

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 369**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/US2015/054780**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16057850**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15848462 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2025 EP 3204399**

54 Título: **Plásmidos poli (A) largos y métodos para la introducción de secuencias de poli (A) largas en el plásmido**

30 Prioridad:

09.10.2014 US 201462062098 P

13.05.2015 US 201562161107 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2025

73 Titular/es:

**SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL, DBA
SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE
(100.00%)
1900 9th Avenue
Seattle, WA 98101, US**

72 Inventor/es:

**SCHARENBERG, ANDREW M.;
JACOBY, KYLE y
GRIER, ALEXANDRA E.**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 015 369 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Plásmidos poli (A) largos y métodos para la introducción de secuencias de poli (A) largas en el plásmido

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense con serie n.º 62/062098, titulada "LONG POLY(A) PLASMIDS AND METHOD FOR INTRODUCTION OF LONG POLY(A) SEQUENCES INTO THE PLASMID" presentada el 9 de octubre de 2014, y de la solicitud provisional estadounidense con número de serie 62/161.107 titulada "LONG POLY(A) PLASMIDS AND METHOD FOR INTRODUCTION OF LONG POLY(A) SEQUENCES INTO THE PLASMID" presentada el 13 de mayo de 2015.

Referencia a la lista de secuencias, tabla, o lista de programas informáticos

La presente solicitud se presenta junto con una lista de secuencias en formato electrónico. La lista de secuencias se proporciona como un archivo titulado SCRI.098WO.TXT, creado el 7 de octubre de 2015, que tiene un tamaño de 180 kb. La información es el formato electrónico del listado de secuencias.

Declaración sobre la I+D patrocinada por el gobierno federal

Esta invención se realizó con el apoyo parcial del NICHD U19 AI096111, otorgado por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos y los Institutos Nacionales de Salud.

Campo de la invención

Los aspectos de la invención, tal como se describen en la presente memoria, incluyen composiciones y métodos relacionados con genes que permiten la generación de un ácido nucleico que tiene un tramo de poli(T) o un tramo de poli(A) de una longitud deseada. En la presente memoria se incluyen métodos para aumentar la estabilidad de un transcrito de ácido nucleico, mejorar la transcripción génica y mejorar la traducción de proteínas proporcionando uno o más de los ácidos nucleicos anteriormente mencionados. También se describen en la presente memoria métodos para mejorar la transcripción génica y mejorar la traducción de proteínas proporcionando uno o más de los ácidos nucleicos anteriormente mencionados que comprenden un gen que codifica una nucleasa y métodos para tratar una enfermedad con composiciones o células que comprenden los ácidos nucleicos.

Antecedentes de la invención

El aumento de la demanda de síntesis a gran escala de ARNm transcrito *in vitro* (IVT) se debe al uso creciente del ARNm para la expresión génica transitoria en la ingeniería celular *ex vivo* o en aplicaciones terapéuticas directas *in vivo*. Uno de los determinantes más importantes de la potencia de un ARNm IVT es la cola 3' de poliadenosina (poli(A)), cuya longitud se correlaciona directamente con la eficiencia de la traducción. Sin embargo, los métodos actuales para la generación a gran escala de ARNm IVT se basan en moldes derivados de plásmidos circulares, en los que los tramos homopoliméricos son muy inestables, lo que limita la longitud de la cola de la poli(A) codificada a menos de aproximadamente 120 pares de bases. Estos métodos son necesarios para generar ARNm que sean altamente estables para la traducción.

Resumen de la invención

Tal como se proporciona en la presente memoria, se proporcionan métodos novedosos para la generación de tramos de poli(A) extendidos usando un sistema de plásmido lineal descrito anteriormente. Se ha descubierto que el plásmido lineal es capaz de propagar de manera estable tramos de poli(A) de hasta al menos 500 pares de bases de longitud. Para facilitar la generación de ARNm IVT con tramos de poli(A) y extremos 3' codificados con precisión, se proporcionan alternativas con un plásmido lineal modificado, eliminando los sitios de restricción extraños, añadiendo una secuencia promotora T7 corriente arriba de un MCS extendido y añadiendo un sitio de restricción de tipo IIS único corriente abajo de la posición del tramo de poli(A) codificado. El plásmido resultante, denominado p (longitud variable extendida) (pEVL), se puede usar para generar ARNm IVT con longitudes definidas y consistentes y residuos terminales. La invención se establece en las reivindicaciones adjuntas.

Algunas alternativas se refieren a un polinucleótido que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,

15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1 a 55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa de restricción. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para fabricar un polinucleótido que tiene una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en el mismo, y en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos métodos pueden comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que comprenda al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprenda al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina y unir dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicha segundo ácido nucleico en un extremo, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1 a 55 pares de bases, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases, tales como, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases, de la timina más 5' o timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es

una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para elaborar un ácido nucleico. El método puede comprender proporcionar el polinucleótido según una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado por una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El método comprende proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que comprenda al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, y proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico, que comprende una pluralidad de nucleótidos de timina comprenda al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina y unir dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicha segundo ácido nucleico en un extremo, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1 a 55 pares de bases, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases, tales como, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases, de la timina más 5' o timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. El polinucleótido comprende además telómeros. El polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la

timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en los que el segundo nucleico el ácido comprende el sitio de escisión de endonucleasa, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tales como, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases, de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos

una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un ácido nucleico. El ácido nucleico puede fabricarse mediante un método según cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria. El método para elaborar un ácido nucleico puede comprender proporcionar el polinucleótido según una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado por una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. Algunos métodos pueden comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que comprenda al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprenda al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina y unir dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicha segundo ácido nucleico en un extremo, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1 a 55 pares de bases, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases, tales como, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases, de la timina más 5' o timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. El polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. Algunos polinucleótidos pueden comprender una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde

un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, el contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción

de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ADN. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan con una guanina, una citosina, una timina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para mejorar la transcripción de un gen. El método puede comprender proporcionar el polinucleótido según una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado por una cualquiera de una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una ARN polimerasa en presencia de nucleótidos. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y

la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. Algunos métodos pueden comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que comprenda al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprenda al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina y unir dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicha segundo ácido nucleico en un extremo, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1 a 55 pares de bases, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases, tales como, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases, de la timina más 5' o timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, el método se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para estabilizar un ARN durante la traducción *in vitro* a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas. El método puede comprender proporcionar el ácido nucleico según una cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un ácido nucleico fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y poner en contacto dicho ácido nucleico con un ribosoma, en presencia de aminoácidos y ARNt, en donde dicho ARN es estable a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas (por ejemplo, al menos o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 horas o dentro de un intervalo definido

por dos de los tiempos antes mencionados. El método para fabricar el ácido nucleico puede comprender proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado mediante cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. Algunos métodos pueden comprender proporcionar una primera

5 secuencia de ácido nucleico que comprenda al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprenda al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o

10 dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina y unir dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicha segundo ácido nucleico en un extremo, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1 a 55 pares de bases, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases, tales como, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases, de la timina más 5' o timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el

20 brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el

30 número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. Algunos polinucleótidos una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación

ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, el contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, el contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia

palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ADN. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan en una guanina, citosina, timina o uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ARN. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura igual a 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan en una guanina, citosina, timina o uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para estabilizar el ARN durante la traducción *in vivo* a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas en una célula. El método puede comprender transfectar en una célula el ácido nucleico según una cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un ácido nucleico fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria, colocar la célula en un recipiente de cultivo con medio, suministrar a la célula nutrientes y aminoácidos para la traducción e incubar la célula durante al menos, más de o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos antes mencionados para permitir la traducción. En algunas alternativas, el método para elaborar el ácido nucleico o el ARN comprende proporcionar el polinucleótido según una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado mediante una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. Algunos métodos pueden comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que comprenda al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprenda al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina y unir dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicha segunda ácido nucleico en un extremo, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1 a 55 pares de bases, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases, tales como, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases, de la timina más 5' o timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos

de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y

la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o Stul. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, la célula es una célula humana. En algunas alternativas, la célula se selecciona de un grupo que consiste en células primarias, células T primarias humanas, células CD4+ y células CD8+. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para aumentar y/o estabilizar la expresión de una proteína. El método puede comprender generar ARN a partir del polinucleótido de cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y traducir dicho ARN en un péptido. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el

número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el método para elaborar el polinucleótido puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que comprenda al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprenda al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina y unir dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicha segundo ácido nucleico en un extremo, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1 a 55 pares de bases, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases, tales como, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases, de la timina más 5' o timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina en el extremo 5') en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa de restricción es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, la etapa de traducción comprende además proporcionar ribosomas, ARNt y aminoácidos. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el

polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la traducción se realiza a una temperatura al menos, mayor a, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la traducción se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen que codifica una proteína. En algunas alternativas, la proteína es una proteína para terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

Se proporciona un método para mejorar la estabilidad de un gen replicante que no forma parte de la invención, en donde el método comprende proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante cualquier método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria, en donde dicho polinucleótido comprende además un gen que transforma una célula con dicho polinucleótido; y propagar la célula, en donde el polinucleótido se replica. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina,

citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, se proporciona el método para fabricar un polinucleótido que tiene una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en el mismo, y en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El método para elaborar el polinucleótido puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que comprenda al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprenda al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina y unir dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicha segundo ácido nucleico en un extremo, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1 a 55 pares de bases, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases, tales como, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases, de la timina más 5' o timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina en el extremo 5') en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, la célula se propaga durante 1 día, 2 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 12 días, 14 días o cualquier otro momento entre estos valores. En algunas alternativas, la célula se propaga a 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C o cualquier otra temperatura entre cualquiera de estos valores. En algunas alternativas, la célula es una célula humana. En algunas alternativas, la célula se selecciona de un grupo que consiste en células primarias, células T primarias humanas, células CD4+ y células CD8+. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para elaborar polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El método puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionar una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa se encuentra dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo del segundo ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en

la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para fabricar un ácido nucleico que codifica una nucleasa, en donde el método comprende proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde

comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para mejorar la transcripción de un gen que codifica una nucleasa. El método puede comprender proporcionar un polinucleótido de cualquiera de las alternativas de la presente memoria, o un polinucleótido fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una ARN polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más

de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo IIS y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es Bsal o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es Bsal o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se

escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, el método se lleva a cabo durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un ácido nucleico que codifica una nucleasa fabricada mediante uno cualquiera de los métodos de cualquiera de las alternativas de la presente memoria. El método para fabricar el ácido nucleico comprende proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende

una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, la pluralidad de timinas unidas covalentemente comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, unacitosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para estabilizar la traducción de un ARN que codifica una nucleasa durante la traducción *in vitro* a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas. El método puede comprender proporcionar el ácido nucleico de cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un ácido nucleico fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y poner en contacto dicho ácido nucleico con un ribosoma y ARNt en presencia de aminoácidos, en donde dicho ARN es estable a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas. El método de fabricación del ácido nucleico puede comprender proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y poner en contacto dicho

ácido nucleico con un ribosoma, en presencia de aminoácidos y ARNt, en donde dicho ARN es estable a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas (por ejemplo, al menos o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos antes mencionados). El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido

nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos métodos para elaborar un polinucleótido puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que comprenda al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprenda al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina y unir dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicha segundo ácido nucleico en un extremo, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1 a 55 pares de bases, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases, tales como, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases, de la timina más 5' o timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina en el extremo 5') en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, la pluralidad de timinas unidas covalentemente comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En

algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura igual a 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende una pluralidad de adeninas, en donde la pluralidad de adeninas comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para estabilizar la traducción de un ARN que codifica una nucleasa durante la traducción *in vivo* a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas. El método puede comprender transfectar en una célula el ácido nucleico según cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un ácido nucleico fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria, colocar la célula en un recipiente de cultivo con medio, suministrar a la célula nutrientes y aminoácidos para la traducción e incubar la célula durante al menos, más de o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos antes mencionados para permitir la traducción. El método para fabricar el ácido nucleico comprende proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de

tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos métodos para elaborar un polinucleótido puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que comprenda al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprenda al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina y unir dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicha segundo ácido nucleico en un extremo, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1 a 55 pares de bases, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases, tales como, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases, de la timina más 5' o timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina en el extremo 5') en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, la pluralidad de timinas unidas covalentemente comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el

polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, la célula es una célula humana. En algunas alternativas, la célula se selecciona de un grupo que consiste en células primarias, células T primarias humanas, células CD4+ y células CD8+. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para expresar una nucleasa o aumentar la expresión de una nucleasa. El método puede comprender generar un ARNm a partir del polinucleótido de una cualquiera de las alternativas en la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método de una cualquiera de una cualquiera de las alternativas de la presente memoria y traducir dicho ARNm en un péptido. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de

clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, la pluralidad de timinas unidas covalentemente comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas

alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, la traducción se realiza a una temperatura al menos, mayor a, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la traducción se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ARNm comprende una pluralidad de adeninas, en donde la pluralidad de adeninas comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para replicar un gen que comprende una nucleasa o mejorar la estabilidad de un gen replicante que comprende una nucleasa. El método puede comprender proporcionar el polinucleótido según una cualquiera de las alternativas en la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método según una cualquiera de las alternativas en la presente memoria, en donde dicho polinucleótido comprende un gen que codifica una nucleasa, la transformación de una célula con dicho polinucleótido y la propagación de la célula, en donde el polinucleótido se replica. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal)

en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una
 5 secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la
 10 endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas
 15 alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5'
 20 terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende
 25 una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300,
 30 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5'
 35 en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas
 40 alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, la pluralidad de timinas unidas covalentemente comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la primera
 45 secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas,
 50 la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al
 55
 60
 65

menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, la célula se propaga durante 1 día, 2 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 12 días, o 14 días o cualquier otro momento entre estos valores. En algunas alternativas, la célula se propaga a 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, o 37 °C o cualquier otra temperatura entre cualquiera de estos valores. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la célula es una célula humana. En algunas alternativas, la célula se selecciona de un grupo que consiste en células primarias, células T primarias humanas, células CD4+ y células CD8+. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un ARN que tiene una pluralidad de nucleótidos de adenina. El ARN puede comprender una primera secuencia que comprende al menos una secuencia complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa unido covalentemente a una pluralidad de nucleótidos de adenina en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina, una segunda secuencia que comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de adeninas comprende al menos, más de, igual o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente y en donde dicha secuencia complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa de dicho primer ácido nucleico está unida covalentemente a dicha pluralidad de nucleótidos de adenina de dicho segundo ácido nucleico en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina de dicho segundo ácido nucleico. En algunas alternativas, el ARNm codifica además un gen. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa está invertido, y en donde la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento del sitio de endonucleasa invertido. En algunas alternativas, la al menos una endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de BsaI o un sitio de reconocimiento de StuI. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en una célula humana. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En alguna alternativa, se proporciona una célula fabricada mediante los métodos de cualquiera de las alternativas de la presente memoria, pero que no forma parte de la presente invención. El método puede comprender transfectar en una célula el ácido nucleico según cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un ácido nucleico fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria, colocar la célula en un recipiente de cultivo con medio, suministrar a la célula nutrientes y aminoácidos para la traducción e incubar la célula durante al menos, más de o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos antes mencionados para permitir la traducción. El método para fabricar el ácido nucleico comprende proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas

covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, la pluralidad de timinas unidas covalentemente comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, la célula es una célula humana. En algunas alternativas, la célula se selecciona de un grupo que consiste en células primarias, células T primarias humanas, células CD4+ y células CD8+. En algunas alternativas, el método comprende proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante cualquier método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria, en donde dicho polinucleótido comprende además un gen que transforma una célula con dicho polinucleótido; y propagar la célula, en donde el polinucleótido se replica. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo

ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos métodos para elaborar un polinucleótido puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que comprenda al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprenda al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina y unir dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicha segunda ácido nucleico en un extremo, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1 a 55 pares de bases, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases, tales como, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,

28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases, de la timina más 5' o timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina en el extremo 5') en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, la célula se propaga durante 1 día, 2 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 12 días, 14 días o cualquier otro momento entre estos valores. En algunas alternativas, la célula se propaga a 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C o cualquier otra temperatura entre cualquiera de estos valores. En algunas alternativas, la célula es una célula humana. En algunas alternativas, la célula se selecciona de un grupo que consiste en células primarias, células T primarias humanas, células CD4+ y células CD8+. El método puede comprender proporcionar el polinucleótido según una cualquiera de las alternativas en la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método según una cualquiera de las alternativas en la presente memoria, en donde dicho polinucleótido comprende un gen que codifica una nucleasa, la transformación de una célula con dicho polinucleótido y la propagación de la célula, en donde el polinucleótido se replica. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases,

de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, la pluralidad de timinas unidas covalentemente comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C.

En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, la célula se propaga durante 1 día, 2 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 12 días, o 14 días o cualquier otro momento entre estos valores. En algunas alternativas, la célula se propaga a 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, o 37 °C o cualquier otra temperatura entre cualquiera de estos valores. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la célula es una célula humana. En algunas alternativas, la célula se selecciona de un grupo que consiste en células primarias, células T primarias humanas, células CD4+ y células CD8+. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender un vehículo farmacéutico y un ácido nucleico de una cualquiera de las alternativas en la presente memoria o el ARNm de una cualquiera de las alternativas en la presente memoria. El ácido nucleico puede fabricarse mediante un método de una cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria. En algunas alternativas, el método comprende proporcionar el polinucleótido de una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado mediante una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido

comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde

entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ADN. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan en una guanina, citosina, timina o uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. También se puede proporcionar el método para fabricar el ácido nucleico que comprende una nucleasa. El método comprende proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas de la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150,

175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, la pluralidad de

timinas unidas covalentemente comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o Stul. El ARN puede comprender una primera secuencia que comprende al menos una secuencia complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa unido covalentemente a una pluralidad de nucleótidos de adenina en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina, una segunda secuencia que comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de adeninas comprende al menos, más de, igual o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente y en donde dicha secuencia complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa de dicho primer ácido nucleico está unida covalentemente a dicha pluralidad de nucleótidos de adenina de dicho segundo ácido nucleico en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina de dicho segundo ácido nucleico. En algunas alternativas, el ARNm codifica además un gen. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa está invertido, y en donde la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento del sitio de endonucleasa invertido. En algunas alternativas, la al menos una endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de BsaI o un sitio de reconocimiento de Stul. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en una célula humana. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona el ácido nucleico descrito en la presente memoria para su uso en un método para tratar, mejorar o inhibir la enfermedad en un sujeto. El método puede comprender introducir en una célula el ácido nucleico de cualquiera de las alternativas de la presente memoria o el ARNm de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y administrar la célula al sujeto. El ácido nucleico puede fabricarse mediante un método de una cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria.

En algunas alternativas, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento, la mejora o la inhibición de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica de cualquiera de las alternativas de la presente memoria. La composición farmacéutica puede comprender un vehículo farmacéutico y un ácido nucleico de una cualquiera de las alternativas en la presente memoria o el ARNm de una cualquiera de las alternativas en la presente memoria. El ácido nucleico puede fabricarse mediante un método de una cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para tratar, mejorar o inhibir la enfermedad en un sujeto, el método puede comprender introducir en una célula el ARNm o el ARN de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y administrar la célula al sujeto. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más

de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ADN. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan en una guanina, citosina, timina o uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ARNm codifica una proteína, tal como una nucleasa, por ejemplo, Id. de sec. n.º: 6-14, en donde dicho ARNm comprende una cola de poli(A) que tiene al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400 o 500 residuos de longitud o una longitud que esté dentro de un intervalo definido por dos de las longitudes mencionadas anteriormente y, en donde dicho ARNm carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tal como una escisión/ sitio de unión del factor de especificidad de poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CFII). En algunas alternativas, la célula es una célula T o una célula primaria. En algunas alternativas, la introducción se realiza mediante electroporación. En algunas alternativas, la célula es una célula humana. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona una composición farmacéutica, en donde la composición comprende un vehículo farmacéutico y el ARNm de una cualquiera de las alternativas de la presente memoria. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ADN. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende

una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan con una guanina, una citosina, una timina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ARNm codifica una proteína, tal como una nucleasa, por ejemplo, Id. de sec. n.º: 6-14, en donde dicho ARNm comprende una cola de poli(A) que tiene al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400 o 500 residuos de longitud o una longitud que esté dentro de un intervalo definido por dos de las longitudes mencionadas anteriormente y, en donde dicho ARNm carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tal como una escisión/ sitio de unión del factor de especificidad de poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CFII). En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento, la mejora o la inhibición de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica de cualquiera de las alternativas de la presente memoria. En algunas alternativas, la composición comprende un vehículo farmacéutico y el ARNm de una cualquiera de las alternativas de la presente memoria. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ADN. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan en una guanina, citosina, timina o uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas

alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ARNm codifica una proteína, tal como una nucleasa, por ejemplo, Id. de sec. n.º: 6-14, en donde dicho ARNm comprende una cola de poli(A) que tiene al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400 o 500 residuos de longitud o una longitud que esté dentro de un intervalo definido por dos de las longitudes mencionadas anteriormente y, en donde dicho ARNm carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tal como una escisión/ sitio de unión del factor de especificidad de poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CFII). En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona la célula para su uso en el tratamiento, la mejora o la inhibición de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende administrar la célula de cualquiera de las alternativas al sujeto. En algunas alternativas, la célula se fabrica transfectando en una célula el ácido nucleico de una cualquiera de las alternativas en la presente memoria o un ácido nucleico fabricado mediante un método de una cualquiera de las alternativas de la presente memoria, colocando la célula en un recipiente de cultivo con medio, suministrando a la célula nutrientes y aminoácidos para la traducción e incubando la célula durante al menos, más de o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos antes mencionados para permitir la traducción. En algunas alternativas, el método para fabricar el ácido nucleico o el ARN comprende proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado por cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-

14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, el polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, el polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, la célula

es una célula humana. En algunas alternativas, la célula se selecciona de un grupo que consiste en células primarias, células T primarias humanas, células CD4+ y células CD8+. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, un polinucleótido que codifica una proteína, tal como una nucleasa, por ejemplo las Id. de sec. n.º 6-14, en donde dicho polinucleótido comprende un sitio de endonucleasa en el extremo 3' de dicho polinucleótido, preferiblemente fuera de la región codificante de dicha proteína, y dicho sitio de endonucleasa está unido a al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o 550 residuos de timina unidos covalentemente o una cantidad de residuos de timina unidos covalentemente que esté dentro de un intervalo definido por se proporcionan dos de los valores anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, un ARNm que codifica una proteína, tal como una nucleasa, por ejemplo, Id. de sec. n.º: 6-14, en donde dicho ARNm comprende una cola de poli(A) que tiene al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400 o 500 residuos de longitud o una longitud que esté dentro de un intervalo definido por dos de las longitudes mencionadas anteriormente y, en donde dicho ARNm carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tal como una escisión/ sitio de unión del factor de especificidad de poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CFII). En algunas alternativas, la composición comprende un vehículo farmacéutico y el ARNm o el ARNm de cualquiera de las alternativas de la presente memoria. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ADN. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan en una guanina, citosina, timina o uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ARNm codifica una proteína, tal como una nucleasa, por ejemplo, Id. de sec. n.º: 6-14, en donde dicho ARNm comprende una cola de poli(A) que tiene al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400 o 500 residuos de longitud o una longitud que esté dentro de un intervalo definido por dos de las longitudes mencionadas anteriormente y, en donde dicho ARNm carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tal como una escisión/ sitio de unión del factor de especificidad de poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CFII).

