactgtgactg
 actgagatacagcgtaccttcagctcagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtga
 aaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaatt
 gcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggtttttTCCTGGAGTCCACTTGCTAATAACAATTG

ACCCTTAAACAATACAGGCTTGAAGTGCATGGGTCCACTTATTTGTGAATTTTTTTTCAGTT
 AATACATTGGAAAATTTTTGGGGTTTTTTGACAATTTGAAAAAACTCACAACTGTCTAGCCT
 AGAAATACCGAGAAAATTAAGAAAAAGTAAGATATGCCATGAATGCATAAAATATATGTAGA
 CACTAGCCTATTTTATCATTTGCTACTATAAAATATACACAATCTATTATAAAAAGTTAAAT
 5 TATCAAACTTAACACACACTAACACCTACCCTACCTGGCACCATTACAGTAAAGAGAAAT
 GTAAATAAACATAAAAATGTAGTATTAAACCATAATGGCATAAACTAATTGTAGTACATATG
 GTACTACTGTAATAATTTGGAAGCCACTTCCTGTTGCTATTACGGTAAGCTCAAGCATTGTG
 GATAGCCATTTAAACACCCAGTGATGCTAATCAGGTAACCACGTGCGGACCGAGGCTGC
 AGCGTCGTCCTCCCT**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCT**
 10 **CGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGG**
CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 344).

Las letras mayúsculas en negrita corresponden a la secuencia que comprende las ITR de AAV
 (SEQ ID NO: 15 para la ITR del extremo 5' y SEQ ID NO: 16 para la ITR de 3'); las letras
 15 mayúsculas subrayadas corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende los brazos
 de homología 5' y 3' (SEQ ID NO: 354 y SEQ ID NO: 355, respectivamente); las letras
 mayúsculas en cursiva corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende el sitio de
 empalme aceptor (SEQ ID NO: 1); las letras minúsculas (sin negrita) corresponden a la
 secuencia de nucleótidos que comprende los exones 11-27 de CFTR (SEQ ID NO: 37); y las
 20 letras minúsculas en negrita corresponden a la secuencia de nucleótidos que comprende
 elementos UTR 3' (SEQ ID NO: 159).

Resultados

25 *Diseño de sistemas de edición génica de AAV duales para corregir mutaciones del gen*
CFTR: la Fig. 1 muestra un esquema que representa estrategias de edición génica de CFTR de
 ejemplo. Más del 99 % de las mutaciones que causan fibrosis quística se ubican entre el exón
 11 y el 27 del gen CFTR. AAV puede proporcionar un donador de ADN monocatenario para una
 inserción de ADN eficiente mediada por reparación homóloga (HDR) en un sitio de corte de
 30 CRISPR-Cas9. Los conjuntos de donadores de AAV de superexones del CFTR se diseñaron
 para contener brazos de homología izquierdo y derecho de sitios de corte de CRISPR-Cas9
 seleccionados en el intrón 10 del CFTR (LHA y RHA), un cDNA que comprende el exón 11 hasta
 el exón 27 del gen CFTR de tipo silvestre, y un sitio de empalme aceptor y señal de parada. La
 Fig. 1A describe una estrategia basada en dos vectores AAV. El primer vector AAV expresa
 35 saCAS9 y un sgRNA para inducir un corte de ADN bicatenario específico en el intrón 10 del gen
 CFTR, y el segundo vector AAV actúa como un donador molde para la HDR. La Fig. 1B describe
 una estrategia basada en un solo vector AAV.

Identificación de complejos de saCAS9-gRNA efectivos para la edición génica en el intrón

10 del CFTR: se sometieron a electroporación células progenitoras pulmonares (LPC) con mRNA de saCAS9 junto con un sgRNA dirigido a un sitio ubicado en el intrón de CFTR (ver Fig. 2). Los controles positivos y negativos fueron células sometidas a electroporación con mRNA de saCAS9 junto gRNA de VEGFA o sin gRNA, respectivamente. Las tasas de indel se determinaron mediante el uso del ensayo TIDE 72 horas después de la electroporación. Los gRNA con tasas de indel por encima del valor umbral se consideraron como sitios de gRNA activos. El valor umbral se estableció en una tasa de indel de 7,5 % (4 valores de SD por encima de la media del control negativo). Las tasas de supervivencia de las células se muestran en porcentajes donde las células sometidas a electroporación simuladas se establecieron arbitrariamente en 100 %. Tasas de indel y de supervivencia de las células en la Fig. 2 representan los valores promedio de 2 experimentos independientes (n=3). Se seleccionaron 10 gRNA candidatos en función de las tasas de indel, las tasas de supervivencia de las células y la ubicación en el intrón 10 del CFTR (triángulos blancos). Ver la TABLA 1 que indica las secuencias de sgRNA analizadas en este estudio junto con las tasas de INDEL y de supervivencia de las células.