En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para tratar, mejorar o inhibir una enfermedad en un sujeto en donde el método comprende introducir en una célula uno o más de los polinucleótidos o ácidos nucleicos expuestos en cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente; y administrar la célula al sujeto. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico proporcionado se fabrica mediante un método de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria. En algunas alternativas, el método comprende

proporcionar el polinucleótido de una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado mediante una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases de la restricción. El sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al

menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ADN. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas

alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan en una guanina, citosina, timina o uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, la célula es una célula T o una célula primaria. En algunas alternativas, dicha enfermedad es el cáncer, la isquemia, la retinopatía diabética, la degeneración macular, la artritis reumatoide, la psoriasis, la infección por VIH, la anemia falciforme, la enfermedad de Alzheimer, la distrofia muscular, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades vasculares, la fibrosis quística, el accidente cerebrovascular, el síndrome de

hiperlGE y la hemofilia. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporcionan los polinucleótidos o ácidos nucleicos para su uso en el tratamiento, la mejora o la inhibición de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende administrar a un sujeto uno o más de los polinucleótidos o ácidos nucleicos expuestos en cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico proporcionado se fabrica mediante un método de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria. En algunas alternativas, el método comprende proporcionar el polinucleótido de una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado mediante una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido

con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la

pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ADN. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta

en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan en una guanina, citosina, timina o uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, la célula es una célula T o una célula primaria. En algunas alternativas, dicha enfermedad es el cáncer, la isquemia, la retinopatía diabética, la degeneración macular, la artritis reumatoide, la psoriasis, la infección por VIH, la anemia falciforme, la enfermedad de Alzheimer, la distrofia muscular, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades vasculares, la fibrosis quística, el accidente cerebrovascular, el síndrome de hiperIGE y la hemofilia. En algunas alternativas, dicha enfermedad es el cáncer, la isquemia, la retinopatía diabética, la degeneración macular, la artritis reumatoide, la psoriasis, la infección por VIH, la anemia falciforme, la enfermedad de Alzheimer, la distrofia muscular, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades vasculares, la fibrosis quística, el accidente cerebrovascular, el síndrome de hiperIGE y la hemofilia. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la

pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un método para aumentar y/o estabilizar la expresión de una proteína en donde el método comprende generar un ARNm a partir de uno o más de los polinucleótidos de una o más de las reivindicaciones anteriormente mencionadas y traducir dicho ARNm en un péptido. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico proporcionado se fabrica mediante un método de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria. En algunas alternativas, el método comprende proporcionar el polinucleótido de una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado mediante una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en

contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio

de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ADN. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número

de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan con una guanina, una citosina, una timina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, la célula es una célula T o una célula primaria. En algunas alternativas, dicha enfermedad es el cáncer, la isquemia, la retinopatía diabética, la degeneración macular, la artritis reumatoide, la psoriasis, la infección por VIH, la anemia falciforme, la enfermedad de Alzheimer, la distrofia muscular, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades vasculares, la fibrosis quística, el accidente cerebrovascular, el síndrome de

hiperlGE y la hemofilia. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para mejorar la transcripción o expresión de un gen, en donde el método comprende proporcionar uno o más de los polinucleótidos o ácidos nucleicos de cualquiera de las reivindicaciones mencionadas anteriormente, en donde dicho polinucleótido comprende además un gen, tal como un gen de nucleasa, por ejemplo, las Id. de sec. n.º 6-14 y poner en contacto dicho polinucleótido o ácido nucleico con una ARN polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y

la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico proporcionado se fabrica mediante un método de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria. En algunas alternativas, el método comprende proporcionar el polinucleótido de una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado mediante una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia, en donde la tercera secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica

una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una cuarta secuencia, en donde la cuarta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de una polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la

endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ADN. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan en una guanina, citosina, timina o uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en células humanas. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI, y en donde la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o

adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, la secuencia que codifica la nucleasa está optimizada para la expresión en células humanas. En algunas alternativas, la célula es una célula T o una célula primaria. En algunas alternativas, dicha enfermedad es el cáncer, la isquemia, la retinopatía diabética, la degeneración macular, la artritis reumatoide, la psoriasis, la infección por VIH, la anemia falciforme, la enfermedad de Alzheimer, la distrofia muscular, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades vasculares, la fibrosis quística, el accidente cerebrovascular, el síndrome de hiperlGE y la hemofilia. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). Otras alternativas se refieren a un polinucleótido lineal que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa; y una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde el segundo ácido nucleico comprende un sitio de escisión de endonucleasa que está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de la timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina; y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico y, en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 nucleótidos del sitio de escisión de endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de la timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina. Las alternativas también incluyen, en donde el polinucleótido anterior comprende un brazo izquierdo que comprende un telómero izquierdo; un brazo derecho que comprende un telómero derecho; y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. Las alternativas también incluyen, en donde el polinucleótido anterior comprende además un tercer ácido nucleico y en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. Las alternativas también incluyen, en donde el gen anterior codifica una proteína, una nucleasa o una endonucleasa. Las alternativas también incluyen aquellas en donde la nucleasa anterior comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. Las alternativas también incluyen, en donde el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa anterior es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción. Las alternativas también incluyen aquellas en donde el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción anterior es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. Las alternativas también incluyen, en donde el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa anterior es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI. Las alternativas también incluyen, pero no forman parte de la invención, en donde el sitio de reconocimiento de endonucleasa anterior está invertido. Y, en donde la pluralidad de nucleótidos de timina termina en una cisteína, una adenina o una guanina. Las alternativas también incluyen, en donde el polinucleótido es un polinucleótido lineal. Otras alternativas se refieren a los métodos para fabricar un ácido nucleico, que comprenden proporcionar un polinucleótido anterior; y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El ácido nucleico es ARN. Las alternativas también incluyen, en donde el ARN anterior comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. Otras alternativas se refieren a métodos para estabilizar un ARN durante la traducción *in vitro* a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas, que comprenden proporcionar el ácido nucleico fabricado mediante el método anterior; y poner en contacto dicho ácido nucleico con un ribosoma, en presencia de aminoácidos y ARNt, en donde dicho ARN es estable a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). La puesta en contacto se puede realizar durante al menos, más de, igual o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). El ácido nucleico es un ARN. El ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina y, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen y, en donde el gen codifica, una proteína para terapia, una endonucleasa o una nucleasa. Otras alternativas implican métodos para estabilizar un ARN durante la traducción *in vivo* a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas en una célula, que comprenden transfectar en una célula el ácido nucleico que proporciona el ácido nucleico fabricado mediante un método anterior; colocar la célula en un recipiente de cultivo con medios; suministrar a la célula nutrientes y aminoácidos para la traducción; e incubar la célula durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados para permitir la traducción. En algunas alternativas, la célula es una célula humana. En algunas alternativas, la célula se selecciona del grupo que consiste en células primarias, células T primarias humanas, células CD4+ y células CD8+. Más alternativas se refieren a métodos para aumentar y/o estabilizar la expresión de una proteína que comprenden generar un ARN a partir del polinucleótido de la reivindicación 278; y traducir dicho ARN en un péptido. En algunas alternativas,

la traducción comprende además proporcionar una ARN polimerasa. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS y, preferiblemente, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. Otras alternativas se refieren al ARN para su uso en el tratamiento, la mejora o la inhibición de una enfermedad; y administrar la célula al sujeto. En algunas alternativas, la introducción se realiza mediante electroporación. En algunas alternativas, la célula es una célula T o una célula primaria. En algunas alternativas, la célula es una célula humana y, preferiblemente, la célula es CD4+ y/o CD8+.

Algunas alternativas se refieren a un polinucleótido. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en los que el segundo ácido nucleico comprende un sitio de escisión de endonucleasa que está dentro de la pluralidad de timina nucleótidos o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de la timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico y, en donde dicho reconocimiento de endonucleasas el sitio está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 nucleótidos del sitio de escisión de endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de la timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo que comprende un telómero izquierdo; un brazo derecho que comprende un telómero derecho; y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico y, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína, una nucleasa o una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina termina en una cisteína, una adenina o una guanina. El polinucleótido es un polinucleótido lineal.

Algunas alternativas se refieren a un método para elaborar un ácido nucleico. Algunas alternativas del método comprenden proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en los que el segundo ácido nucleico comprende un sitio de escisión de la endonucleasa que está dentro de la pluralidad de timina nucleótidos o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de la timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico y, en donde dicho reconocimiento de endonucleasas el sitio está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 nucleótidos del sitio de escisión de la endonucleasa y dicho sitio de escisión de la endonucleasa está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de la timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo que comprende un telómero izquierdo; un brazo derecho que comprende un telómero derecho; y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico y, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína, una nucleasa o una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina termina en una cisteína, adenina o guanina. El

polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente.

Algunas alternativas que se proporcionan en la presente memoria son métodos para estabilizar un ARN durante la traducción *in vitro* a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los tiempos anteriormente mencionados) que comprenden proporcionar el ácido nucleico fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas en la presente memoria, y poner en contacto dicho ácido nucleico con un ribosoma, en presencia de aminoácidos y ARNt, en donde dicho ARN es estable a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). La puesta en contacto puede realizarse durante al menos, más de, igual o un tiempo comprendido entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados. Algunos métodos para elaborar el ácido nucleico comprenden proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en los que el segundo ácido nucleico comprende un sitio de escisión de endonucleasa que está dentro de la pluralidad de timina nucleótidos o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de la timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico y, en donde dicho reconocimiento de endonucleasas el sitio está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 nucleótidos del sitio de escisión de endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de la timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo que comprende un telómero izquierdo; un brazo derecho que comprende un telómero derecho; y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico y, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína, una nucleasa o una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción StuI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina termina en una cisteína, adenina o guanina. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina y, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen y, en donde el gen codifica, una proteína para terapia, una endonucleasa o una nucleasa.

En algunas alternativas, se proporciona un método para estabilizar un ARN durante la traducción *in vivo* a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados) en una célula. En algunas alternativas, el método comprende transfectar el ácido nucleico en una célula, proporcionar el ácido nucleico fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, colocar la célula en un recipiente de cultivo con medio, suministrar a la célula nutrientes y aminoácidos para su traducción; e incubar la célula durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados para permitir la traducción. Algunos métodos para elaborar el ácido nucleico comprenden proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en los que el segundo ácido nucleico

comprende un sitio de escisión de endonucleasa que está dentro de la pluralidad de timina nucleótidos o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de la timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico y, en donde dicho reconocimiento de endonucleasas el sitio está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 nucleótidos del sitio de escisión de endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de la timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo que comprende un telómero izquierdo; un brazo derecho que comprende un telómero derecho; y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico y, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína, una nucleasa o una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina termina en una cisteína, adenina o guanina. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, la célula es una célula humana. En algunas alternativas, la célula se selecciona del grupo que consiste en células primarias, células T primarias humanas, células CD4+ y células CD8+.

En algunas alternativas, se proporciona un método para aumentar y/o estabilizar la expresión de una proteína, en donde el método comprende generar un ARN a partir del polinucleótido de cualquiera de las alternativas de la presente memoria y traducir dicho ARN en un péptido. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en los que el segundo ácido nucleico comprende un sitio de escisión de endonucleasa que está dentro de la pluralidad de timina nucleótidos o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de la timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico y, en donde dicho reconocimiento de endonucleasas el sitio está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 nucleótidos del sitio de escisión de endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de la timina 5' terminal en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo que comprende un telómero izquierdo; un brazo derecho que comprende un telómero derecho; y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un tercer ácido nucleico y, en donde el tercer ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína, una nucleasa o una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina termina en una cisteína, adenina o guanina. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, la traducción comprende además proporcionar un ARN polimeras ribosomas, ARNt y aminoácidos. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul.

Breve descripción de los dibujos

Las **figuras 1A y 1B** son ilustraciones del vector de ADN lineal que comprende un sitio que codifica una cola de poli(A) y un sitio de escisión de endonucleasa Bsal dentro de la región codificante de la cola de poli(A) (**figuras 1A y 1B**). Tal como se muestra, el sitio de corte de Bsal está dentro de la región de codificación de poliA. El sitio de reconocimiento de Bsal está invertido y se encuentra corriente abajo de la región de codificación de poliA, de modo que la endonucleasa puede cortar dentro de la región de codificación de poliA. En la **figura 1B** se muestra una región ampliada de la **figura 1A**, que ilustra la región de interés, el sitio de clonación múltiple (MCS) con una región de codificación de cola de poli(A).

La **figura 2** es una serie de separaciones en gel de agarosa al 3 % que demuestran la fidelidad de la replicación del ADN de la región codificante de poli(A) de los plásmidos que codifican los tramos de poli(A) de 100, 200, 300 o 500 adeninas unidas covalentemente. Los plásmidos que codifican los tramos de poli(A) se generaron a partir del vector lineal mostrado en las **figuras 1A y 1B**. Después de la replicación, los plásmidos de las bacterias se cortaron a ambos lados del tramo codificante de poli(A) y el producto se procesó en el gel al 3 % para examinar los tamaños del tramo de poli(A) después de la replicación. La **figura 2** demuestra el acortamiento de la región codificante de poli(A) del propio vector de ADN para los plásmidos pEVL100, pEVL200, pEVL300 y pEVL500, cuando los plásmidos se replican continuamente en bacterias cultivadas a temperaturas de 30 °C y 37 °C, y durante tiempos de 1 día, 6 días y 14 días.

Las **figuras 3A y 3B** son una serie de Lonza FlashGels (Lonza) de gel de agarosa al 1,2 %, en los que se realizaron separaciones de ARNm para ilustrar el uso de un vector lineal pEVL como molde para producir un ARNm altamente homogéneo. El molde lineal pEVL comprendía un sitio que codificaba una cola de poli(A) en donde un sitio de escisión de endonucleasa Bsal está dentro de la cola de poli(A) y se compara con un método convencional para añadir un tramo de poli(A) mediante un vector de transcripción y una enzima de poliadenilación. Los vectores lineales usados para transcribir el ARNm se derivan de un vector lineal, tal como se muestra en las **figuras 1A y 1B**.

La **figura 4** es un gráfico de barras que ilustra la expresión de la proteína fluorescente azul (BFP) a partir del uso de un ARNm que comprende una cola de poli(A) que se transcribió a partir de un vector lineal que codifica un tramo de poli(A) en donde un sitio de escisión de endonucleasa Bsal reside dentro de la región codificante de la poli(A) para la traducción de una proteína indicadora (BFP) (**figuras 1A y 1B**) a 30 °C en células T primarias humanas. El ARNm producido a partir de un plásmido que comprende una región codificante del tramo de poli(A) se comparó con un ARNm producido a partir de un método estándar de adición de un tramo de poli(A) mediante un vector de transcripción y una enzima de poliadenilación. Con el fin de determinar la eficacia del ARNm de la transcripción para la traducción para ambos métodos, se usó BFP como proteína indicadora. Tal como se muestra en la figura, la región sombreada es el % de BFP+ y las regiones sombreadas son la MFI de BFP.

La **figura 5** es un gráfico de barras que ilustra la expresión de la proteína fluorescente azul (BFP) a partir del uso de un ARNm que comprende una cola de poli(A) que se transcribió a partir de un vector lineal que codifica un tramo de poli(A) en donde un sitio de escisión de endonucleasa Bsal reside dentro de la región codificante de poli(A) para la traducción de una proteína indicadora (BFP). El ARN se generó a partir de un vector lineal que codifica un tramo de poli(A) en donde un sitio de escisión de endonucleasa Bsal reside dentro de la región codificante de poli(A) para la traducción de una proteína indicadora (BFP) y el ARN se usó para transfectar células T primarias humanas. El ARN generado a partir de pEVL300 (cola codificada con 300 poliA) y pWNY (cola enzimática) transfectados en células se analizó analizando el % de células BFP+ y el brillo (MFI) de esas células BFP+ a lo largo del tiempo, con y sin la incubación de 24 horas a 30 °C, y luego se comparó.

La **figura 6** muestra el esquema del vector pEVL (longitud variable extendida) (panel A) y la cuantificación de la inactivación del TCRα usando pEVL y otros vectores que codifican un promotor de T7 que estaban poliadenilados enzimáticamente (panel B). Este vector codifica un promotor T7, necesario para la ARN polimerasa, un MCS para facilitar la clonación, una cola de poli-A codificada de múltiples longitudes, que van desde 60 pb (pEVL 100) hasta 500 pb (pEVL 500), y un sitio de escisión único, Bsal, para definir el final de la cola de poliA y terminar la transcripción. Panel B: Cuantificación de la inactivación de TCRα usando pEVL y otros vectores que codifican un promotor de T7 que se poliadenilaron enzimáticamente. La inactivación de TCRα se logró usando TALEN, electroporando las células T CD4+ humanas primarias usando la cantidad de ARN que se indica en la figura. Los constructos de pEVL pueden lograr una inactivación del 90 % cuando las células se cultivan a 37 grados centígrados y cuando se incuban a 30 °C durante 24 horas después de la electroporación, la dosis más baja de TALEN proporcionada por pEVL funciona mejor que ambos ARNm con cola enzimática.

La **figura 7** muestra que la guía CRISPR 4 de TCRα (**Id. de sec. n.º. 5**) genera la mayor inactivación de TCRα (KO) cuando se usa con una proteína Cas9 expresada en un vector lineal para un ARNm poliadenilado que codifica Cas9.

La **figura 8** muestra la fluorescencia de GFP de las células T humanas primarias medida mediante un BD LSRII 24 o 48 horas después de la electroporación del ARNm de los ARNm que comprenden colas de poli(A) generadas a partir de un vector pEVL y la transducción con AAV de células T humanas primarias.

La **figura 9** muestra la intensidad media de fluorescencia (MFI) de GFP en células T humanas primarias 24 o 48 horas después de la electroporación del ARNm de las proteínas Cas9 y Ad5 (de tipo natural o mutantes, tal como se indica, véanse, por ejemplo, las **Id. de sec. n.º: 1-4**) y la transducción de AAV. El ARNm de Cas9 se generó a partir de un constructo de pEVL para generar una cola de poli(A) de 200 adenosinas unidas covalentemente.

La **figura 10** muestra el acortamiento de los tramos de poli(A) tras la clonación en un vector de clonación de plásmidos circular convencional a 25 °C.

La **figura 11** muestra la generación y caracterización de pEVL: un vector plasmídico lineal para la generación de ARNm con tramos de poliA codificados extendidos. A) Esquema del plásmido lineal y conversión a pEVL B) Esquema del pEVL y método usado para la generación de tramos de poli(A) extendidos en pEVL C) Acortamiento de los tramos de poli(A) tras la clonación en vectores de clonación de plásmidos circulares o lineales estándar a 30 °C. BFP seguida de inserciones de tramos de (A) de 72, 164 y 325 pares de bases delimitadas por sitios de enzimas de restricción.

La **figura 12** muestra la generación y caracterización del ARNm a partir de moldes codificados por pEVL. A) El ARNm de IVT que codifica la proteína azul fluorescente (BFP) generado a partir de pWny con cola enzimática y pEVL-100 a pEVL-500, BFP-pEVL-100 a -500 se digirieron con XbaI y BsaI, y pWny con Scal y BsiWI, para generar un molde para IVT. La IVT se llevó a cabo con protección con ARCA y, en el caso de pWNY, con cola enzimática con EPAP. Después de la purificación, se obtuvieron imágenes de 200 ng de cada transcrito en un sistema FlashGel (Lonza). Normalmente, pEVL produce una sola banda de longitud definida, mientras que pWNY con cola enzimática produce transcripciones de una longitud más heterogénea. B) Gráficos de potencia relativa y flujo representativos generados por el ARNm que codifica la BFP generado a partir de un vector plasmídico circular con poliadenilación enzimática o a partir de pEVL-100/pEVL-200. Se electroporó 1 µg de ARNm de IVT del molde indicado en células T humanas primarias preestimuladas. Después de 24 horas a 30 °C, las células se analizaron mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células que expresaban la BFP, así como la MFI de BFP. C) Potencia relativa y diagramas de flujo representativos de generados por ARNm que codifica BFP generados de pEVL-100 a pEVL-500. Se electroporaron cantidades equimolares de ARNm IVT de BFP-pEVL-100 a 500 en células T humanas primarias preestimuladas. Después de 24 horas a 30 °C, se analizó el porcentaje de células que expresaban BFP y BFI MFI mediante citometría de flujo.

La **figura 13** muestra la aplicación de ARNm codificado con pEVL para la edición génica en células T humanas primarias A) Edición mediada por pEVL del locus de TCRA con TALENs en células T humanas primarias. Se clonó en pEVL-300 un par TALEN dirigido a la región constante del locus de TCRA. Después de la producción del ARNm de IVT, las cantidades indicadas de cada mitad de TALEN se sometieron a electroporación en células T humanas primarias preestimuladas. Después de 72 horas, se analizó la inactivación exitosa del TCR mediante citometría de flujo para determinar la falta de expresión de CD3. B) Edición mediada por pEVL del locus de TCRA con CRISPR/Cas9 en células T humanas primarias. Se clonó un constructo Cas9-T2a-mCherry en pEVL-200. Después de la producción de ARNm de IVT, la Cas9 se sometió a electroporación en células T humanas primarias preestimuladas. 4 horas después de la electroporación, se administró una guía CRISPR dirigida a la región constante de TCRA mediante la transducción de AAV6. A las 24 y 72 horas después de la electroporación, se determinó la eficiencia de electroporación de Cas9 mediante análisis FACS de la fluorescencia de mCherry. Después de 7 días, se analizó la inactivación exitosa del TCR mediante citometría de flujo para determinar la falta de expresión de CD3.

La **figura 14** muestra los electroferogramas de secuenciación que cubren el tramo de poli(A) en los electroferogramas de secuenciación directa e inversa del pEVL-300 generados usando la química de secuenciación de Sanger convencional sobre el molde de poli(A) en el pEVL-300, lo que demuestra la existencia de un tramo de homopolimérico de al menos 300 pares de bases. Tenga en cuenta que con un tramo homopolimérico de este tamaño, no se esperan límites claros en 3' debido al deslizamiento de la polimerasa, lo que explica la disminución gradual de la secuencia y la apariencia ondulada del electroferograma procesado que se produce alrededor del final del tramo.

La **figura 15** muestra la potencia del ARNm generado a partir de variantes pEVL-300 con residuos terminales U, -UU, G-, -GGG codificados. Se generaron variantes BFP-pEVL para las que el tramo de poli(A) del ARNm estaba terminado por residuos -U, -UU, -G, o -GG tras la digestión con BsaI. Se generó ARNm a partir de estas variantes pEVL, y se transfectaron 0,5 microgramos en células T humanas primarias. La fluorescencia de BFP se monitorizó mediante citometría de flujo durante un periodo de 7 días. Los gráficos representan la MFI relativa frente al tiempo para cada variante de ARNm.

La **figura 16** muestra el crecimiento de la línea de células T H9 después de la transfección con ARNm codificado por pEVL.

La **figura 17** muestra el crecimiento de la línea de células K562 después de la transfección con ARNm codificado por pEVL.

La **figura 18** muestra el crecimiento de las células Jurkat después de la transfección con el ARNm codificado por pEVL.

La **figura 19** muestra que las células hepáticas HepG2 crecen después de la transfección con el ARNm codificado por pEVL.

La **figura 20** muestra células CD34 que se transfectaron con ARNm de BFP.

Definiciones

La “cadena molde”, tal como se define en la presente memoria, se refiere a la cadena de ADN que se usa como molde para la síntesis de ARN y también puede denominarse “cadena no codificante”. Durante el proceso de transcripción, la ARN polimerasa atraviesa la cadena molde y usa la complementariedad del apareamiento de bases con la cadena molde para

crear una copia de ARN. La ARN polimerasa atraviesa la cadena molde en una dirección de 3' a 5' y produce una molécula de ARN de 5' a 3' como una copia exacta de la cadena codificante, con la excepción de que las timinas se sustituyen por uracilos en la cadena de ARN. En algunas alternativas, se proporciona una cadena molde, en donde la cadena molde puede comprender una pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, se proporciona un ácido nucleico, en donde el ácido nucleico es un ADN, en donde el ADN es un ADN bicatenario que comprende la cadena molde, un polinucleótido que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina.

La “cadena codificante”, tal como se define en la presente memoria, se refiere a la cadena de ADN que tiene la misma secuencia de bases que el transcrito de ARN (ARNm) que se produce durante la transcripción. La cadena codificante es la cadena usada cuando se muestra una secuencia de ADN en la dirección de 5' a 3'.

Tal como se usa en la presente memoria, “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos, tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN) o el ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados por cualquiera de las acciones de ligamiento, escisión, endonucleasa y exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos de origen natural (tales como ADN y ARN), o análogos de nucleótidos de origen natural (por ejemplo, formas enantioméricas de nucleótidos de origen natural), o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en los restos de azúcar y/o en los restos de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcar incluyen, por ejemplo, la sustitución de uno o más grupos hidroxilo por halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, todo el resto de azúcar se puede reemplazar con estructuras estérica y electrónicamente similares, tales como aza-azúcares y análogos de azúcares carbocíclicos. Los ejemplos de modificaciones en un resto base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácidos nucleicos pueden unirse mediante enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Los análogos de los enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato y similares. El término “molécula de ácido nucleico” también incluye los denominados “ácidos nucleicos peptídicos”, que comprenden bases de ácido nucleico modificadas o de origen natural unidas a una cadena principal de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tal como se mencionó anteriormente, en algunas alternativas, el sistema CRISPR/Cas9 descrito en la presente memoria, mediante el cual el polinucleótido que codifica la nucleasa Cas9 o un derivado o fragmento funcional de la misma (por ejemplo, las **Id. de sec. n.º. 6-14**) está provisto de una cola de poli(T) o poli(A) de una longitud deseada y se prepara según las enseñanzas descritas en la presente memoria, se proporciona con un ARN guía que comprende una o más bases modificadas, tal como una o más bases modificadas, tal como una o más bases modificadas, como una o más de las bases modificadas descritas anteriormente. En las **Id. de sec. n.º: 5, 15, 16 y 17** se proporcionan ejemplos de ARN guía útiles con las alternativas descritas en la presente memoria, que pueden contener una o más de las bases modificadas expuestas anteriormente.

Un nucleótido está compuesto por una nucleobase, un azúcar de cinco carbonos (es decir, ribosa o 2-desoxirribosa) y uno o más de un grupo fosfato (es decir, dos o tres grupos fosfato). Por lo tanto, el término “nucleótido” generalmente se refiere a un nucleósido monofosfato, pero un nucleósido difosfato o nucleósido trifosfato también puede considerarse un nucleótido.

Sin el grupo fosfato, la nucleobase y el azúcar forman un nucleósido. Los grupos fosfato forman enlaces con los carbonos 2, 3 o 5 del azúcar, siendo el sitio de 5 carbonos el más común. Los nucleótidos cíclicos se forman cuando el grupo fosfato se une a dos de los grupos hidroxilo del azúcar. Los nucleótidos contienen una base de purina o pirimidina. Los ribonucleótidos son nucleótidos en los que el azúcar es ribosa. Los desoxirribonucleótidos son nucleótidos que tienen desoxirribosa como azúcar. Los ácidos nucleicos son macromoléculas poliméricas hechas de monómeros de nucleótidos. En el ADN, las bases de purina son adenina (A) y guanina (G), mientras que las pirimidinas son timina (T) y citosina (C). El ARN usa uracilo (U) en lugar de timina (T). La adenina siempre se empareja con la timina mediante dos enlaces de hidrógeno, mientras que la guanina siempre se empareja con la citosina a través de tres enlaces de hidrógeno, cada uno debido a sus estructuras únicas.

Los “nucleósidos”, tal como se describe en la presente memoria, son glucosilaminas que pueden considerarse nucleótidos sin un grupo fosfato. Un nucleótido está compuesto por una nucleobase, también denominada base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos (es decir, ribosa o desoxirribosa) y uno o más grupos fosfato, mientras que un nucleósido consiste simplemente en una nucleobase y un azúcar de 5 carbonos. Sin embargo, en un nucleósido, la base se une a la ribosa o a la desoxirribosa a través de un enlace beta-glucosídico. Los ejemplos de nucleósidos incluyen citidina, uridina, adenosina, guanosina, timidina e inosina.

La “adenina” es una nucleobase y es un componente químico del ADN y el ARN. Tal como se usa en la presente memoria, las adeninas pueden referirse a ribonucleótidos de poliadenosina, monofosfatos de poliadenosina o poliadenilos. La forma de la adenina es complementaria a la timina en el ADN o al uracilo en el ARN. La timina es una de las cuatro nucleobases del ácido nucleico del ADN. Tal como se usa en la presente memoria, las timinas pueden referirse a ribonucleótidos de politimidina, monofosfatos de politimidina o politimidilos. Tal como se usa en la presente memoria, el término “adeninas unidas covalentemente”, tal como se denomina en el término “tramo de poli(A)” en referencia a un polinucleótido que comprende ADN o ARN, puede referirse a un polímero de nucleótidos de desoxiadenosina unidos covalentemente que comprende restos de ribonucleótidos de poliadenosina, monofosfatos de poliadenosina o poliadenilos. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “timinas unidas covalentemente”, tal como se denomina en un tramo de poli(T), puede referirse a un polímero de nucleótidos de desoxitimidina unidos covalentemente que comprende restos de ribonucleótidos de politimidina, monofosfatos de politimidina o politimidilos.

La “poliadenilación”, tal como se describe en la presente memoria, se refiere a la adición de adeninas unidas covalentemente en el extremo 3' de un ARN primario o premensajero (pre-ARNm). La adición de un tramo de residuos de adenina unidos covalentemente (cola de poli(A)) es un proceso que produce un ARN mensajero (ARNm) maduro para su traducción. La poliadenilación, un mecanismo eucariota, se inicia *in vivo* cuando se termina la transcripción de un gen y el pre-ARNmp se escinde por una proteína, el factor de especificidad de escisión y poliadenilación (CPSF). Tras la escisión, la poliadenilato polimerasa polimeriza la cola de poli(A) y puede añadir hasta 200-250 residuos de adenina unidos covalentemente.

Un “telómero”, tal como se describe en la presente memoria, es una región de secuencias de nucleótidos repetitivas en cada extremo de un ácido nucleico, que protege los extremos del deterioro. En algunas alternativas, se proporciona un polinucleótido en donde el polinucleótido comprende telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un primer sitio diana de la protelomerasa en el brazo izquierdo y un segundo sitio diana de la protelomerasa en el brazo derecho.

Una región no traducida (o UTR) se refiere a cualquiera de las dos secciones, una a cada lado de una secuencia codificante en una cadena de ARNm. Si se encuentra en el lado de 5', se denomina UTR de 5' (o secuencia líder), o si se encuentra en el lado de 3', se denomina UTR de 3' (o secuencia tráiler). Las UTR se encuentran en los ARNm de origen natural. En algunas alternativas, el ARN no tiene una UTR 3' o una UTR 5'. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII).

“Nucleasa” o “endonucleasa”, tal como se describe en la presente memoria, se refiere a una enzima capaz de escindir los enlaces fosfodiéster entre las subunidades de nucleótidos de los ácidos nucleicos. En algunas alternativas, se proporciona un polinucleótido que codifica una nucleasa. Sin ser limitativos, los ejemplos de endonucleasas pueden incluir, por ejemplo, una enzima CRISPR o una endonucleasa de restricción.

Una “enzima de restricción” o “endonucleasa de restricción” es una enzima que reconoce y une el ADN en o cerca de secuencias de nucleótidos de reconocimiento específicas para que pueda cortar en los sitios de escisión de restricción. En algunas alternativas, se proporciona un polinucleótido que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es específico para una endonucleasa de restricción. Sin ser limitativos, los ejemplos de endonucleasas de restricción de tipo II pueden incluir, por ejemplo, AatII, AbaSI, Acc65I, AccI, Acil, AclI, Afel, AfilI, AfilII, AgeI, AhdI, AleI, AluI, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeKI, Apol, AscI, AseI, AsiSI, Aval, Avail, AvrII, BaeGI, BaeI, BamHI, BanI, BanII, BbsI, BbvCI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BclI, BcoDI, Bfal, BfuAI, BfuCI, BglI, BglII, BglpI, BmgBI, BmrI, BmtI, Bpml, Bpu10I, BpuEI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, Bsal, BsaJI, BsaWI, BsaXI, BseRI, BseYI, BsgI, BsiEI, BsiHKAI, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BsoBI, Bsp1286I, BspCNI, BspDI, BspEI, BspHI, BspMI, BspQI, BsrBI, BsrDI, BsrFI, BsrGI, BsrI, BssHII, BssKI, BssSI, BstAPI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZ17I, Bsu36I, BtgI, BtgZI, BtsCI, BtsI, BtsIMutI, Cac8I, ClaI, CspCI, CviAI, CviKI-1, CviQI, Ddel, Dpnl, DpnII, DraI, DrdI, EaeI, EagI, EarI, EciI, Eco53kI, EcoNI, EcoO109I, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, FatI, Faul, Fnu4HI, FokI, FseI, FspEI, FspI, HaeII, HaeIII, HgaI, HhaI, HincII, HindIII, HinfI, Hinp1I, HpaI, HpaII, HphI, Hpy166II, Hpy188I, Hpy188III, Hpy99I, HpyA, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V, I-CeuI, I-SceI, KasI, KpnI, LpnPI, MboI, MbolI, MfeI, MluCI, MluI, MlyI, Mmel, MnlI, MscI, MseI, MslI, MspA1I, MspI, MspJI, MwoI, NaeI, NarI, BbvCI, BsmI, BsrDI, BtsI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NlaIII, NlaIV, NmeAIII, NotI, Nrul, NsiI, NspI, Nt.AwI, Nt.BbvCI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI,

Nt.BstNBI, Nt.CviPII, PacI, PaeR7I, PciI, PfiFI, PfiMI, PI-PspI, PI-Scel, PleI, PluTI, PmeI, PmII, PpuMI, PshAI, Psil, PspGI, PspOMI, PspXI, PstI, Pvul, Pvull, RsaI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SapI, Sau3AI, Sau96I, SbfI, ScrFI, SexAI, SfaNI, Sfcl, Sfil, SfoI, SgrAI, Smal, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, Stul, StyD4I, Styl, SwaI, TaqI, TfiI, TliI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspMI TspRI, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, XmnI, y ZraI. En algunas alternativas, la endonucleasa de restricción es AatII, AbaSI, Acc65I, AccI, AclI, AclI, AfeI, AflII, AflIII, AgeI, AhdI, AleI, AluI, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeKI, Apol, AscI, Asel, AsiSI, Aval, Avail, AvrII, BaeGI, BaeI, BamHI, BanI, BanII, BbsI, BbvCI, BbvI, BclI, BceAI, BcgI, BciVI, BclI, BcoDI, BfaI, BfuAI, BfuCI, BglI, BglII, BplI, BmgBI, Bmrl, BmtI, Bpml, Bpu10I, BpuEI, BsaI, BsaBI, BsaHI, Bsal, BsaJI, BsaVI, BsaXI, BseRI, BseYI, BsgI, BsiEI, BsiHKAII, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BsoBI, Bsp1286I, BspCNI, BspDI, BspEI, BspHI, BspMI, BspQI, BsrBI, BsrDI, BsrFI, BsrGI, BsrI, BssHII, BssKI, BssSI, BstAPI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZ17I, Bsu36I, BtgI, BtgZI, BtsCI, BtsI, BtsIMutI, Cac8I, ClaI, CspCI, CviAI, CviKI-1, CviQI, DdeI, DpnI, DpnII, DraI, DrdI, EaeI, EagI, EarI, EciI, Eco53kI, EcoNI, EcoO109I, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, FatI, Faul, Fnu4HI, FokI, FseI, FspEI, FspI, HaeII, HaeIII, HgaI, HhaI, HincII, HindIII, HinfI, HinPII, HpaI, HpaII, HphI, Hpy166II, Hpy188I, Hpy188III, Hpy99I, HpyA, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V, I-CeuI, I-Scel, KasI, KpnI, LpnPI, MboI, MbolI, MfeI, MluCI, MluI, MlyI, Mmel, MnlI, MscI, MseI, MslI, MspA1I, MspI, MspJI, MwoI, NaeI, NarI, BbvCI, BsmI, BsrDI, BtsI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NlaIII, NlaIV, NmeAIII, NotI, Nrul, NsiI, NspI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.BsmBI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI, Nt.CviPII, PacI, PaeR7I, PciI, PfiFI, PfiMI, PI-PspI, PI-Scel, PleI, PluTI, PmeI, PmII, PpuMI, PshAI, Psil, PspGI, PspOMI, PspXI, PstI, Pvul, Pvull, RsaI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SapI, Sau3AI, Sau96I, SbfI, ScrFI, SexAI, SfaNI, Sfcl, Sfil, SfoI, SgrAI, Smal, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, Stul, StyD4I, Styl, SwaI, TaqI, TfiI, TliI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspMI TspRI, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, XmnI, o ZraI. En algunas alternativas, la endonucleasa de restricción es BsaI. En algunas alternativas, la endonucleasa de restricción es Stul. En algunas alternativas, el sitio de restricción está invertido y el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está invertido.

Una endonucleasa de restricción de tipo II, tal como se describe en la presente memoria, se refiere a una endonucleasa que forma homodímeros, con sitios de reconocimiento que normalmente son indivisos y palindrómicos y tienen una longitud de 4-8 nucleótidos. Reconocen y escinden el ADN en el mismo sitio y no usan ATP ni AdoMet para su actividad.