A continuación, se sometieron a electroporación las LPC derivadas de dos donadores de fibrosis quística (14071 y 14335) con mRNA de saCAS9 junto con un gRNA dirigido a uno de los 10 sitios diana del intrón 10 del CFTR candidatos. Las tasas de Indel se determinaron mediante el uso del ensayo TIDE 72 h después de la electroporación. No hubo diferencias significativas en las tasas de Indel entre los donadores de LPC para cada uno de los 10 sitios diana de sgRNA candidatos (Fig. 3).

Determinación de la concordancia de los patrones de indel de los 10 sitios diana de sgRNA candidatos: los patrones de Indel para los 10 sitios diana de sgRNA candidatos (identificados y marcados en la Fig. 2) se determinaron en LPC de dos donadores independientes. Las tasas de Indel se determinaron mediante el uso del ensayo TIDE 72 h después de la electroporación. No hubo diferencias significativas en las tasas de Indel entre los donadores de LPC para cada uno de los 10 gRNA candidatos seleccionados (Fig. 4).

Determinación de las tasas de inserción de superexones de CFTR mediante HDR en LPC: las LPC se sometieron a electroporación con mRNA de saCAS9 junto con un sgRNA dirigido a uno de los 10 sitios diana candidatos. Las células LPC se sembraron con medio que contenía vectores AAV con superexones de CFTR. Las tasas de recombinación homóloga (HDR) se determinaron mediante ddPCR después de 5 días de tratamiento en LPC y después de 5 semanas de diferenciación de LPC en HBE. La función del CFTR se determinó en HBE diferenciados en 5 semanas mediante la técnica de Ussing (ver Fig. 6). Las tasas de recombinación homóloga (HDR) de los superexones 11-27 de CFTR y supervivencia de las

células correspondientes a los 10 sitios diana de gRNA candidatos en LPC se muestran en la Fig. 7.

Determinación de la corrección funcional del CFTR en HBE derivadas de LPC editadas genéticamente: las LPC dF508/dF508 se sometieron a electroporación con o sin mRNA de saCAS9 y un sgRNA dirigido a uno de los 10 sitios diana candidatos. Las células LPC se sembraron con medio que contenía vectores AAV con superexones de CFTR. Las tasas de recombinación homóloga (HDR) se determinaron mediante ddPCR después de 5 días de tratamiento en LPC y después de 5 semanas de diferenciación de LPC en HBE. La función del CFTR se determinó en HBE diferenciados en 5 semanas mediante la técnica de Ussing (ver Fig. 6). Las tasas de recombinación homóloga (HDR) de los superexones 11-27 de CFTR y corrección funcional correspondientes a los 10 sitios diana de gRNA candidatos en LPC se muestran en la Fig. 8.

OTRAS MODALIDADES

Todas las características descritas en esta memoria descriptiva pueden combinarse de cualquier manera. Cada característica descrita en esta memoria descriptiva puede reemplazarse por una característica alternativa que tenga el mismo fin o un fin equivalente o similar. Por lo tanto, a menos que se indique expresamente lo contrario, cada característica descrita es solo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

A partir de la descripción anterior, un experto en la técnica puede determinar fácilmente las características esenciales de la presente divulgación y, sin apartarse del espíritu y alcance de esta, puede realizar diversos cambios y modificaciones de la divulgación para adaptarla a diversos usos y condiciones. Por lo tanto, también se encuentran otras modalidades dentro de las reivindicaciones.

EQUIVALENTES

Si bien se han descrito e ilustrado diversas modalidades de la invención en este documento, los expertos en la técnica concebirán fácilmente otros medios y/o estructuras para llevar a cabo la función y/u obtener los resultados y/o una o más de las ventajas que se describen en este documento, y cada una de dichas variaciones y/o modificaciones se considerarán dentro del alcance de las modalidades de la invención descritas en este documento. De manera más general, los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que se pretende que todos los parámetros, dimensiones, materiales y configuraciones que se describen en este documento sean a modo de ejemplo y que los parámetros, dimensiones, materiales y/o configuraciones reales dependerán de la aplicación o las aplicaciones específicas para las cuales se utilicen las indicaciones de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán o podrán determinar, con no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes de las modalidades de la invención

específicas descritas en este documento. Por lo tanto, debe entenderse que las modalidades anteriores se presentan a modo de ejemplo solamente y que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de estas, las modalidades de la invención se pueden llevar a la práctica de una forma diferente a la descrita y reivindicada específicamente. Las modalidades de la invención de la presente descripción se refieren a cada rasgo, sistema, artículo, material, kit y/o método individual según se describe en este documento. Además, cualquier combinación de dos o más de dichos rasgos, sistemas, artículos, materiales, kits y/o métodos, si dichos rasgos, sistemas, artículos, materiales, kits y/o métodos no son incompatibles entre sí, se incluye dentro del alcance de la invención de la presente divulgación.