Una “endonucleasa de restricción de tipo IIS”, como se describe en la presente memoria, se refiere a una endonucleasa que escinde el ADN a una distancia definida de sus sitios de reconocimiento asimétrico palindrómicos o no palindrómicos. Los ejemplos de endonucleasas de restricción de tipo IIS incluyen, pero no se limitan a AclI, MnlI, AlwI, BbvI, BclI, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, BsrI, BtsCI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MbolI, MlyI, PleI, SfaNI, AclI, BciVI, BfuAI, BmgBI, Bmrl, Bpml, BpuEI, Bsal, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, EciI, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, BaeI, BsaXI, CspCI, AfaI, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1II, R9529, Hsp92II, HspAI, MaeI, MaeII, MvnI, Pall, RsaNI, SetI, SgeI, Sse9I, Tru1I, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, XspI, AflI, AgsI, AspS9I, AsuC2I, AsuI, Bcefi, BcnI, Bisi, Bisi, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BsiFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, Caull, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FaqI, FinI, Fsp4HI, Glul, Hin4II, HpyF3I, Itai, MaeIII, MspR9I, Mval, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, Aaul, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AceII, AclI, AcvI, Acul, AhII, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, AsuII, AsuNHI, AvailI, AvilI, BanIII, Baul, Bbel, BbrPI, Bbul, Bbv12I, BbvII, Bce83I, Bcol, Bcul, Bfml, BfrBI, Bfrl, BlnI, BmcAI, BmeT110I, Bmil, Bmul, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMII, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstACI, BstAFI, BstAU, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSFI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, Bvel, Bvel, Ccil, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, Dsal, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoICRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, Egel, Ehel, ErhI, FauNDI, Fbal, FbII, FriOI, FunI, FunII, GdiI, Gsal, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI, KspI, Mfil, MhII, Misi, MluNI, Mly113I, Mph1103I, MroI, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, MunI, Mvri, NgoAIV, Nsbl, NspIII, NspV, Pael, PagI, Paul, Pcel, Pfi23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, Psul, Rcal, Sdul, Sfr274I, Sfr303I, Sful, SgrBI, Sial, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, Vnel, XapI, XhoII, XmaCI, XmaIII, XmaJI, XmiI, ZhoI, Zsp2I, Aocl, Axyl, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CellI, Cpol, CspI, Dral, Eco065I, Eco81I, Eco91I, Espl, KfiI, Lgul, Mabi, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, Saul, AbsI, CciNI, FspAI, MauBI, Mrel, MssI, Rgal, Sdal, SfaAI, Sgfi, Smil, Sse232I, Adel, Aspl, Cail, Psyl, Tell, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI, BstPAI, CjeNII, Mami, MroXI, Olil, Pdml, Rsel, SmiMI, AccB7I, AspEI, BasI, BmeRI, BpII, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, Cjel, Cjul, Cjull, Dril, Eam1105I, EclHKI, Fall, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PfiBI, UbaF14I, Xagl, Aasl, Bdal, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, Arsl, BarI, Pcsi y UbaF13I. El sitio de escisión de endonucleasa de restricción de tipo II y los sitios de reconocimiento se muestran en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). un polinucleótido que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. Algunos polinucleótidos comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente, en donde un segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, y en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo

ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de 1-55 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases, del sitio de escisión de endonucleasa de restricción para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 pares de bases, de la timina más 5' terminal (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa de restricción de tipo IIS es Acil, MnlI, AlwI, BbvI, BclI, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, BsrI, BtsCI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MbolI, MlyI, PstI, SfaNI, AclI, BciVI, BfuAI, BmgBI, Bmrl, Bpml, BpuEI, Bsal, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, EciI, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, Bael, BsaXI, CspCI, AfaI, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1II, R9529, Hsp92II, HspAI, Mael, MaeII, Mvnl, PalI, RsaNI, SetI, SgeI, Sse9I, Tru1I, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, XspI, AflI, AgsI, AspS9I, AsuC2I, Asul, Bcefl, BcnI, BslI, BslI, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BslFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, Caull, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FaqI, FinI, Fsp4HI, Glul, Hin4II, HpyF3I, Itai, MaeIII, BstSLI, MspR9I, Mval, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, Aaul, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AcclI, Acsl, AcvI, Acyl, AhI, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, AsulI, AsuNHI, AvailI, AvilI, BanIII, Baul, Bbel, BbrPI, Bul, Bbv12I, BbvII, Bce83I, BcoI, Bcul, Bfml, BfrBI, BfrI, BlnI, BmCI, BmeT110I, Bmil, Bmul, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMII, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstACI, BstAFI, BstAUI, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSFI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, Bvel, CciI, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, Dsal, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoICRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, Egel, Ehel, ErhI, FauNDI, Fbal, FbII, FriOI, FunI, FunII, GdII, Gsal, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI, KspI, MflI, MhII, MlsI, MluNI, Mly113I, Mph1103I, MroI, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, MunI, Mvrl, NgoAIV, Nsbl, NspIII, NspV, Pael, PagI, Paul, Pcel, Pfl23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, Psul, Rcal, Sdul, Sfr274I, Sfr303I, Sful, SgrBI, Sial, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, Vnel, XapI, XhoII, XmaCI, XmaIII, XmaJI, XmiI, ZhoI, Zsp2I, Aocl, AxyI, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CellI, Cpol, CspI, Drall, Eco065I, Eco81I, Eco91I, Espl, KflI, Lgul, Mabl, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, Saul, AbsI, CciNI, FspAI, MauBI, Mrel, MssI, Rgal, Sdal, SfaAI, Sgfl, Smil, Sse232I, Adel, Aspl, Cail, Psyl, Tell, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI, BstPAI, CjeNII, Maml, MroXI, OiiI, Pdml, Rsel, SmiMI, AccB7I, AspEI, BasI, BmeRI, BpII, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, Cjel, Cjul, Cjull, Dril, Eam1105I, EclHKI, Fail, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PflBI, UbaF14I, Xagl, Aasl, Bdal, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, Arsl, BarI, Pcsi o UbaF13I. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está situado dentro de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa o cualquier número de pares de bases entre dos valores mencionados anteriormente, y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 pares de bases de timina más 5' de la pluralidad de nucleótidos de timina o cualquier número de pares de bases entre los dos valores mencionados. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido y el sitio de escisión de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa y el sitio de escisión de endonucleasa comprenden una secuencia que se muestra en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636), en donde el sitio de reconocimiento de endonucleasay el sitio de escisión de endonucleasa son específicos para la endonucleasa de restricción de tipo II Acil, MnlI, AlwI, BbvI, BclI, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, BsrI, BtsCI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MbolI, MlyI, PstI, SfaNI, AclI, BciVI, BfuAI, BmgBI, Bmrl, Bpml, BpuEI, Bsal, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, EciI, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, Bael, BsaXI, CspCI, AfaI, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1II, R9529, Hsp92II, HspAI, Mael, MaeII, Mvnl, PalI, RsaNI, SetI, SgeI, Sse9I, Tru1I, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, XspI, AflI, AgsI, AspS9I, AsuC2I, Asul, Bcefl, BcnI, BslI, BslI, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BslFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, Caull, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FaqI, FinI, Fsp4HI, Glul, Hin4II, HpyF3I, Itai, MaeIII, MspR9I, Mval, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, Aaul, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AcclI, Acsl, AcvI, Acyl, AhI, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, AsulI, AsuNHI, AvailI, AvilI, BanIII, Baul, Bbel, BbrPI, Bul, Bbv12I, BbvII, Bce83I, BcoI, Bcul, Bfml, BfrBI, BfrI, BlnI, BmCI, BmeT110I, Bmil, Bmul, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMII, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstACI, BstAFI, BstAUI, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSFI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, Bvel, CciI, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, Dsal, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoICRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, Egel, Ehel, ErhI, FauNDI, Fbal, FbII, FriOI, FunI, FunII, GdII, Gsal, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI, KspI, MflI, MhII, MlsI, MluNI, Mly113I, Mph1103I, MroI, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, MunI, Mvrl, NgoAIV, Nsbl, NspIII, NspV, Pael, PagI, Paul, Pcel, Pfl23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, Psul, Rcal, Sdul, Sfr274I, Sfr303I, Sful, SgrBI, Sial, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, Vnel, XapI, XhoII, XmaCI, XmaIII, XmaJI, XmiI, ZhoI, Zsp2I, Aocl, AxyI, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CellI, Cpol, CspI, Drall, Eco065I, Eco81I, Eco91I, Espl, KflI, Lgul, Mabl, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, Saul, AbsI, CciNI, FspAI, MauBI, Mrel, MssI, Rgal, Sdal, SfaAI, Sgfl, Smil, Sse232I, Adel, Aspl, Cail, Psyl, Tell, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI, BstPAI, CjeNII, Maml, MroXI, OiiI, Pdml, Rsel, SmiMI, AccB7I, AspEI, BasI,

BmeRI, BpII, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, CjeI, CjuI, Cjui, Dril, Eam1105I, EclHKI, Fall, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PfiBI, UbaF14I, XagI, AasI, BdaI, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, Arsl, BarI, PcsI o UbaF13I. Tal como se muestra en la **Tabla 1**, la endonucleasa o endonucleasa de restricción puede escindir entre 1 y 50 bases de un sitio de reconocimiento (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

Un “sitio de reconocimiento”, tal como se describe en la presente memoria, se refiere a una secuencia en un sitio de ácido nucleico que es reconocida y unida por una enzima de restricción, nucleasa o endonucleasa de restricción.

Un “sitio de escisión”, tal como se describe en la presente memoria, es un sitio en un ácido nucleico que es escindido por una endonucleasa o endonucleasa de restricción. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de tipo IIS. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento y el sitio de escisión están invertidos.

Una “secuencia palindrómica”, tal como se describe en la presente memoria, se refiere a una secuencia de ácido nucleico en un ADN o ARN bicatenario en donde la lectura de 5' (cinco prima) a 3' (tres prima) hacia adelante en una cadena coincide con la lectura de la secuencia hacia atrás de 5' a 3' en la cadena complementaria o en sí misma. Las cadenas complementarias pueden unirse al complemento en una secuencia palindrómica que conduce a una estructura de “horquilla”.

“Un promotor” se refiere a una región del ADN que inicia la replicación. Los promotores pueden tener una longitud de 100-1000 pares de bases. En algunas alternativas, del polinucleótido, el polinucleótido comprende además un promotor de la ADN polimerasa.

La “estructura terciaria” es la estructura tridimensional formada por un ácido nucleico bicatenario o monocatenario y depende de las secuencias. Los ejemplos de estructuras terciarias observadas en el ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, una doble hélice, bucles troncales, horquillas, tríplex de surco mayor y menor (ARN), cuádruples, apilamiento coaxial, tetraloops, motivos en A menor y cremalleras de ribosa. En algunas alternativas del polinucleótido, el polinucleótido comprende además una sexta secuencia, en donde la sexta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria. En algunas alternativas, la estructura terciaria comprende una doble hélice, bucles troncales, horquillas, tríplex de surco mayor y menor (ARN), cuádruples, apilamiento coaxial, tetraloops, motivos en A menor y/o cremalleras de ribosa.

“Específica” o “especificidad”, tal como se describe en la presente memoria, se refiere a la capacidad de una proteína para unirse a un sitio de unión definido. Tal como se describe en la presente memoria, una enzima puede ser específica para unirse a una secuencia específica, por ejemplo, una secuencia específica en un ácido nucleico.

“Corriente arriba” y “corriente abajo”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a las posiciones relativas en el ADN o el ARN. Cada hebra de ADN o ARN tiene un extremo de 5' y un extremo de 3', llamados así por la posición del carbono en el anillo de desoxirribosa (o ribosa). Las direcciones ascendente y descendente se refieren a la dirección 5' a 3' en donde tiene lugar la transcripción del ARN. Corriente arriba está hacia el extremo 5' de la molécula de ARN y corriente abajo está hacia el extremo 3'. Cuando se considera el ADN bicatenario, corriente arriba está hacia el extremo 5' de la cadena codificante del gen en cuestión y corriente abajo está hacia el extremo 3'. Debido a la naturaleza antiparalela del ADN, esto significa que el extremo 3' de la cadena molde está corriente arriba del gen y el extremo 5' está corriente abajo.

El “extremo adhesivo”, tal como se denomina en la presente memoria, se refiere a un saliente, que es un tramo de nucleótidos no apareados en el extremo de una molécula de ADN. Los extremos pegajosos se pueden crear con una endonucleasa, tal como una endonucleasa de restricción. Por ejemplo, algunas endonucleasas escinden una secuencia palindrómica y pueden dejar un saliente o un extremo pegajoso.

“Extremo romo”, tal como se hace referencia en la presente memoria, se refiere a una molécula con extremos romos en donde ambas cadenas de un ácido nucleico terminan en un par de bases. Algunas alternativas se refieren a un polinucleótido que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho

sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, la endonucleasa produce un extremo romo durante la escisión. En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul.

Descripción detallada

El ARNm transcrito *in vitro* (IVT) se ha convertido en una realización importante de expresión transitoria de proteínas heterólogas para aplicaciones terapéuticas. La electroporación de los ARNm de IVT se está aplicando actualmente en contextos traduccionales que van desde la expresión *in vivo* de proteínas antigénicas en células dendríticas para vacunas contra el cáncer y las enfermedades infecciosas, hasta la expresión *ex vivo* de nucleasas en células madre hematopoyéticas primarias y células T para la edición de genes, y la expresión de receptores de antígenos quiméricos en células T humanas primarias para la inmunoterapia del cáncer. La expresión génica transitoria mediada por el ARNm de la IVT basada en nanopartículas está en desarrollo para su administración *in vivo* como una realización novedosa para las terapias de reemplazo de proteínas.

Una cuestión importante en cualquier aplicación de ARNm de IVT es obtener una expresión proteica eficiente. El aumento de la eficacia de la expresión reduce los costes al reducir directamente la cantidad de ARNm necesaria para un nivel de expresión requerido, y también puede reducir el potencial de antigenicidad del ARNm debido a la menor exposición de las células de un paciente a un ácido nucleico extraño. Se han identificado numerosos determinantes de la eficacia de la expresión de un ARNm, incluida la naturaleza del sitio de caperuza 5', la eficacia del tapado, la naturaleza de las UTR 5' y 3', la optimización de los codones de la secuencia codificante de la proteína, la presencia de secuencias diana de miARN en la secuencia codificante de la proteína y las UTR, y la longitud de la cola de poliadenosina (poli(A)). De estos determinantes, la longitud de la cola del poli(A) es el más problemático de optimizar: aunque se sabe que la longitud de la cola de poli(A) es uno de los determinantes fisiológicos más importantes de la eficiencia de la traducción y la estabilidad del ARNm, las tecnologías existentes no permiten la producción de ARNm de IVT con colas de poli(A) de longitud definida en el intervalo fisiológico (>200 pares de bases).

Las alternativas descritas en la presente memoria demuestran un método novedoso para la generación de tramos homopoliméricos de longitud y contenido arbitrarios, y demuestran que un plásmido lineal descrito anteriormente, el plásmido lineal, es capaz de propagar tramos de poli(A) de hasta al menos 500 pares de bases de longitud. Además, en una alternativa ejemplar, el plásmido lineal se modifica eliminando sitios Bsal extraños al tiempo que se incorpora un sitio Bsal único corriente abajo del tramo de poli(A) para crear pEVL, un plásmido lineal que permite la generación fácil de ARNm de IVT con colas de poli(A) definidas y extendidas usando la química convencional de la ARN polimerasa del fago T7.

En la presente memoria se describen métodos para fabricar un polinucleótido lineal que tiene un polímero de nucleótidos de desoxiadenosina unidos covalentemente, que puede extenderse a una longitud deseada en virtud de la presencia de un sitio de endonucleasa dentro o corriente arriba de dicho polímero de nucleótidos de desoxiadenosina unidos covalentemente, de tal manera que un inserto de poli(A) de una longitud deseada puede ligarse al polinucleótido que tiene el polímero de nucleótidos de desoxiadenosina unidos covalentemente y el sitio de endonucleasa, extendiendo así el tramo de poli(A) a la longitud deseada. El polinucleótido que tiene un polímero de nucleótidos de desoxiadenosina unidos covalentemente también puede denominarse polímero de desoxitimidinas unidas covalentemente o polímero de monofosfatos de desoxitimidina unidos covalentemente, cuando se hace referencia a la cadena antisentido o molde. La cadena de polinucleótidos se puede digerir y ligar para extender la longitud hasta 500 nucleótidos de timina o más. Este polinucleótido puede servir como cadena "antisentido" o cadena molde que luego se puede transcribir para generar un ARN que tenga un tramo de poli(A) de una longitud deseada, por ejemplo, la longitud del polímero de poli(T) después del ligamiento con el inserto de poli(T). El polinucleótido tal como se describe en la presente memoria puede servir como molde de ADN para la transcripción con mayor estabilidad, y puede mejorar la transcripción génica con menos etapas, lo que conduce a una mejor traducción de proteínas debido a un tramo de poli(A) más largo en el ARN transcrito, lo que sería un producto más puro, por ejemplo, las longitudes del ARN transcrito serían todas de un tamaño. Por consiguiente, en la presente memoria se describen varias composiciones y métodos para generar ácidos nucleicos que tienen un tramo de poli(T) y un tramo de poli(A). Tal como se usa en la presente memoria, en algunos aspectos, poli(A) y poli(T) se usan indistintamente en el mismo contexto dependiendo de la referencia a una cadena con sentido o sin sentido. Se contempla el uso de estas composiciones y métodos para aumentar la estabilidad de un transcrito de ácido nucleico, tal como un molde de ADN usado para la transcripción, potenciar y mejorar la transcripción génica, por ejemplo, permitiendo menos etapas para generar un producto de ARN homogéneo, y/o mejorar la traducción de proteínas, tal como un producto más eficaz. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). Las endonucleasas pueden ser una enzima que puede ser enzimas que escinden el enlace fosfodiéster dentro de un polinucleótido. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción,

una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, la traducción se realiza durante al menos, más de, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados.

El polinucleótido descrito en la presente memoria puede comprender además genes para la expresión. Los ejemplos de genes pueden incluir, pero no se limitan a, reguladores de la transcripción (por ejemplo, enzimas remodeladoras de histonas eucariotas, factores de transcripción, potenciadores y represores), receptores de antígenos quiméricos (CARs), receptores de células T (TCR), nucleasas (por ejemplo, Cas9 o un derivado del mismo o fragmento activo del mismo, véase, por ejemplo, Id. de sec. n.º 6-14, MegaTAL, TALEN), moduladores epigenéticos (por ejemplo, proteínas de metilación del ADN, proteínas de modificación de histonas, proteínas remodeladoras de la cromatina, proteínas de unión a metil-CpG) y antígenos de vacunas (por ejemplo, antígenos de vacunas contra el cáncer y antígenos de enfermedades infecciosas). Por consiguiente, en algunas alternativas, el polinucleótido codifica un gen. En algunas alternativas, el gen codifica enzimas remodeladoras de histonas eucariotas, factores de transcripción, potenciadores, represores, CAR, TCR, Cas9 o derivados de los mismos o fragmentos activos de los mismos (véase, por ejemplo, Id. de sec. n.º 6-14, MegaTAL, TALEN, proteínas de metilación de ADN, proteínas de modificación de histonas, proteínas remodeladoras de la cromatina, proteínas de unión a metil-CpG o un antígeno de vacuna. En muchas de las alternativas descritas en la presente memoria, el polinucleótido descrito en la presente memoria que tiene una cola de poli(T) o poli(A) codifica una nucleasa Cas9 y dicho polinucleótido se suministra a una célula con un ARN guía para permitir la edición del gen CRISPR/Cas9. Los componentes básicos del sistema CRISPR/Cas9 comprenden un gen diana, un ARN guía y una endonucleasa Cas9. Un aspecto importante de la aplicación de CRISPR/Cas9 para la edición de genes es la necesidad de un sistema que administre los ARN guía de manera eficiente a una amplia variedad de tipos de células. Esto podría implicar, por ejemplo, la administración de un ARN guía generado *in vitro* como ácido nucleico (el ARN guía generado mediante transcripción *in vitro* o síntesis química). En algunas alternativas, el ácido nucleico que codifica el ARN guía se vuelve resistente a las nucleasas mediante la incorporación de bases modificadas, tales como bases 2'O-metilo. Un sistema importante para expresar los ARN guía en este contexto se basa en el uso de vectores de virus adenoasociados (AAV) porque los vectores AAV pueden transducir una amplia gama de células primarias. Los vectores de AAV no causan infección y no se sabe que se integren en el genoma. Por lo tanto, el uso de vectores AAV tiene las ventajas de ser tanto seguro como eficaz.

Los extremos 3' de los ARN eucariotas reflejan su estado regulador y desempeñan un papel importante en la determinación del destino de los ARN. La función de la cola de poli(A) en el ARNm es importante para la exportación nuclear, ya que facilita el inicio y la eficiencia de la traducción y garantiza la estabilidad del ARNm, todo lo cual depende de la longitud de la cola de poliA. En eucariotas, la poliadenilación protege la molécula de ARNm de las exonucleasas y es importante para la terminación de la transcripción, para la exportación del ARNm desde el núcleo y para la eficacia de la traducción. Algunos ARNm procariotas también están poliadenilados, aunque la función de la cola de poli(A) es diferente a la de los eucariotas. Por ejemplo, en los procariotas, la poliadenilación promueve la degradación de un ARN regulador que inhibe la replicación de los plásmidos bacterianos y puede desempeñar un papel similar en la degradación del ARNm.

Debido a los beneficios de añadir una cola de poli(A) a un ARNm, se han descrito técnicas en donde se añaden colas de poli(A) a través de una enzima de poliadenilato comercial (por ejemplo, E-PAP) y métodos de PCR que usan un cebador específico para 5' y un cebador específico para la cola de poli(A). Sin embargo, hay muchos aspectos indeseables en estas técnicas. El uso de una enzima de poliadenilato, tal como la E-PAP, generará colas de poli(A) de longitudes variables, por ejemplo, lo que no es deseable en algunas aplicaciones. Además, los enfoques enzimáticos son una etapa costosa adicional y, por lo general, requieren procedimientos de purificación extensos, lo que puede conducir a una pérdida significativa del producto. Si bien la adición de una cola de poli(A) al ARNm mediante PCR evita la etapa enzimática adicional, las metodologías de PCR también pueden traer problemas adicionales, como la variación de la longitud, así como anomalías en la amplificación, que pueden deberse a genes específicos que no se amplifican fácilmente mediante PCR. La PCR también está restringida por el número de residuos de adenina que pueden estar contenidos en un cebador (~120). Más importante aún, también se limita a los genes que pueden amplificarse mediante PCR. Los genes que son refractarios a la PCR incluyen, pero no se limitan a, genes con elementos repetitivos (incluyendo las nucleasas efectoras TAL, que se usan actualmente en la edición del genoma), estructura secundaria, proporciones de GC sesgadas y otras características recalcitrantes. Además, las condiciones de PCR específicas requeridas para ciertos genes también pueden afectar a la amplificación (por ejemplo, las nucleasas efectoras TAL).

La adición de secuencias de poli(A) cortas también se puede realizar a través de plásmidos circulares de *Escherichia coli* disponibles comercialmente que contienen traods de politimina (poli(T)) para transcribir un ARNm con un tramo de poli(A). Sin embargo, los plásmidos disponibles comercialmente sólo contienen tramos de poli(T) de 30 bases de longitud, que no

son eficaces para su uso *in vivo* (sólo *in vitro*). Los plásmidos se pueden pedir a medida para que tengan hasta 100 tramos de poli(T), pero los tramos de poli(T) pueden acortarse rápidamente a aproximadamente 30-40 bases en condiciones de crecimiento normales. Otro aspecto no deseado puede derivarse del uso de plásmidos circulares requeridos por estas metodologías, tales como el superenrollamiento y la consiguiente incapacidad para clonar secuencias de polinucleótidos grandes o “difíciles” que no se mantienen fácilmente o son inestables en la forma de plásmido superenrollado. Lo que complica aún más estos enfoques es que la molde es muy inestable durante la propagación en *E. coli*, lo que conduce a tramos que sólo pueden transcribir colas de poli(A) de aproximadamente 30 adeninas, que pueden acortarse espontáneamente de nuevo, lo que lleva al problema de diferentes longitudes de cola de poli(A) en el ARNm del producto. Mantener una longitud mucho mayor del tramo de poli(A) se correlaciona con la eficiencia de la traducción, y para mantener una longitud de cola de poli(A) superior a 30 adeninas se requiere una condición de crecimiento de 25 °C para evitar el acortamiento. Sin embargo, las bajas temperaturas también pueden extender significativamente el tiempo de propagación.

En la presente descripción, la adición de un tramo de poli(A) de una longitud deseada se ha hecho posible al generar un polinucleótido que contiene poli(T) que tiene uno o más sitios de endonucleasa (por ejemplo, dentro del propio dominio de poli(T) o yuxtapuesto al dominio de poli(T)), tal como dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o 55 nucleótidos dentro de un intervalo definido por dos de los valores anteriormente mencionados del resto de timina más 5' del dominio de poli(T) en la cadena molde, pero configurada o espaciada para permitir la escisión enzimática dentro del dominio de poli(T)), lo que permite la introducción de un inserto que comprende un tramo de poli(T) adicional y el ligamiento, lo que, cuando se transcribe, permite controlar la longitud del tramo de poli(A) en un ARN resultante. En la presente memoria también se describen nuevos enfoques para añadir una cola de poli(A) a un gen “difícil” o grande. Las endonucleasas pueden ser una enzima que puede ser enzimas que escinden el enlace fosfodiéster dentro de un polinucleótido. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

Durante bastante tiempo, el campo ha deseado la capacidad de controlar la longitud de un tramo de poli(A) para aumentar la estabilidad del polinucleótido durante la replicación, aumentar la eficiencia transcripcional, aumentar la semivida o la estabilidad de una molécula de ARN, así como aumentar la eficiencia traduccional de un gen. Un aumento de la semivida del ARN también puede permitir el uso del ARN para aumentar la producción de proteínas. El ARN también puede usarse como un ARNm terapéutico en donde su semivida aumentada puede conducir a la producción de una proteína que se necesita en la terapia, y la descomposición del ARNm terapéutico se puede controlar usando una longitud de cola de poli(A) determinada para alargar el tiempo de tratamiento.

Las colas de poli(A) con bases de terminación alternativas también pueden lograrse mediante los métodos descritos en la presente memoria. Hasta la fecha, no se han descrito métodos en los que una cola de poli(A) pueda terminar en una base nucleotídica alternativa, tal como guanina, citosina, timina o uracilo, mediante el uso de una enzima o un plásmido disponible. La creación de una cola de poli(A) con secuencias terminales alternativas puede permitir probar la influencia de varias colas. En algunas alternativas, se forma un polinucleótido que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina y se inserta un sitio de reconocimiento de endonucleasa en el mismo o se yuxtapone al tramo de poli(T) (por ejemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o 55 nucleótidos o varios nucleótidos dentro de un intervalo definido por dos de los valores anteriormente mencionados a partir del residuo de timina más 5' del dominio de poli(T) de la cadena molde, pero configurados o espaciados para permitir la escisión enzimática dentro del dominio de poli(T)), lo que permite la introducción de un inserto que comprende un tramo de poli(T) adicional y el ligamiento, lo que, cuando se transcribe, permite controlar la longitud del tramo de poli(A) en un ARN resultante. En algunas alternativas, el polinucleótido se extiende mediante la inserción y el ligamiento de un polímero de residuos de timina unidos covalentemente que terminan en guanina, citosina o adenina. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de

timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

Los factores importantes para la producción de ARNm pueden incluir, pero no se limitan a, la estabilidad de la longitud de la cola, la pureza y uniformidad del ARNm y los factores de coste y tiempo. En la presente memoria se describen métodos en donde la adición de un tramo de poli(A) a un ARNm se realiza en un proceso de una sola etapa. Un proceso de una sola etapa es altamente deseable en comparación con los procesos de múltiples etapas que implican el uso de PCR y enzimas para añadir un tramo de poli(A). Además, el ARNm producido a partir de un polinucleótido que comprende un tramo de poli(T) que tiene uno o más sitios de escisión de endonucleasas que permiten la introducción de un inserto, puede usarse tanto en enfoques biotecnológicos como terapéuticos. El polinucleótido que genera el polipéptido resultante, por ejemplo, un vector, también puede tener una secuencia de consenso para iniciar el proceso de traducción. Sin ser limitativos, tales secuencias de consenso pueden incluir secuencias de consenso de Kozak, T3, SP6 y/o T7. El polinucleótido que genera el ácido nucleico resultante también puede incluir codones de parada y/o secuencias de expresión en mamíferos, tales como secuencias de activación o secuencias potenciadoras. Sin ser limitativos, los codones de parada pueden incluir secuencias TAG, TAA y TGA. Sin ser limitativos, los codones de parada en el ARN pueden incluir secuencias UAG, UAA y UGA. En algunas alternativas del polinucleótido, el polinucleótido comprende codones de parada. En algunas alternativas, los codones de parada son secuencias TAG, TAA o TGA. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

Según un enfoque, se forma un polinucleótido lineal que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina y se inserta un sitio de reconocimiento de endonucleasa en el mismo o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o 55 nucleótidos o varios nucleótidos dentro de un intervalo definido por dos de los valores anteriormente mencionados a partir del residuo de timina más 5' del dominio de poli(T) de la cadena molde, pero configurados o espaciados para permitir la escisión enzimática dentro del dominio de poli(T)), lo que permite la introducción de un inserto que comprende un tramo de poli(T) adicional y el ligamiento, lo que, cuando se transcribe, permite controlar la longitud del tramo de poli(A) en un ARN resultante. Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan métodos para fabricar un ácido nucleico a partir de un polinucleótido que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina y un sitio de reconocimiento de endonucleasa dispuesto dentro o yuxtapuesto a (por ejemplo, 1-55 nucleótidos corriente abajo de la timina más corriente abajo o más 5' del tramo de poli(T)) dicha pluralidad de nucleótidos de timina de la cadena molde). Los métodos para mejorar la transcripción y la traducción utilizando dichas composiciones también son alternativas. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un polinucleótido que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1-

55 pares de bases (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases) del sitio de escisión de endonucleasa la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa están dentro de 1 a 40 pares de bases (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases) de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una secuencia T3, SP6 y/o T7. En algunas alternativas, el polinucleótido puede comprender además una secuencia de Kozak. En algunas alternativas, el polinucleótido puede comprender además un codón de terminación. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, las timinas unidas covalentemente terminan en una guanina, adenina o citosina después de la escisión por la endonucleasa. En algunas alternativas, existe una secuencia que es complementaria a un sitio de endonucleasa (en la cadena sencilla), en donde la secuencia es complementaria a cualquiera de los sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción establecidos en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636) y la Id. de sec. n.º: 633. En algunas alternativas, los sitios de reconocimiento de las endonucleasas y la secuencia complementaria están invertidos. Las endonucleasas pueden ser una enzima que puede ser enzimas que escinden el enlace fosfodiéster dentro de un polinucleótido. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, el polinucleótido lineal resultante que comprende dicha cadena molde comprende un primer y un segundo ácido nucleico. El segundo ácido nucleico comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente o cualquier número de nucleótidos de timina entre los dos valores mencionados anteriormente, y el segundo ácido nucleico comprende además el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa es dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina. El primer ácido nucleico comprende el sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde el primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa o cualquier número de pares de bases entre cualquiera de los dos valores anteriormente mencionados, y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases de la mayor cantidad de nucleótidos de timina en 5' de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, esto permite la escisión enzimática dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina (dominio de poli(T)) dejando un inserto de poli(T) de una longitud deseada que comprende un polímero final de residuos de timina unidos covalentemente que es al menos, mayor a, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 residuos de timina o cualquier número de residuos de timina entre cualquiera de los dos valores anteriormente mencionados. Tal como se muestra en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636) y la Id. de sec. n.º: 633, un sitio de reconocimiento de endonucleasa puede residir entre 1 y 50 ácidos nucleicos lejos de un sitio de escisión, por lo tanto, para lograr una cola de poli(A) de 500 adeninas, la poli(T) debe tener una longitud superior a 500 timinas, dependiendo de la endonucleasa usada. En algunas alternativas, el polinucleótido resultante que tiene un polímero de nucleótidos de timina unidos covalentemente, se proporciona un sitio de reconocimiento de endonucleasa dentro de dicho polímero de nucleótidos de timina enlazados covalentemente o dentro de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 50 o 55 nucleótidos o un número de nucleótidos dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores mencionados a partir del residuo de timina más 5' del dominio de poli(T) pero configurado o espaciado para permitir la escisión enzimática dentro del dominio de poli(T)), y un inserto de poli(T) de una longitud deseada comprende un polímero final de residuos de timina enlazados covalentemente que es al menos, mayor que, igual a, o cualquier número entre 200 o 550 residuos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido resultante tiene un polímero de nucleótidos de timina unidos covalentemente, un sitio de endonucleasa dentro de dicho polímero de nucleótidos de timina unidos covalentemente o dentro de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 55 nucleótidos dentro de un intervalo definido por dos de los valores anteriormente mencionados de la mayoría de los residuos de timina 5' de poli(T) en la cadena molde, pero configurado o espaciado para permitir la escisión enzimática dentro del dominio de poli(T)), y un inserto de poli(T) de una longitud deseada comprende un polímero de residuos de timina unidos covalentemente que es al menos, mayor a, igual a, o cualquier número entre 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o 550 residuos de timina. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, las timinas unidas covalentemente terminan en una guanina, adenina o citosina después de la

escisión por la endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido puede codificar además un gen. En algunas alternativas, el gen es una endonucleasa. En algunas alternativas, el gen es Cas9 o un derivado del mismo o un fragmento activo del mismo, véase, por ejemplo, **Id. de sec. n.º 6-14**. En algunas alternativas, el gen es una TALEN. En algunas alternativas, el gen es una MegaTAL. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, las timinas unidas covalentemente terminan en una guanina, adenina o citosina después de la escisión por la endonucleasa. En algunas alternativas, los sitios de reconocimiento de las endonucleasas y la secuencia complementaria están invertidos. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es una secuencia que se muestra en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa expuesto en la **Tabla 1** está invertido. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, en donde la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, la endonucleasa se escinde en el lado 5' de la guanina, citosina o adenina.

En la presente memoria también se describen métodos para fabricar dicho ácido nucleico, tal como el ARN. Según algunos enfoques, el método comprende proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas descritas anteriormente y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor para una ADN o ARN polimerasa o ambas. En algunas alternativas, los nucleótidos que se incluyen en la reacción con la polimerasa son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es AclI, MnlI, AlwI, BbvI, BclI, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, BsrI, BtsCI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MboII, MlyI, PleI, SfaNI, AclI, BciVI, BfuAI, BmgBI, BmrI, Bpml, BpuEI, Bsal, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, EciI, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, Bael, BsaXI, CspCI, AfaI, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1I, R9529, Hsp92II, HspAI, MaeI, MaeII, MvnI, PalI, RsaNI, SetI, SgeI, Sse9I, Tru1I, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, XspI, AflI, AgsI, AspS9I, AsuC2I, AsuI, BceFI, BcnI, BsiI, BslI, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BslFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, CautI, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FagI, FinI, Fsp4HI, GluI, Hin4II, HpyF3I, ItaI, MaeIII, MspR9I, MvaI, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, AauI, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AccIII, AclI, AcvI, AcylI, AhII, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, AsuI, AsuNHI, AvaII, AvallI, AvallI, BaulI, BbelI, BbrPI, BbulI, Bbv12I, BbvII, Bce83I, BcolI, BculI, BfmI, BfrBI, BfrI, BlnI, BmCI, BmeT110I, BmilI, BmulI, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMII, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstACI, BstAFI, BstAUI, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSFI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, BvelI, CciI, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, DsaI, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoCRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, EgeI, EhelI, ErhI, FauNDI, FbaI, FblI, FriOI, FunI, FunII, GdII, GsaI, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI, KspI, MflI, MhII, MIsI, MluNI, Mly113I, Mph1103I, MroI, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, MunI, MvrlI, NgoAIV, NsblI, NspIII, NspV, PaeI, PagI, PaulI, PcelI, Pfl23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, PsulI, RcaI, SduI, Sfr274I, Sfr303I, SfulI, SgrBI, SialI, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, VneI, XapI, XhoI, XmaCI, XmaII, XmaJI, XmiI, ZhoI, Zsp2I, AocI, AxyI, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CeliI, CpolI, CspI, DralI, Eco065I, Eco81I, Eco91I, EspI, KfiI, LguI, MablI, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, SaulI, AbsI, CciNI, FspAI, MauBI, MrelI, MssI, RgalI, SdalI, SfaAI, SgfiI, SmilI, Sse232I, AdelI, AsplI, CailI, PsylI, TellI, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI, BstPAI, CjeNII, MamI, MroXI, OilI, PdmlI, RselI, SmiMI, AccB7I, AspEI, BasI, BmeRI, BplI, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, CjelI, CjulI, CjullI, DrilI, Eam1105I, EclHKI, FallI, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PflBI, UbaF14I, XagI, AasI, BdalI, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, ArslI, BarI, PcsiI o UbaF13I. En algunas alternativas, el ARN resultante obtenido después de la transcripción de los constructos que contienen poli(T) mencionados anteriormente comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 residuos de adenina unidos covalentemente y dicho ARN puede contener una secuencia complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa (en la cadena sencilla), tal como Stul o Bsal, dentro de dicha cola de poli(A) o yuxtapuesta a dicha cola de poli(A) (por ejemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o 55 nucleótidos o varios nucleótidos dentro de un

intervalo definido por dos de los valores anteriormente mencionados (en orientación 5') del primer residuo de adenina del dominio de poli(A)), cuando el polinucleótido no es escindido por la endonucleasa. En algunas alternativas, en donde el polinucleótido no es escindido por la endonucleasa, el ácido nucleico (ARN) resultante comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 residuos de adenina unidos covalentemente. En algunas alternativas, el ARN resultante (ARNm) termina en una guanina, citosina o uracilo. En algunas alternativas, el ARNm comprende una cola de poli(A), en donde dentro de dicha cola de poli(A) existe una secuencia que es complementaria a un sitio de endonucleasa (en la cadena sencilla), tal como el sitio Stul o Bsal. En algunas alternativas, existe una secuencia que es complementaria a un sitio de endonucleasa (en la cadena sencilla), en donde la secuencia es complementaria a cualquiera de los sitios de reconocimiento de endonucleasas establecidos en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, los sitios de reconocimiento de las endonucleasas y la secuencia complementaria están invertidos. En algunas alternativas, el ARNm comprende una primera secuencia que codifica un complemento de ARN para al menos un sitio de endonucleasa, tal como un sitio Stul o Bsal, en donde la secuencia que codifica el complemento de ARN está unida covalentemente a una pluralidad de nucleótidos de adenina en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina. En algunas alternativas, el ARNm comprende o codifica además un gen. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica Cas9 o un derivado del mismo o un fragmento activo del mismo, véase, por ejemplo, Id. de sec. n.º 6-14, TALEN o MegaTAL. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido, y la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento del sitio de la endonucleasa invertido (en la cadena sencilla). En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es una secuencia que se muestra en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, la al menos una endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, tal como el sitio Stul o Bsal. En algunas alternativas, una endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, se proporciona una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica comprende un vehículo farmacéutico y un ácido nucleico. En algunas alternativas, se proporcionan métodos para administrar una composición farmacéutica a un sujeto necesitado. En algunas alternativas, se proporcionan métodos para introducir un ARNm en una célula para su administración a un sujeto que lo necesite. En estas alternativas, la célula se proporciona para la traducción de una proteína para la terapia en el sujeto que la necesite. En algunas alternativas, la proteína es una nucleasa, tal como Cas 9 o un derivado de la misma, véase, por ejemplo, Id. de sec. n.º 6-14, TALEN o MegaTAL. En algunas alternativas, se proporciona un método para administrar una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico, en donde el método comprende administrar la composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, en donde la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, la endonucleasa se escinde en el lado 5' de la guanina, citosina o adenina.

Sitios de endonucleasas, sitios de endonucleasas de restricción y enzimas (endonucleasas).

Puede añadirse un gen a un plásmido mediante la amplificación del gen usando métodos de PCR, en donde los sitios de reconocimiento de endonucleasas se añaden al gen por medio de cebadores y dicho gen se inserta después en el plásmido mediante técnicas de clonación molecular, por ejemplo, reacciones de ligamiento. Los “sitios de restricción”, los “sitios de reconocimiento de endonucleasas” o los “sitios de escisión de endonucleasas” o los “dominios de unión a enzimas de restricción” son ubicaciones en un ácido nucleico que contienen secuencias específicas de nucleótidos que son reconocidas y escindidas por las enzimas de restricción y dichos sitios de reconocimiento de restricción pueden variar de 4 a 10 bases de longitud. Los sitios de restricción pueden ser palindrómicos y, dependiendo del tipo de enzima de restricción, la enzima de restricción puede cortar la secuencia entre dos nucleótidos dentro del sitio de reconocimiento, o puede cortar corriente arriba o corriente abajo del sitio de reconocimiento, de modo que el sitio de escisión de endonucleasa esté a una distancia específica de un sitio de reconocimiento de endonucleasa. “Enzima de restricción”, tal como se describe en la presente memoria, se refiere a una enzima que puede cortar el ácido nucleico en o cerca de secuencias de nucleótidos de reconocimiento específicas conocidas como sitios de restricción. Las enzimas de restricción se clasifican comúnmente en tres tipos, que difieren en su estructura y en si cortan su sustrato de ácido nucleico en su sitio de reconocimiento, o si los sitios de reconocimiento y escisión están separados entre sí. Para cortar un ácido nucleico, todas las enzimas de restricción hacen dos incisiones, una a través de cada cadena principal de azúcar y fosfato (es decir, cada cadena) de una secuencia de ácido nucleico bicatenario. Hay más de 3000 enzimas de restricción, de las cuales más de

600 están disponibles comercialmente. Hay 5 tipos de enzimas de restricción (tipo I, II, III, IV y V). Las enzimas de tipo II son homodímeros, en los que los sitios de reconocimiento suelen ser indivisos y palindrómicos y tienen una longitud de 4 a 8 nucleótidos. Reconocen y escinden el ADN en el mismo sitio, y no usan ATP ni AdoMet para su actividad y muchos solo requieren Mg^{2+} como cofactor. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo como que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, en donde la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, la endonucleasa se escinde en el lado 5' de la guanina., citosina o adenina.

Además, también hay subgrupos del tipo II, tales como las endonucleasas de restricción de tipo IIS. Las endonucleasas de restricción de tipo IIS pueden escindir el ADN a una distancia definida de sus sitios de reconocimiento asimétrico no palindrómicos. Por consiguiente, en algunas alternativas proporcionadas en la presente memoria, el sitio de reconocimiento de endonucleasa o el sitio de unión de la enzima se encuentra dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o 55 nucleótidos (o un número de nucleótidos dentro de un intervalo definido por dos de los valores anteriormente mencionados) desde el máximo 5' de timina de la pluralidad de residuos de timina de la cadena molde, que luego se convierte en la pluralidad de residuos de adenina de la cola de poli(A) tras la transcripción de la secuencia, y tras al unirse la endonucleasa a dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa o sitio de unión a la enzima, se produce la escisión dentro del dominio de poli(T). La escisión dentro de la pluralidad de residuos de timina puede producirse cuando se invierte el sitio de reconocimiento de endonucleasa. Además, las enzimas también pueden funcionar como dímeros. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo como que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, en donde la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, la endonucleasa se escinde en el lado 5' de la guanina., citosina o adenina.

Sin carácter limitativo, los ejemplos de sitios de endonucleasas que pueden incorporarse en uno o más de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, que tienen la capacidad de generar una región de poli(T) de un tamaño deseado o tienen la capacidad de generar un ARN que tiene una región de poli(A) de una longitud deseada después de la transcripción incluyen: sitios de restricción AatII, AatSI, Acc65I, AccI, AclI, AclI, Afel, AflII, AflIII, Agel, AhdI, AleI, AluI, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeKI, Apol, Ascl, Asel, AsiSI, Aval, Avail, AvrII, BaeGI, BaeI, BamHI, BanI, BanII, BbsI, BbvCI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BclI, BcoDI, BfaI, BfuAI, BfuCI, BglI, BglII, BplI, BmgBI, BmrI, BmtI, Bpml, Bpu10I, BpuEI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, BsaI, BsaJI, BsaWI, BsaXI, BseRI, BseYI, BsgI, BsiEI, BsiHKA, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BsoBI, Bsp1286I, BspCNI, BspDI, BspEI, BspHI, BspMI, BspQI, BsrBI, BsrDI, BsrFI, BsrGI, Bsrl, BssHII, BssKI, BssSI, BstAPI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZ17I, Bsu36I, BtgI, BtgZI, BtsCI, BtsI, BtsIMutI, Cac8I, ClaI, CspCI, CviAII, CviKI-1, CviQI, Ddel, Dpnl, DpnlI, DraI, DrdI, EaeI, EagI, EarI, Eco53kI, EcoNI, EcoO109I, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, FatI, FauI, Fnu4HI, FokI, FseI, FspEI, FspI, HaeII, HaeIII, HgaI, HhaI, HincII, HindIII, HinfI, HinPI, HpaI, HpaII, HphI, Hpy166II, Hpy188I, Hpy188III, Hpy99I, HpyA, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V, I-CeuI, I-SceI, KasI, KpnI, LpnPI, MboI, MboII, MfeI, MluCI, MluI, MlyI, MmeI, MnlI, MscI, MseI, MslI, MspA1I, Mspl, MspJI, MwoI, NaeI, NarI, BbvCI, BsmI, BsrDI, BtsI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NlaIII, NlaIV, NmeAIII, NotI, Nrul, NsiI, Nspl, NtAlwI, NtBbvCI, NtBsmAI, NtBspQI, NtBstNBI, NtCviPII, PacI, PaeR7I, PciI, PfiFI, PfiMI, PI-PspI, PI-SceI, PleI, PluTI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, PsiI, PspGI, PspOMI, PspXI, PstI, PvulI, RsaI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SapI, Sau3AI, Sau96I, SbfI, ScrFI, SexAI, SfaNI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, SmaII, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, Stul, StyD4I, Styl, SwaI, TaqI, TfiI, TliI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspMI TspRI, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, XmnI, y/o ZraI.