Debe entenderse que todas las definiciones, según se definen y usan en este documento, prevalecerán frente a las definiciones del diccionario, definiciones en documentos incorporados mediante referencia y/o significados habituales de los términos definidos.

Todas las referencias, patentes y solicitudes de patente descritas en este documento se incorporan mediante referencia con respecto a la materia por la que se cita cada una, que en algunos casos puede abarcar la totalidad del documento.

Debe entenderse que los artículos indefinidos «un» y «una», como se usan en este documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, significan «al menos un/a».

Debe entenderse que la expresión «y/o», como se usa en este documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, significa «uno o ambos» de los elementos que así se unen, *es decir*, elementos que están presentes en conjunción en algunos casos y que están presentes en disyunción en algunos casos. Múltiples elementos enumerados con «y/o» deben interpretarse de la misma forma, *es decir*, como «uno o más» de los elementos que así se unen. Otros elementos pueden estar presentes opcionalmente, además de los elementos identificados específicamente por la expresión «y/o», estén relacionados o no con los elementos identificados específicamente. Por lo tanto, como ejemplo no limitativo, una referencia a «A y/o B», cuando se utiliza junto con términos abiertos como «que comprende» puede hacer referencia, en una modalidad, solo a A (incluidos opcionalmente elementos distintos de B); en otra modalidad, solo a B (incluidos opcionalmente elementos distintos de A); en incluso otra modalidad, a A y B juntos (incluidos opcionalmente otros elementos); etc.

Debe entenderse que «o», como se usa en este documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, tiene el mismo significado que «y/o», según se definió anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan artículos en una enumeración, «o» o «y/o» se interpretarán como inclusivos, es decir, la inclusión de al menos uno, pero también la inclusión de más de uno, de una serie o enumeración de elementos y, opcionalmente, artículos adicionales no incluidos en la enumeración. Solo los términos que indican claramente lo contrario, como «solo uno/a de» o «exactamente uno/a de» o, cuando en las reivindicaciones se usa «que consiste en», harán referencia a la inclusión de exactamente un elemento de una serie o enumeración de elementos.

En general, solamente se interpretará que el término «o», como se usa en este documento, indica alternativas excluyentes (es decir, «uno o el otro, pero no ambas») cuando está precedido por términos de exclusividad, como «ya sea», «uno/a de», «solo uno/a de» o «exactamente uno/a de». «Que consiste esencialmente en», cuando se usa en las reivindicaciones, tendrá su significado habitual según se usa en el área de derecho de patentes.

Como se usa en este documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, debe entenderse que la frase «al menos uno», con referencia a una enumeración de uno o más elementos, significa al menos un elemento seleccionado de uno cualquiera o más de los elementos en la enumeración de elementos, pero no necesariamente incluye al menos uno de cada uno de los elementos enumerados específicamente dentro de la enumeración de elementos y no excluye ninguna combinación de elementos en la enumeración de elementos. Esta definición también permite que puedan estar presentes opcionalmente elementos distintos de los elementos identificados específicamente dentro de la enumeración de elementos a la que hace referencia la frase «al menos uno», estén relacionados o no con aquellos elementos identificados específicamente. Por lo tanto, como ejemplo no limitativo, «al menos uno de A y B» (o, de forma equivalente, «al menos uno de A o B» o, de forma equivalente, «al menos uno de A y/o B») pueden hacer referencia, en una modalidad, a al menos uno, incluido opcionalmente más de uno, de A, sin ningún B (e incluidos opcionalmente elementos distintos de B); en otra modalidad, a al menos uno, incluido opcionalmente más de uno, de B, sin ningún A (e incluidos opcionalmente elementos distintos de A); en incluso otra modalidad, a al menos uno, incluido opcionalmente más de uno, de A, y al menos uno, incluido opcionalmente más de uno, de B (e incluidos opcionalmente otros elementos); etc.

También debe entenderse que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en este documento que incluya más de una etapa o acción, el orden de las etapas o acciones del método no se limita necesariamente al orden en el que se indican las etapas o acciones del método.