Los ejemplos de enzimas de restricción de tipo IIS pueden incluir, pero no se limitan a, Acil, MnlI, AlwI, BbvI, BclI, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, BsrI, BtsCI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MboII, MlyI, PstI, SfaNI, AclI, BciVI, BfuAI, BmgBI, Bmrl, Bpml, BpuEI, Bsal, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, EciI, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, Bael, BsaXI, CspCI, Afal, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1I, R9529, Hsp92II, HspAI, MaeI, Maell, Mvnl, Pall, RsaNI, SetI, SgeI, Sse9I, Tru1I, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, XspI, AflI, AgsI, AspS9I, AsuC2I, AsuI, Bcefl, BcnI, Bisl, BslI, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BslFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, Caull, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FagI, FinI, Fsp4HI, Glul, Hin4II, HpyF3I, Ital, MaeIII, MspR9I, Mval, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, AauI, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AceII, Acsl, AcvI, Acyl, AhII, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, AsuII, AsuNHI, AvalI, AvII, BanIII, Baul, Bbel, BbrPI, Bbul, Bbv12I, BbvII, Bce83I, Bcol, Bcul, Bfml, BfrBI, BfrI, BlnI, BmcAI, BmeT110I, Bmil, Bmul, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMI, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssTI, Bst1107I, Bst98I, BstACI, BstAFI, BstAUI, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSFI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, Bvel, CciI, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, Dsal, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoICRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, Egel, Ehel, ErhI, FauNDI, Fbal, FbII, FriOI, FunI, FunII, GdiI, Gsal, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI, Kspl, MflI, MhII, MlsI, MluNI, Mly113I, Mph1103I, MroI, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, MunI, Mvri, NgoAIV, Nsbl, NspIII, NspV, Pael, PagI, Paul, Pcel, Pfl23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, Psul, Rcal, Sdul, Sfr274I, Sfr303I, Sful, SgrBI, Sial, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, Vnel, XapI, XhoII, XmaCI, XmaII, XmaJI, XmiI, ZhoI, Zsp2I, Aocl, Axyl, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CellI, Cpol, Cspl, Drall, Eco065I, Eco81I, Eco91I, Espl, KflI, Lgul, Mabl, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, Saul, AbsI, CciNI, FspAI, MauBI, Mrel, MssI, Rgal, Sdal, SfaAI, Sgfl, Smil, Sse232I, Adel, Aspl, Cail, Psyl, Tell, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI, BstPAI, CjeNI, MamI, MroXI, OIil, Pdml, Rsel, SmiMI, AccB7I, AspEI, BasI, BmeRI, BpII, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, Cjel, Cjul, Cjull, Dril, Eam1105I, EclHKI, Fall, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PflBI, UbaF14I, Xagl, Aasl, Bdal, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, Arsl, BarI, Pcsi y UbaF13I. Tal como se muestra en la **Tabla 1**, estas enzimas tienen un sitio de reconocimiento que está a varios pares de bases del sitio de escisión de la enzima. Tal como se muestra en la **Tabla 1**, a continuación, la restricción de tipo IIS reconocerá un sitio de reconocimiento de secuencias y puede separarse del sitio de reconocimiento de secuencias. En las alternativas descritas en la presente memoria, estos sitios de reconocimiento de secuencias pueden invertirse de modo que el sitio de escisión esté dentro de la pluralidad de residuos de timina.

Tal como se muestra para MnlI, por ejemplo, en la **Tabla 1**, MnlI reconocerá el CCTC unido a su complemento en un ácido nucleico bicatenario y escindirán 7 nucleótidos del sitio de reconocimiento. Tal como se muestra en la **Tabla 1**, hay enzimas que también pueden escindir aproximadamente 40 o más residuos de ácido nucleico del sitio de reconocimiento. En algunas alternativas descritas en la presente memoria, el sitio de reconocimiento de secuencias comprende un sitio de reconocimiento de secuencias de cualquiera de los sitios de reconocimiento de secuencias descritos en la **Tabla 1**. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de secuencia se invierte para una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el sitio de corte o sitio de escisión de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa comprende cualquiera de los sitios de reconocimiento de endonucleasas descritos en la **Tabla 1**. En algunas alternativas, la endonucleasa es Acil, MnlI, AlwI, BbvI, BclI, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, BsrI, BtsCI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MboII, MlyI, PstI, SfaNI, AclI, BciVI, BfuAI, BmgBI, Bmrl, Bpml, BpuEI, Bsal, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, EciI, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, Bael, BsaXI, CspCI, Afal, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1I, R9529, Hsp92II, HspAI, MaeI, Maell, Mvnl, Pall, RsaNI, SetI, SgeI, Sse9I, Tru1I, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, XspI, AflI, AgsI, AspS9I, AsuC2I, AsuI, Bcefl, BcnI, Bisl, BslI, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BslFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, Caull, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FagI, FinI, Fsp4HI, Glul, Hin4II, HpyF3I, Ital, MaeIII, MspR9I, Mval, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, AauI, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AceII, Acsl, AcvI, Acyl, AhII, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, AsuII, AsuNHI, AvalI, AvII, BanIII, Baul, Bbel, BbrPI, Bbul, Bbv12I, BbvII, Bce83I, Bcol, Bcul, Bfml, BfrBI, BfrI, BlnI, BmcAI, BmeT110I, Bmil, Bmul, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMI, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssTI, BstACI, BstAFI, BstAUI, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSFI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, Bvel, CciI, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, Dsal, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoICRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, Egel, Ehel, ErhI, FauNDI, Fbal, FbII, FriOI, FunI, FunII, GdiI, Gsal, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI, Kspl, MflI, MhII, MlsI, MluNI, Mly113I, Mph1103I, MroI, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, MunI, Mvri, NgoAIV, Nsbl, NspIII, NspV, Pael, PagI, Paul, Peel, Pfl23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, Psul, Real, Sdul, Sfr274I, Sfr303I, Sful, SgrBI, Sial, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, Vnel, XapI, XhoII, XmaCI, XmaII, XmaJI, XmiI, ZhoI, Zsp2I, Aocl, Axyl, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CellI, Cpol, Cspl, Drall, Eco065I, Eco81I, Eco91I, Espl, KflI, Lgul, Mabl, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, Saul, AbsI, CciNI, FspAI,

MauBI, Mrel, Mssl, Rgal, Sdal, SfaAI, Sgfl, Smil, Sse232I, Adel, Aspl, Cail, Psyl, Tell, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI, BstPAI, CjeNII, Maml, MroXI, Olil, Pdml, Rsel, SmiMI, AccB71, AspEI, BasI, BmeRI, BpII, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, Cjel, Cjul, Cjull, Dnl, Eam1105I, EclHKI, Fall, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PflBI, UbaF14I, Xagl, Aasl, Bdal, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, Arsl, BarI, Pcsi o UbaF13I.

Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, en donde la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, la endonucleasa se escinde en el lado 5' de la guanina, citosina o adenina.

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
Acil	CCGC (Id. de sec. n.º 18)	C / C G C (Id. de sec. n.º 18) G G C / G (Id. de sec. n.º 19)
MnII	CCTC (Id. de sec. n.º 20)	C C T C N N N N N N / (Id. de sec. n.º 21) G G A G N N N N N N / N (Id. de sec. n.º 22)
AlwI	GGATC (Id. de sec. n.º 23)	G G A T C N N N N / N (Id. de sec. n.º 24) C C T A G N N N N N / (Id. de sec. n.º 25)
BbvI	GCAGC (Id. de sec. n.º 26)	G C A G C N N N N N N N N N N N N N N (Id. de sec. n.º 27) C G T C G N N N N N N N N N N N N N I (Id. de sec. n.º 28)
BccI	CCATC (Id. de sec. n.º 29)	G C A G C N N N N N N N N N N N N N N (Id. de sec. n.º 30) C G T C G N N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 31)
BceAI	ACGGC (Id. de sec. n.º 32)	A C G G C N N N N N N N N N N N N N N I N N (Id. de sec. n.º 33) T G C C G N N N N N N N N N N N N N N I (Id. de sec. n.º 34)
BsmAI	GTCTC (Id. de sec. n.º 35)	G T C T C N / N N N N (Id. de sec. n.º 36) C A G A G N N N N N / (Id. de sec. n.º 37)
BsmFI	GGGAC (Id. de sec. n.º 38)	G G G A C N N N N N N N N N N N N N N N (Id. de sec. n.º 39) C C C T G N N N N N N N N N N N N N N I (Id. de sec. n.º 40)
BspCNI	CTCAG (Id. de sec. n.º 41)	C T C A G N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 42) G A G T C N N N N N N N N N N N N (Id. de sec. n.º 43)
BsrI	ACTGG (Id. de sec. n.º 44)	A C T G G N / (Id. de sec. n.º 45) T G A C / C N (Id. de sec. n.º 46)
BtsCI	GGATG (Id. de sec. n.º 47)	G G A T G N N / (Id. de sec. n.º 48) C C T A C / N N (Id. de sec. n.º 49)
FokI	GGATG (Id. de sec. n.º 50)	G G A T G N N N N N N N N N N N N N N N (Id. de sec. n.º 51) C C T A C N N N N N N N N N N N N N N I (Id. de sec. n.º 52)
HgaI	GACGC (Id. de sec. n.º 53)	G A C G C N N N N N N N N N N N N N N (Id. de sec. n.º 54) C T G C G N N N N N N N N N N N N N I (Id. de sec. n.º 55)
HphI	GGTGA (Id. de sec. n.º 56)	G G T G A N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 57) C C A C T N N N N N N N N N N / N (Id. de sec. n.º 58)
HpyAV	CCTTC (Id. de sec. n.º 59)	C C T T C N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 60) G G A A G N N N N N N I N (Id. de sec. n.º 61)
MboII	GAAGA (Id. de sec. n.º 62)	G A A G A N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 63) C T T C T N N N N N N N N N N / N (Id. de sec. n.º 64)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
MlyI	GAGTC (Id. de sec. n.º 65)	G A G T C N N N N N / (Id. de sec. n.º 66) C T C A G N N N N N / (Id. de sec. n.º 67)
PleI	GAGTC (Id. de sec. n.º 68)	G A G T C N N N N N / N (Id. de sec. n.º 69) C T C A G N N N N N / (Id. de sec. n.º 70)
SfaNI	GCATC (Id. de sec. n.º 71)	G C A T C N N N N N N I N N N N (Id. de sec. n.º 72) C G T A G N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 73)
AcuI	CTGAAG (Id. de sec. n.º 74)	C T G A A G N N N N N N N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 75) G A C T T C N N N N N N N N N N N N N N N N / N N (Id. de sec. n.º 76)
BciVI	GTATCC (Id. de sec. n.º 77)	G T A T C C N N N N N N / (Id. de sec. n.º 78) C A T A G G N N N N N / N (Id. de sec. n.º 79)
BfuAI	ACCTGC (Id. de sec. n.º 80)	A C C T G C N N N N / N N N N (Id. de sec. n.º 81) T G G A C G N N N N N N N N N I (Id. de sec. n.º 82)
BmgBI	CACGTC (Id. de sec. n.º 83)	C A C / G T C (Id. de sec. n.º 84) G T G / C A G (Id. de sec. n.º 85)
Bmrl	ACTGGG (Id. de sec. n.º 86)	A C T G G G N N N N N / (Id. de sec. n.º 87) T G A C C C N N N N / N (Id. de sec. n.º 88)
Bpml	CTGGAG (Id. de sec. n.º 89)	C T G G A G N N N N N N N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 90) G A C C T C N N N N N N N N N N N N N N N N / N N (Id. de sec. n.º 91)
BpuEI	CTTGAG (Id. de sec. n.º 92)	C T T G A G N N N N N N N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 93) G A A C T C N N N N N N N N N N N N N N N N / N N (Id. de sec. n.º 94)
Bsal	GGTCTC (Id. de sec. n.º 95)	G G T C T C N / N N N N (Id. de sec. n.º 96) C C A G A G N N N N N / (Id. de sec. n.º 97)
BseRI	GAGGAG (Id. de sec. n.º 98)	G A G G A G N N N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 99) C T C C T C N N N N N N N N N N / N N (Id. de sec. n.º 100)
BsgI	GTGCAG (Id. de sec. n.º 101)	G T G C A G N N N N N N N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 102) C A C G T C N N N N N N N N N N N N N N N N / N N (Id. de sec. n.º 103)
BsmI	GAATGC (Id. de sec. n.º 104)	G A A T G C N / (Id. de sec. n.º 105) C T T A C / G N (Id. de sec. n.º 106)
BspMI	ACCTGC (Id. de sec. n.º 107)	A C C T G C N N N N / N N N N (Id. de sec. n.º 108) T G G A C G N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 109)
BsrBI	CCGCTC (Id. de sec. n.º 110)	C C G / C T C (Id. de sec. n.º 110) G G C / G A G (Id. de sec. n.º 111)
BsrDI	GCAATG (Id. de sec. n.º 112)	G C A A T G N N / (Id. de sec. n.º 113) C G T T A C / N N (Id. de sec. n.º 114)
BtgZI	GCGATG (Id. de sec. n.º 115)	G C G A T G N N N N N N N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 116) C G C T A C N N N N N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 117)
BtsI	GCAGTG (Id. de sec. n.º 118)	G C A G T G N N / (Id. de sec. n.º 119) C G T C A C / N N (Id. de sec. n.º 120)
EarI	CTCTTC (Id. de sec. n.º 121)	C T C T T C N / N N N (Id. de sec. n.º 122) G A G A A G N N N N / (Id. de sec. n.º 123)
Ecil	GGCGGA (Id. de sec. n.º 124)	G G C G G A N N N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 125) C C G C C T N N N N N N N N N N / N N (Id. de sec. n.º 126)
MmeI	TCCRAC (Id. de sec. n.º 127)	T C C R A C N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 128) A G G Y T G N N N N N N N N N N N N N N N N N N / N N (Id. de sec. n.º 129)
NmeAIII	GCCGAG (Id. de sec. n.º 130)	G C C G A G N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 131) C G G C T C N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N / N N (Id. de sec. n.º 132)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
BbvCI	CCTCAGC (Id. de sec. n.º 133)	C C / T C A G C (Id. de sec. n.º 133) G G A G T / C G (Id. de sec. n.º 134)
Bpu10I	CCTNAGC (Id. de sec. n.º 135)	C C / T N A G C (Id. de sec. n.º 135) G G A N T / C G (Id. de sec. n.º 136)
BspQI	GCTCTTC (Id. de sec. n.º 137)	G C T C T T C N / N N N (Id. de sec. n.º 138) C G A G A A G N N N N / (Id. de sec. n.º 139)
SapI	GCTCTTC (Id. de sec. n.º 140)	G C T C T T C N / N N N (Id. de sec. n.º 141) C G A G A A G N N N N / (Id. de sec. n.º 142)
BaeI	ACNNNNGTAYC (Id. de sec. n.º 143)	NN/NNNNNNNNNNNCAANNNNNGTGNNNNNNNNNNNN/ (Id. de sec. n.º 144) /NNNNNNNNNNNGTTNNNNNCACNNNNNNNNNNNN/NN (Id. de sec. n.º 145)
BsaXI	ACNNNNNCTCC (Id. de sec. n.º 146)	NNN/NNNNNNNNNNNACNNNNNCTCCNNNNNNNNNNNN/ (Id. de sec. n.º 147) /NNNNNNNNNNNNNTGNNNNNGAGNNNNNNNNNN/NNN (Id. de sec. n.º 148)
CspCI	CAANNNNNGTGG (Id. de sec. n.º 149)	NN/NNNNNNNNNNNCAANNNNNGTGNNNNNNNNNNNNNN/ (Id. de sec. n.º 150) /NNNNNNNNNNNNNGTTNNNNNCACNNNNNNNNNNNN/NN (Id. de sec. n.º 151)
AccII	CGCG (Id. de sec. n.º 152)	C G / C G (Id. de sec. n.º 152) G C / G C (Id. de sec. n.º 152)
AfaI	GTAC (Id. de sec. n.º 153)	G T / A C (Id. de sec. n.º 153) C A / T G (Id. de sec. n.º 153)
AluBI	AGCT (Id. de sec. n.º 154)	A G / C T (Id. de sec. n.º 154) T C / G A (Id. de sec. n.º 154)
AspLEI	GCGC (Id. de sec. n.º 155)	G C G / C (Id. de sec. n.º 155) C / G C G (Id. de sec. n.º 155)
BscFI	GATC (Id. de sec. n.º 156)	/ G A T C (Id. de sec. n.º 156) C T A G / (Id. de sec. n.º 156)
Bsh1236I	CGCG (Id. de sec. n.º 157)	C G / C G (Id. de sec. n.º 157) G C / G C (Id. de sec. n.º 157)
BshFI	GGCC (Id. de sec. n.º 158)	G G / C C (Id. de sec. n.º 158) C C / G G (Id. de sec. n.º 158)
BshI	GGCC (Id. de sec. n.º 159)	G G / C C (Id. de sec. n.º 159) C C / G G (Id. de sec. n.º 159)
BsiSI	CCGG (Id. de sec. n.º 160)	C / C G G (Id. de sec. n.º 160) G G C / C (Id. de sec. n.º 160)
Bsni	GGCC (Id. de sec. n.º 161)	G G / C C (Id. de sec. n.º 161) C C / G G (Id. de sec. n.º 161)
Bsp143I	GATC (Id. de sec. n.º 162)	/ G A T C (Id. de sec. n.º 162) C T A G / (Id. de sec. n.º 162)
BspACI	CCGC (Id. de sec. n.º 163)	C / C G C (Id. de sec. n.º 163) G G C / G (Id. de sec. n.º 163)
BspANI	GGCC (Id. de sec. n.º 164)	G G / C C (Id. de sec. n.º 164) C C / G G (Id. de sec. n.º 164)
BspFNI	CGCG (Id. de sec. n.º 165)	C G / C G (Id. de sec. n.º 165) G C / G C (Id. de sec. n.º 165)
BssMI	GATC (Id. de sec. n.º 166)	/ G A T C (Id. de sec. n.º 166) C T A G / (Id. de sec. n.º 166)
BstENII	GATC (Id. de sec. n.º 167)	/ G A T C (Id. de sec. n.º 167) C T A G / (Id. de sec. n.º 167)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
BstFNI	CGCG (Id. de sec. n.º 168)	C G / C G (Id. de sec. n.º 168) G C / G C (Id. de sec. n.º 168)
BstHII	GCGC (Id. de sec. n.º 169)	G C G / C (Id. de sec. n.º 169) C / G C G (Id. de sec. n.º 169)
BstKTI	GATC (Id. de sec. n.º 170)	G A T / C (Id. de sec. n.º 170) C / T A G (Id. de sec. n.º 170)
BstMBI	GATC (Id. de sec. n.º 171)	/G A T C (Id. de sec. n.º 171) C T A G/ (Id. de sec. n.º 171)
BsuRI	GGCC (Id. de sec. n.º 172)	G G / C C (Id. de sec. n.º 172) C C / G G (Id. de sec. n.º 172)
CfoI	GCGC (Id. de sec. n.º 173)	G C G / C (Id. de sec. n.º 173) C / G C G (Id. de sec. n.º 173)
Csp6I	GTAC (Id. de sec. n.º 174)	G / T A C (Id. de sec. n.º 174) C A T / G (Id. de sec. n.º 174)
FaeI	CATG (Id. de sec. n.º 175)	C A T G / (Id. de sec. n.º 175) / G T A C (Id. de sec. n.º 175)
Fail	YATR (Id. de sec. n.º 176)	Y A / T R (Id. de sec. n.º 176) R T / A Y (Id. de sec. n.º 176)
FnuDII	CGCG (Id. de sec. n.º 177)	C G / C G (Id. de sec. n.º 177) G C / G C (Id. de sec. n.º 177)
FspBI	CTAG (Id. de sec. n.º 178)	C / T A G (Id. de sec. n.º 178) G A T / C (Id. de sec. n.º 178)
GlaI	GCGC (Id. de sec. n.º 179)	G C / G C (Id. de sec. n.º 179) C G / C G (Id. de sec. n.º 179)
HapII	CCGG (Id. de sec. n.º 180)	C / C G G (Id. de sec. n.º 180) G G C / C (Id. de sec. n.º 180)
Hin1II	CATG (Id. de sec. n.º 181)	C A T G / (Id. de sec. n.º 181) / G T A C (Id. de sec. n.º 181)
R9529	GCGC (Id. de sec. n.º 182)	G / C G C (Id. de sec. n.º 182) C G C / G (Id. de sec. n.º 182)
Hsp92II	CATG (Id. de sec. n.º 183)	C A T G / (Id. de sec. n.º 183) / G T A C (Id. de sec. n.º 183)
HspAI	GCGC (Id. de sec. n.º 184)	G / C G C (Id. de sec. n.º 184) C G C / G (Id. de sec. n.º 184)
MaeI	CTAG (Id. de sec. n.º 185)	C / T A G (Id. de sec. n.º 185) G A T / C (Id. de sec. n.º 185)
Maell	ACGT (Id. de sec. n.º 186)	A / C G T (Id. de sec. n.º 186) T G C / A (Id. de sec. n.º 186)
MvnI	CGCG (Id. de sec. n.º 187)	C G / C G (Id. de sec. n.º 187) G C / G C (Id. de sec. n.º 187)
Pall	GGCC (Id. de sec. n.º 188)	G G / C C (Id. de sec. n.º 188) C C / G G (Id. de sec. n.º 188)
RsaNI	GTAC (Id. de sec. n.º 189)	G / T A C (Id. de sec. n.º 189) C A T / G (Id. de sec. n.º 189)
SetI	ASST (Id. de sec. n.º 190)	A S S T / (Id. de sec. n.º 190) / T S S A (Id. de sec. n.º 190)
SgeI	CNNG (Id. de sec. n.º 191)	C N N G N N N N N N N N N / N N N N (Id. de sec. n.º 192) G N N C N N N N N N N N N N N N I (Id. de sec. n.º 193)
Sse9I		/A A T T (Id. de sec. n.º 194)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
	AATT (Id. de sec. n.º 194)	T T A A / (Id. de sec. n.º 194)
Thai	CGCG (Id. de sec. n.º 195)	C G / C G (Id. de sec. n.º 195) G C / G C (Id. de sec. n.º 195)
Tru1I	TTAA (Id. de sec. n.º 196)	T / T A A (Id. de sec. n.º 196) A A T / T (Id. de sec. n.º 196)
Tru9I	TTAA (Id. de sec. n.º 197)	T / T A A (Id. de sec. n.º 197) A A T / T (Id. de sec. n.º 197)
Tscl	ACGT (Id. de sec. n.º 198)	A C G T / (Id. de sec. n.º 198) / T G C A (Id. de sec. n.º 198)
TspEI	AATT (Id. de sec. n.º 199)	/ A A T T (Id. de sec. n.º 199) T T A A / (Id. de sec. n.º 199)
TthHB8I	TCGA (Id. de sec. n.º 200)	T / C G A (Id. de sec. n.º 200) A G C / T (Id. de sec. n.º 200)
Xspl	CTAG (Id. de sec. n.º 201)	C / T A G (Id. de sec. n.º 201) G A T / C (Id. de sec. n.º 201)
AflI	GGWCC (Id. de sec. n.º 202)	G / G W C C (Id. de sec. n.º 202) C C W G / G (Id. de sec. n.º 202)
Agsl	TTTAA (Id. de sec. n.º 203)	T T S / A A (Id. de sec. n.º 203) A / A S T T (Id. de sec. n.º 203)
AspS9I	GGNCC (Id. de sec. n.º 204)	G / G N C C (Id. de sec. n.º 204) C C N G / G (Id. de sec. n.º 204)
AsuC2I	CCSGG (Id. de sec. n.º 205)	C C / S G G (Id. de sec. n.º 205) G G S / C C (Id. de sec. n.º 205)
Asul	GGNCC (Id. de sec. n.º 206)	G / G N C C (Id. de sec. n.º 206) C C N G / G (Id. de sec. n.º 206)
Bcefl	ACGGC (Id. de sec. n.º 207)	A C G G C N N N N N N N N N N N N / N (Id. de sec. n.º 208) T G C C G N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 209)
Bcni	CCSGG (Id. de sec. n.º 230)	C C / S G G (Id. de sec. n.º 230) G G S / C C (Id. de sec. n.º 230)
BisI	GCNGC (Id. de sec. n.º 231)	G C / N G C (Id. de sec. n.º 231) C G N / C G (Id. de sec. n.º 231)
BlsI	GCNGC (Id. de sec. n.º 232)	G C N / G C (Id. de sec. n.º 232) C G / N C G (Id. de sec. n.º 232)
Bme1390I	CCNGG (Id. de sec. n.º 233)	C C / N G G (Id. de sec. n.º 233) G G N / C C (Id. de sec. n.º 233)
Bme18I	GGWCC (Id. de sec. n.º 234)	G / G W C C (Id. de sec. n.º 234) C C W G / G (Id. de sec. n.º 234)
BmrFI	CCNGG (Id. de sec. n.º 235)	C C / N G G (Id. de sec. n.º 235) G G N / C C (Id. de sec. n.º 235)
BscGI	CCCGT (Id. de sec. n.º 236)	C C C G T N (Id. de sec. n.º 237) G G G C A / N (Id. de sec. n.º 238)
BseBI	CCWGG (Id. de sec. n.º 239)	C C / W G G (Id. de sec. n.º 239) G G W / C C (Id. de sec. n.º 239)
BsiLI	CCWGG (Id. de sec. n.º 240)	C C / W G G (Id. de sec. n.º 240) G G W / C C (Id. de sec. n.º 240)
BsiZI	GGNCC (Id. de sec. n.º 241)	G / G N C C (Id. de sec. n.º 241) C C N G / G (Id. de sec. n.º 241)
BsIFI	GGGAC (Id. de sec. n.º 242)	G G G A C N N N N N N N N N N N N / N N N N (Id. de sec. n.º 243) C C C T G N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 244)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
BsoMAI	GTCTC (Id. de sec. n.º 245)	G T C T C N / N N N N (Id. de sec. n.º 246) C A G A G N N N N N / (Id. de sec. n.º 247)
BspNCI	CCAGA (Id. de sec. n.º 248)	C C A G A N (Id. de sec. n.º 249) G G T C T / N (Id. de sec. n.º 250)
Bst2UI	CCWGG (Id. de sec. n.º 251)	C C / W G G (Id. de sec. n.º 251) G G W / C C (Id. de sec. n.º 251)
Bst71I	GCAGC (Id. de sec. n.º 252)	G C A G C N N N N N N N N / N N N N (Id. de sec. n.º 253) C G T C G N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 254)
BstDEI	CTNAG (Id. de sec. n.º 255)	C / T N A G (Id. de sec. n.º 255) G A N T / C (Id. de sec. n.º 255)
BstOI	CCWGG (Id. de sec. n.º 356)	C C / W G G (Id. de sec. n.º 356) G G W / C C (Id. de sec. n.º 356)
BstSCI	CCNGG (Id. de sec. n.º 257)	/ C C N G G (Id. de sec. n.º 257) G G N C C / (Id. de sec. n.º 257)
Caull	CCSGG (Id. de sec. n.º 258)	C C / S G G (Id. de sec. n.º 258) G G S / C C (Id. de sec. n.º 258)
CdiI	CATCG (Id. de sec. n.º 259)	C A T C / G (Id. de sec. n.º 259) G T A G / C (Id. de sec. n.º 260)
Cfr13I	GGNCC (Id. de sec. n.º 261)	G / G N C C (Id. de sec. n.º 261) C C N G / G (Id. de sec. n.º 261)
Eco47I	GGWCC (Id. de sec. n.º 262)	G / G W C C (Id. de sec. n.º 262) C C W G / G (Id. de sec. n.º 262)
EcoRII	CCWGG (Id. de sec. n.º 263)	/ C C W G G (Id. de sec. n.º 263) G G W C C / (Id. de sec. n.º 263)
FaqI	GGGAC (Id. de sec. n.º 264)	G G G A C N N N N N N N N N N / N N N N (Id. de sec. n.º 265) C C C T G N N N N N N N N N N N N N I (Id. de sec. n.º 266)
FinI	GGGAC (Id. de sec. n.º 267)	G G G A C N (Id. de sec. n.º 268) C C C T G / N (Id. de sec. n.º 269)
Fsp4HI	GCNGC (Id. de sec. n.º 270)	G C / N G C (Id. de sec. n.º 270)
	n.º 270)	C G N / C G (Id. de sec. n.º 270)
Glul	GCNGC (Id. de sec. n.º 271)	G C / N G C (Id. de sec. n.º 271) C G N / C G (Id. de sec. n.º 271)
Hin4II	CCTTC (Id. de sec. n.º 272)	C C T T C N N N N N N / (Id. de sec. n.º 273) G G A A G N N N N N / N (Id. de sec. n.º 274)
HpyF3I	CTNAG (Id. de sec. n.º 275)	C / T N A G (Id. de sec. n.º 275) G A N T / C (Id. de sec. n.º 275)
Ital	GCNGC (Id. de sec. n.º 276)	G C / N G C (Id. de sec. n.º 276) C G N / C G (Id. de sec. n.º 276)
MaeIII	GTNAC (Id. de sec. n.º 277)	/ G T N A C (Id. de sec. n.º 277) C A N T G / (Id. de sec. n.º 277)
MspR9I	CCNGG (Id. de sec. n.º 278)	C C / N G G (Id. de sec. n.º 278) G G N / C C (Id. de sec. n.º 278)
MvaI	CCWGG (Id. de sec. n.º 279)	C C / W G G (Id. de sec. n.º 279) G G W / C C (Id. de sec. n.º 279)
NmuCI	GTSAC (Id. de sec. n.º 280)	/ G T S A C (Id. de sec. n.º 280) C A S T G / (Id. de sec. n.º 280)
Psp6I	CCWGG (Id. de sec. n.º 281)	/ C C W G G (Id. de sec. n.º 281)
	n.º 281)	G G W C C / (Id. de sec. n.º 281)
PspPI	GGNCC (Id. de sec. n.º 282)	G / G N C C (Id. de sec. n.º 282) C C N G / G (Id. de sec. n.º 282)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
SatI	GCNGC (Id. de sec. n.º 283)	G C / N G C (Id. de sec. n.º 283) C G N / C G (Id. de sec. n.º 283)
SinI	GGWCC (Id. de sec. n.º 284)	G / G W C C (Id. de sec. n.º 284) C C W G / G (Id. de sec. n.º 284)
TscAI	CASTG (Id. de sec. n.º 285)	N N C A S T G N N / (Id. de sec. n.º 286) / N N G T S A C N N (Id. de sec. n.º 286)
VpaK11 BI	GGWCC (Id. de sec. n.º 287)	G / G W C C (Id. de sec. n.º 287) C C W G / G (Id. de sec. n.º 287)
AanI	TTATAA (Id. de sec. n.º 288)	T T A / T A A (Id. de sec. n.º 288) A A T / A T T (Id. de sec. n.º 288)
AatI	AGGCCT (Id. de sec. n.º 289)	A G G / C C T (Id. de sec. n.º 289) T C C / G G A (Id. de sec. n.º 289)
AauI	TGTACA (Id. de sec. n.º 290)	T / G T A C A (Id. de sec. n.º 290) A C A T G / T (Id. de sec. n.º 290)
Acc113I	AGTACT (Id. de sec. n.º 291)	A G T / A C T (Id. de sec. n.º 291) T C A / T G A (Id. de sec. n.º 291)
Acc16I	TGCGCA (Id. de sec. n.º 292)	T G C / G C A (Id. de sec. n.º 292) A C G / C G T (Id. de sec. n.º 292)
AccB1I	GGYRCC (Id. de sec. n.º 293)	G / G Y R C C (Id. de sec. n.º 293) C C R Y G / G (Id. de sec. n.º 293)
AceIII	CAGCTC (Id. de sec. n.º 294)	C A G C T C N N N N N N N / N N N N (Id. de sec. n.º 295) G T C G A G N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 296)
Acsl	RAATTY (Id. de sec. n.º 297)	R / A A T T Y (Id. de sec. n.º 298) Y T T A A / R (Id. de sec. n.º 298)
Acvi	CACGTG (Id. de sec. n.º 299)	C A C / G T G (Id. de sec. n.º 299) G T G / C A C (Id. de sec. n.º 299)
Acyl	GRCGYC (Id. de sec. n.º 300)	G R / C G Y C (Id. de sec. n.º 300) C Y G C / R G (Id. de sec. n.º 300)
AhlI	ACTAGT (Id. de sec. n.º 301)	A / C T A G T (Id. de sec. n.º 301) T G A T C / A (Id. de sec. n.º 301)
Alw21I	GWGCWC (Id. de sec. n.º 302)	G W G C W / C (Id. de sec. n.º 302) C / W C G W G (Id. de sec. n.º 302)
Alw44I	GTGCAC (Id. de sec. n.º 303)	G / T G C A C (Id. de sec. n.º 303) C A C G T / G (Id. de sec. n.º 303)
Ama87I	CYCGRG (Id. de sec. n.º 304)	C / Y C G R G (Id. de sec. n.º 304) G R G C Y / C (Id. de sec. n.º 304)
Aor51HI	AGCGCT (Id. de sec. n.º 305)	A G C / G C T (Id. de sec. n.º 305) T C G / C G A (Id. de sec. n.º 305)
AsiAI	ACCGGT (Id. de sec. n.º 306)	A / C C G G T (Id. de sec. n.º 306) T G G C C / A (Id. de sec. n.º 306)
AsnI	ATTAAT (Id. de sec. n.º 307)	A T / T A A T (Id. de sec. n.º 307) T A A T / T A (Id. de sec. n.º 307)
Asp718I	GGTACC (Id. de sec. n.º 308)	G / G T A C C (Id. de sec. n.º 308) C C A T G / G (Id. de sec. n.º 308)
AspHI	GWGCWC (Id. de sec. n.º 309)	G W G C W / C (Id. de sec. n.º 309) C / W C G W G (Id. de sec. n.º 309)
AsuII	TTCGAA (Id. de sec. n.º 310)	T T / C G A A (Id. de sec. n.º 310) A A G C / T T (Id. de sec. n.º 310)
AsuNHI	GCTAGC (Id. de sec. n.º 311)	G / C T A G C (Id. de sec. n.º 311) C G A T C / G (Id. de sec. n.º 311)
AvallI	ATGCAT (Id. de sec. n.º 312)	A T G C A T (Id. de sec. n.º 312)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
	n.º 312)	T A C G T A (Id. de sec. n.º 312)
Avill	TGCGCA (Id. de sec. n.º 313)	T G C / G C A (Id. de sec. n.º 313) A C G / C G T (Id. de sec. n.º 313)
Ball	TGGCCA (Id. de sec. n.º 314)	T G G / C C A (Id. de sec. n.º 314) A C C / G G T (Id. de sec. n.º 314)
BanIII	ATCGAT (Id. de sec. n.º 315)	A T / C G A T (Id. de sec. n.º 315) T A G C / T A (Id. de sec. n.º 315)
Baul	CACGAG (Id. de sec. n.º 316)	C / A C G A G (Id. de sec. n.º 317) G T G C T / C (Id. de sec. n.º 318)
Bbel	GGCGCC (Id. de sec. n.º 319)	G G C G C / C (Id. de sec. n.º 320) C / C G C G G (Id. de sec. n.º 320)
BbrPI	CACGTG (Id. de sec. n.º 321)	C A C / G T G (Id. de sec. n.º 321) G T G / C A C (Id. de sec. n.º 321)
Bbul	GCATGC (Id. de sec. n.º 322)	G C A T G / C (Id. de sec. n.º 322) C / G T A C G (Id. de sec. n.º 322)
Bbv12I	GWGCWC (Id. de sec. n.º 323)	G W G C W / C (Id. de sec. n.º 323) C / W C G W G (Id. de sec. n.º 323)
BbvII	GAAGAC (Id. de sec. n.º 324)	G A A G A C N N / N N N N (Id. de sec. n.º 325)
	n.º 324)	C T T C T G N N N N N N / (Id. de sec. n.º 326)
Bce83I	CTTGAG (Id. de sec. n.º 327)	C T T G A G N N N N N N N N N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 328) G A A C T C N N N N N N N N N N N N N N N N / N (Id. de sec. n.º 329)
Bcol	CYCGRG (Id. de sec. n.º 330)	C / Y C G R G (Id. de sec. n.º 330) G R G C Y / C (Id. de sec. n.º 330)
Bcul	ACTAGT (Id. de sec. n.º 331)	A / C T A G T (Id. de sec. n.º 331) T G A T C / A (Id. de sec. n.º 331)
Bfml	CTRYAG (Id. de sec. n.º 332)	C / T R Y A G (Id. de sec. n.º 332) G A Y R T / C (Id. de sec. n.º 332)
BfrBI	ATGCAT (Id. de sec. n.º 333)	A T G C A / T (Id. de sec. n.º 333) T / A C G T A (Id. de sec. n.º 333)
BfrI	CTTAAG (Id. de sec. n.º 334)	C / T T A A G (Id. de sec. n.º 334) G A A T T / C (Id. de sec. n.º 334)
BlnI	CCTAGG (Id. de sec. n.º 335)	C / C T A G G (Id. de sec. n.º 335) G G A T C / C (Id. de sec. n.º 335)
BmcAI	AGTACT (Id. de sec. n.º 336)	A G T / A C T (Id. de sec. n.º 336) T C A / T G A (Id. de sec. n.º 336)
BmeT111	CYCGRG (Id. de sec. n.º 337)	C / Y C G R G (Id. de sec. n.º 337)
	n.º 337)	G R G C Y / C (Id. de sec. n.º 337)
Bmil	GGNNCC (Id. de sec. n.º 338)	G G N / N C C (Id. de sec. n.º 338) C C N / N G G (Id. de sec. n.º 338)
Bmul	ACTGGG (Id. de sec. n.º 339)	A C T G G G N N N N N N / (Id. de sec. n.º 339) T G A C C C N N N N / N (Id. de sec. n.º 339)
BmyI	GDGCHC (Id. de sec. n.º 340)	G D G C H / C (Id. de sec. n.º 340) C / H C G D G (Id. de sec. No 340)
Bpu14I	TTCGAA (Id. de sec. n.º 341)	T T / C G A A (Id. de sec. n.º 341) A A G C / T T (Id. de sec. n.º 341)
BpvUI	CGATCG (Id. de sec. n.º 342)	C G A T / C G (Id. de sec. n.º 342) G C / T A G C (Id. de sec. n.º 342)
Bsa29I	ATCGAT (Id. de sec. n.º 343)	A T / C G A T (Id. de sec. n.º 343) T A G C / T A (Id. de sec. n.º 343)
BsaOI		C G R Y / C G (Id. de sec. n.º 344)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
	CGRYCG (Id. de sec. n.º 344)	GC / Y R G C (Id. de sec. n.º 344)
Bsbl	CAACAC (Id. de sec. n.º 345)	CAACACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN / (Id. de sec. n.º 346) GTTGTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN / NN (Id. de sec. n.º 347))
BscBI	GGNNCC (Id. de sec. n.º 348)	GGN / NC C (Id. de sec. n.º 348)
	n.º 348)	CCN / NG G (Id. de sec. n.º 348)
BscCI	GAATGC (Id. de sec. n.º 349)	GAATGCN / (Id. de sec. n.º 350) CTTAC / GN (Id. de sec. n.º 351)
Bse118I	RCCGGY (Id. de sec. n.º 352)	R / C C G G Y (Id. de sec. n.º 352) Y G G C C / R (Id. de sec. n.º 352)
BseAI	TCCGGA (Id. de sec. n.º 353)	T / C C G G A (Id. de sec. n.º 353) A G G C C / T (Id. de sec. n.º 353)
BseCI	ATCGAT (Id. de sec. n.º 354)	AT / C G A T (Id. de sec. n.º 354) T A G C / T A (Id. de sec. n.º 354)
BseDI	CCNNGG (Id. de sec. n.º 355)	C / C N N G G (Id. de sec. n.º 355) G G N N C / C (Id. de sec. n.º 355)
BsePI	GCGCGC (Id. de sec. n.º 356)	G / C G C G C (Id. de sec. n.º 356) C G C G C / G (Id. de sec. n.º 356)
BseSI	GKGCMC (Id. de sec. n.º 357)	G K G C M / C (Id. de sec. n.º 357) C / M C G K G (Id. de sec. n.º 357)
BseX3I	CGGCCG (Id. de sec. n.º 358)	C / G G C C G (Id. de sec. n.º 358) G C C G G / C (Id. de sec. n.º 358)
Bsh1285I	CGRYCG (Id. de sec. n.º 359)	C G R Y / C G (Id. de sec. n.º 359)
	n.º 359)	GC / Y R G C (Id. de sec. n.º 359)
BshNI	GGYRCC (Id. de sec. n.º 360)	G / G Y R C C (Id. de sec. n.º 360) C C R Y G / G (Id. de sec. n.º 360)
BshTI	ACCGGT (Id. de sec. n.º 361)	A / C C G G T (Id. de sec. n.º 361) T G G C C / A (Id. de sec. n.º 361)
BshVI	ATCGAT (Id. de sec. n.º 362)	AT / C G A T (Id. de sec. n.º 362) T A G C / T A (Id. de sec. n.º 362)
BsiCI	TTCGAA (Id. de sec. n.º 363)	TT / C G A A (Id. de sec. n.º 363) A A G C / T T (Id. de sec. n.º 363)
BsiHKCI	CYCGRG (Id. de sec. n.º 364)	C / Y C G R G (Id. de sec. n.º 364) G R G C Y / C (Id. de sec. n.º 364)
BsiMI	TCCGGA (Id. de sec. n.º 365)	T / C C G G A (Id. de sec. n.º 365) A G G C C / T (Id. de sec. n.º 365)
BsiQI	TGATCA (Id. de sec. n.º 366)	T / G A T C A (Id. de sec. n.º 366) A C T A G / T (Id. de sec. n.º 366)
BsiXI	ATCGAT (Id. de sec. n.º 367)	AT / C G A T (Id. de sec. n.º 367) T A G C / T A (Id. de sec. n.º 367)
Bsp106I	ATCGAT (Id. de sec. n.º 368)	AT / C G A T (Id. de sec. n.º 368)
	n.º 368)	T A G C / T A (Id. de sec. n.º 368)
Bsp119I	TTCGAA (Id. de sec. n.º 369)	TT / C G A A (Id. de sec. n.º 369) A A G C / T T (Id. de sec. n.º 369)
Bsp120I	GGGCCC (Id. de sec. n.º 370)	G / G G C C C (Id. de sec. n.º 370) C C C G G / G (Id. de sec. n.º 370)
Bsp13I	TCCGGA (Id. de sec. n.º 371)	T / C C G G A (Id. de sec. n.º 371) A G G C C / T (Id. de sec. n.º 371)
Bsp1407I		T / G T A C A Id. de sec. n.º 372)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
	TGTACA (Id. de sec. n.º 372)	A C A T G / T (Id. de sec. n.º 372)
Bsp143I	RGCGCY (Id. de sec. n.º 373)	R G C G C / Y (Id. de sec. n.º 373) Y / C G C G R (Id. de sec. n.º 373)
Bsp19I	CCATGG (Id. de sec. n.º 374)	C / C A T G G (Id. de sec. n.º 374) G G T A C / C (Id. de sec. n.º 374)
Bsp68I	TCGCGA (Id. de sec. n.º 375)	T C G / C G A (Id. de sec. n.º 375) A G C / G C T (Id. de sec. n.º 375)
BspA2I	CCTAGG (Id. de sec. n.º 376)	C / C T A G G (Id. de sec. n.º 376) G G A T C / C (Id. de sec. n.º 376)
BspCI	CGATCG (Id. de sec. n.º 377)	C G A T / C G (Id. de sec. n.º 377)
	n.º 377)	G C / T A G C (Id. de sec. n.º 377)
BspGI	CTGGAC (Id. de sec. n.º 378)	C T G G A C N (Id. de sec. n.º 379) G A C C T G / N (Id. de sec. n.º 380)
BspLU11I	ACATGT (Id. de sec. n.º 381)	A / C A T G T (Id. de sec. n.º 381) T G T A C / A (Id. de sec. n.º 381)
BspMAI	CTGCAG (Id. de sec. n.º 382)	C T G C A / G (Id. de sec. n.º 382) G / A C G T C (Id. de sec. n.º 382)
BspMII	TCCGGA (Id. de sec. n.º 383)	T / C C G G A (Id. de sec. n.º 383) A G G C C / T (Id. de sec. n.º 383)
BspOI	GCTAGC (Id. de sec. n.º 384)	G C T A G / C (Id. de sec. n.º 384) C / G A T C G (Id. de sec. n.º 384)
BspT104I	TTCGAA (Id. de sec. n.º 385)	T T / C G A A (Id. de sec. n.º 385) A A G C / T T (Id. de sec. n.º 385)
BspT107I	GGYRCC (Id. de sec. n.º 386)	G / G Y R C C (Id. de sec. n.º 386) C C R Y G / G (Id. de sec. n.º 386)
BspTI	CTTAAG (Id. de sec. n.º 387)	C / T T A A G (Id. de sec. n.º 387) G A A T T / C (Id. de sec. n.º 387)
BspXI	ATCGAT (Id. de sec. n.º 388)	A T / C G A T (Id. de sec. n.º 388)
	n.º 388)	T A G C / T A (Id. de sec. n.º 388)
BssAI	RCCGGY (Id. de sec. n.º 389)	R / C C G G Y (Id. de sec. n.º 389) Y G G C C / R (Id. de sec. n.º 389)
BssHI	CTCGAG (Id. de sec. n.º 390)	C / T C G A G (Id. de sec. n.º 390) G A G C T / C (Id. de sec. n.º 390)
BssNAI	GTATAC (Id. de sec. n.º 391)	G T A / T A C (Id. de sec. n.º 391) C A T / A T G (Id. de sec. n.º 391)
BssNI	GRCGYC (Id. de sec. n.º 392)	G R / C G Y C (Id. de sec. n.º 392) C Y G C / R G (Id. de sec. n.º 392)
BssT1I	CCWWGG (Id. de sec. n.º 393)	C / C W W G G (Id. de sec. n.º 393) G G W W C / C (Id. de sec. n.º 393)
Bst1107I	GTATAC (Id. de sec. n.º 394)	G T A / T A C (Id. de sec. n.º 394) C A T / A T G (Id. de sec. n.º 394)
Bst98I	CTTAAG (Id. de sec. n.º 395)	C / T T A A G (Id. de sec. n.º 395) G A A T T / C (Id. de sec. n.º 395)
BstACI	GRCGYC (Id. de sec. n.º 396)	G R / C G Y C (Id. de sec. n.º 396) C Y G C / R G (Id. de sec. n.º 396)
BstAFI	CTTAAG (Id. de sec. n.º 397)	C / T T A A G (Id. de sec. n.º 397)
	n.º 397)	G A A T T / C (Id. de sec. n.º 397)
BstAUI	TGTACA (Id. de sec. n.º 398)	T / G T A C A (Id. de sec. n.º 398) A C A T G / T (Id. de sec. n.º 398)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
BstBAI	YACGTR (Id. de sec. n.º 399)	Y A C / G T R (Id. de sec. n.º 399) R T G / C A Y (Id. de sec. n.º 399)
BstC8I	GCNNGC (Id. de sec. n.º 400)	G C N / N G C (Id. de sec. n.º 400) C G N / N C G (Id. de sec. n.º 400)
BstDSI	CCRYGG (Id. de sec. n.º 401)	C / C R Y G G (Id. de sec. n.º 401) G G Y R C / C (Id. de sec. n.º 401)
BstH2I	RGCGCY (Id. de sec. n.º 402)	R G C G C / Y (Id. de sec. n.º 402) Y / C G C G R (Id. de sec. n.º 402)
BstHPI	GTTAAC (Id. de sec. n.º 403)	G T T / A A C (Id. de sec. n.º 403) C A A / T T G (Id. de sec. n.º 403)
BstNSI	RCATGY (Id. de sec. n.º 404)	R C A T G / Y (Id. de sec. n.º 404) Y / G T A C R (Id. de sec. n.º 404)
BstSFI	CTRYAG (Id. de sec. n.º 405)	C / T R Y A G (Id. de sec. n.º 405) G A Y R T / C (Id. de sec. n.º 405)
BstSLI	GKGCMC (Id. de sec. n.º 406)	G K G C M / C (Id. de sec. n.º 406)
	n.º 406)	C / M C G K G (Id. de sec. n.º 406)
BstSNI	TACGTA (Id. de sec. n.º 407)	T A C / G T A (Id. de sec. n.º 407) A T G / C A T (Id. de sec. n.º 407)
BstX2I	RGATCY (Id. de sec. n.º 408)	R / G A T C Y (Id. de sec. n.º 408) Y C T A G / R (Id. de sec. n.º 408)
BstZI	CGGCCG (Id. de sec. n.º 409)	C / G G C C G (Id. de sec. n.º 409) G C C G G / C (Id. de sec. n.º 409)
BsuTUI	ATCGAT (Id. de sec. n.º 410)	A T / C G A T (Id. de sec. n.º 410) T A G C / T A (Id. de sec. n.º 410)
BtuMI	TCGCGA (Id. de sec. n.º 411)	T C G / C G A (Id. de sec. n.º 411) A G C / G C T (Id. de sec. n.º 411)
Bvel	ACCTGC (Id. de sec. n.º 412)	A C C T G C N N N N / N N N N (Id. de sec. n.º 413) T G G A C G N N N N N N N N / (Id. de sec. n.º 414)
Ceil	TCATGA (Id. de sec. n.º 415)	T / C A T G A (Id. de sec. n.º 415) A G T A C / T (Id. de sec. n.º 415)
Cfr10I	RCCGGY (Id. de sec. n.º 416)	R / C C G G Y (Id. de sec. n.º 416) Y G G C C / R (Id. de sec. n.º 416)
Cfr42I	CCGCGG (Id. de sec. n.º 417)	C C G C / G G (Id. de sec. n.º 417)
	n.º 417)	G G / C G C C (Id. de sec. n.º 417)
Cfr9I	CCCGGG (Id. de sec. n.º 418)	C / C C G G G (Id. de sec. n.º 418) G G G C C / C (Id. de sec. n.º 418)
CfrI	YGGCCR (Id. de sec. n.º 419)	Y / G G C C R (Id. de sec. n.º 419) R C C G G / Y (Id. de sec. n.º 419)
Csp45I	TTCGAA (Id. de sec. n.º 420)	T T / C G A A (Id. de sec. n.º 420) A A G C / T T (Id. de sec. n.º 420)
CspAI	ACCGGT (Id. de sec. n.º 421)	A / C C G G T (Id. de sec. n.º 421) T G G C C / A (Id. de sec. n.º 421)
DinI	GGCGCC (Id. de sec. n.º 422)	G G C / G C C (Id. de sec. n.º 422) C C G / C G G (Id. de sec. n.º 422)
DrdII	GAACCA (Id. de sec. n.º 423)	G A A C C A N (Id. de sec. n.º 424) C T T G G T / N (Id. de sec. n.º 425)
DsaI	CCRYGG (Id. de sec. n.º 426)	C / C R Y G G (Id. de sec. n.º 426) G G Y R C / C (Id. de sec. n.º 426)
Ecl136II	GAGCTC (Id. de sec. n.º 427)	G A G / C T C (Id. de sec. n.º 427) C T C / G A G (Id. de sec. n.º 427)
EclXI	CGGCCG (Id. de sec. n.º 428)	C / G G C C G (Id. de sec. n.º 428)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
	n.º 428)	G C C G G / C (Id. de sec. n.º 428)
Eco105I	TACGTA (Id. de sec. n.º 429)	T A C / G T A (Id. de sec. n.º 429) A T G / C A T (Id. de sec. n.º 429)
Eco130I	CCWWGG (Id. de sec. n.º 430)	C / C W W G G (Id. de sec. n.º 430) G G W W C / C (Id. de sec. n.º 430)
Eco147I	AGGCCT (Id. de sec. n.º 431)	A G G / C C T (Id. de sec. n.º 431) T C C / G G A (Id. de sec. n.º 431)
Eco24I	GRGCRYC (Id. de sec. n.º 432)	G R G C Y / C (Id. de sec. n.º 432) C / Y C G R G (Id. de sec. n.º 432)
Eco32I	GATATC (Id. de sec. n.º 433)	G A T / A T C (Id. de sec. n.º 433) C T A / T A G (Id. de sec. n.º 433)
Eco47III	AGCGCT (Id. de sec. n.º 434)	A G C / G C T (Id. de sec. n.º 434) T C G / C G A (Id. de sec. n.º 434)
Eco52I	CGGCCG (Id. de sec. n.º 435)	C / G G C C G (Id. de sec. n.º 435) G C C G G / C (Id. de sec. n.º 435)
Eco72I	CACGTG (Id. de sec. n.º 436)	C A C / G T G (Id. de sec. n.º 436) G T G / C A C (Id. de sec. n.º 436)
Eco88I	CYCGRG (Id. de sec. n.º 437)	C / Y C G R G (Id. de sec. n.º 437)
	437)	G R G C Y / C (Id. de sec. n.º 437)
EcoICRI	GAGCTC (Id. de sec. n.º 438)	G A G / C T C (Id. de sec. n.º 438) C T C / G A G (Id. de sec. n.º 438)
EcoT14I	CCWWGG (Id. de sec. n.º 439)	C / C W W G G (Id. de sec. n.º 439) G G W W C / C (Id. de sec. n.º 439)
EcoT22I	ATGCAT (Id. de sec. n.º 440)	A T G C A / T (Id. de sec. n.º 440) T / A C G T A (Id. de sec. n.º 440)
EcoT38I	GRGCRYC (Id. de sec. n.º 441)	G R G C Y / C (Id. de sec. n.º 441) C / Y C G R G (Id. de sec. n.º 441)
Egel	GGCGCC (Id. de sec. n.º 442)	G G C / G C C (Id. de sec. n.º 442) C C G / C G G (Id. de sec. n.º 442)
Ehel	GGCGCC (Id. de sec. n.º 443)	G G C / G C C (Id. de sec. n.º 443) C C G / C G G (Id. de sec. n.º 443)
ErhI	CCWWGG (Id. de sec. n.º 444)	C / C W W G G (Id. de sec. n.º 444) G G W W C / C (Id. de sec. n.º 444)
FauNDI	CATATG (Id. de sec. n.º 445)	C A / T A T G (Id. de sec. n.º 445) G T A T / A C (Id. de sec. n.º 445)
FbaI	TGATCA (Id. de sec. n.º 446)	T / G A T C A (Id. de sec. n.º 446)
	446)	A C T A G / T (Id. de sec. n.º 446)
FbII	GTMKAC (Id. de sec. n.º 447)	G T / M K A C (Id. de sec. n.º 447) C A K M / T G (Id. de sec. n.º 447)
FriOI	GRGCRYC (Id. de sec. n.º 448)	G R G C Y / C (Id. de sec. n.º 448) C / Y C G R G (Id. de sec. n.º 448)
FunI	AGCGCT (Id. de sec. n.º 449)	A G C / G C T (Id. de sec. n.º 449) T C G / C G A (Id. de sec. n.º 449)
FunII	GAATTC (Id. de sec. n.º 450)	G / A A T T C (Id. de sec. n.º 450) C T T A A / G (Id. de sec. n.º 450)
GdIII	CGGCCR (Id. de sec. n.º 451)	C / G G C C R (Id. de sec. n.º 451) G C C G G / Y (Id. de sec. n.º 452)
GsaI	CCCAGC (Id. de sec. n.º 453)	C C C A G / C (Id. de sec. n.º 453) G / G G T C G (Id. de sec. n.º 454)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
HaeI	WGGCCW (Id. de sec. n.º 455)	W G G / C C W (Id. de sec. n.º 455) W C C / G G W (Id. de sec. n.º 455)
HgiAI	GWGCWC (Id. de sec. n.º 456)	G W G C W / C (Id. de sec. n.º 456) C / W C G W G (Id. de sec. n.º 456)
HinI	GRCGYC (Id. de sec. n.º 457)	G R / C G Y C (Id. de sec. n.º 457) C Y G C / R G (Id. de sec. n.º 457)
HindII	GTyrAC (Id. de sec. n.º 458)	G T Y / R A C (Id. de sec. n.º 458) C A R / Y T G (Id. de sec. n.º 458)
Hpy178III	TCNNGA (Id. de sec. n.º 459)	T C / N N G A (Id. de sec. n.º 459) A G N N / C T (Id. de sec. n.º 459)
Hpy8I	GTNNAC (Id. de sec. n.º 460)	G T N / N A C (Id. de sec. n.º 460) C A N / N T G (Id. de sec. n.º 460)
Hsp92I	GRCGYC (Id. de sec. n.º 461)	G R / C G Y C (Id. de sec. n.º 461) C Y G C / R G (Id. de sec. n.º 461)
Kpn2I	TCCGGA (Id. de sec. n.º 462)	T / C C G G A (Id. de sec. n.º 462) A G G C C / T (Id. de sec. n.º 462)
Ksp22I	TGATCA (Id. de sec. n.º 463)	T / G A T C A (Id. de sec. n.º 463) A C T A G / T (Id. de sec. n.º 463)
KspAI	GTAAAC (Id. de sec. n.º 464)	G T T / A A C (Id. de sec. n.º 464) C A A / T T G (Id. de sec. n.º 464)
KspI	CCGCGG (Id. de sec. n.º 631)	C C G C / G G (Id. de sec. n.º 631) G G / C G C C (Id. de sec. n.º 631)
MfiI	RGATCY (Id. de sec. n.º 465)	R / G A T C Y (Id. de sec. n.º 465) Y C T A G / R (Id. de sec. n.º 465)
MhII	GDGCHC (Id. de sec. n.º 466)	G D G C H / C (Id. de sec. n.º 466) C / H C G D G (Id. de sec. n.º 466)
MisI	TGGCCA (Id. de sec. n.º 467)	T G G / C C A (Id. de sec. n.º 467) A C C / G G T (Id. de sec. n.º 467)
MluNI	TGGCCA (Id. de sec. n.º 468)	T G G / C C A (Id. de sec. n.º 468) A C C / G G T (Id. de sec. n.º 468)
Mly113I	GGCGCC (Id. de sec. n.º 469)	G G / C G C C (Id. de sec. n.º 469) C C G C / G G (Id. de sec. n.º 469)
Mph1103I	ATGCAT (Id. de sec. n.º 470)	A T G C A / T (Id. de sec. n.º 470) T / A C G T A (Id. de sec. n.º 470)
MroI	TCCGGA (Id. de sec. n.º 471)	T / C C G G A (Id. de sec. n.º 471) A G G C C / T (Id. de sec. n.º 471)
MroNI	GCCGGC (Id. de sec. n.º 472)	G / C C G G C (Id. de sec. n.º 472) C G G C C / G (Id. de sec. n.º 472)
Msp20I	TGGCCA (Id. de sec. n.º 473)	T G G / C C A (Id. de sec. n.º 473) A C C / G G T (Id. de sec. n.º 473)
MspCI	CTTAAG (Id. de sec. n.º 474)	C / T T A A G (Id. de sec. n.º 474) G A A T T / C (Id. de sec. n.º 474)
MstI	TGCGCA (Id. de sec. n.º 475)	T G C / G C A (Id. de sec. n.º 475) A C G / C G T (Id. de sec. n.º 475)
MunI	CAATTG (Id. de sec. n.º 476)	C / A A T T G (Id. de sec. n.º 476) G T T A A / C (Id. de sec. n.º 476)
Mvrl	CGATCG (Id. de sec. n.º 477)	C G A T / C G (Id. de sec. n.º 477) G C / T A G C (Id. de sec. n.º 477)
NgoAIV	GCCGGC (Id. de sec. n.º 478)	G / C C G G C (Id. de sec. n.º 478) C G G C C / G (Id. de sec. n.º 478)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
Nsbl	TGCGCA (Id. de sec. n.º 479)	T G C / G C A (Id. de sec. n.º 479) A C G / C G T (Id. de sec. n.º 479)
NspIII	CYCGRG (Id. de sec. n.º 480)	C / Y C G R G (Id. de sec. n.º 480) G R G C Y / C (Id. de sec. n.º 480)
NspV	TTCGAA (Id. de sec. n.º 481)	T T / C G A A (Id. de sec. n.º 481) A A G C / T T (Id. de sec. n.º 481)
PaeI	GCATGC (Id. de sec. n.º 632)	G C A T G / C (Id. de sec. n.º 632) C / G T A C G (Id. de sec. n.º 632)
PagI	TCATGA (Id. de sec. n.º 482)	T / C A T G A (Id. de sec. n.º 482) A G T A C / T (Id. de sec. n.º 482)
Paul	GCGCGC (Id. de sec. n.º 483)	G / C G C G C (Id. de sec. n.º 483) C G C G C / G (Id. de sec. n.º 483)
PciI	AGGCCT (Id. de sec. n.º 484)	A G G / C C T (Id. de sec. n.º 484) T C C / G G A (Id. de sec. n.º 484)
PdiI	GCCGGC (Id. de sec. n.º 485)	G C C / G G C (Id. de sec. n.º 485) C G G / C C G (Id. de sec. n.º 485)
Pfi23II	CGTACG (Id. de sec. n.º 486)	C / G T A C G (Id. de sec. n.º 486) G C A T G / C (Id. de sec. n.º 486)
PinAI	ACCGGT (Id. de sec. n.º 487)	A / C C G G T (Id. de sec. n.º 487) T G G C C / A (Id. de sec. n.º 487)
Ple19I	CGATCG (Id. de sec. n.º 488)	C G A T / C G (Id. de sec. n.º 488) G C / T A G C (Id. de sec. n.º 488)
PmaCI	CACGTG (Id. de sec. n.º 489)	C A C / G T G (Id. de sec. n.º 489) G T G / C A C (Id. de sec. n.º 489)
PshBI	ATTAAT (Id. de sec. n.º 490)	A T / T A A T (Id. de sec. n.º 490) T A A T / T A (Id. de sec. n.º 490)
Psp124BI	GAGCTC (Id. de sec. n.º 491)	G A G C T / C (Id. de sec. n.º 491) C / T C G A G (Id. de sec. n.º 491)
Psp1406I	AACGTT (Id. de sec. n.º 492)	A A / C G T T (Id. de sec. n.º 492) T T G C / A A (Id. de sec. n.º 492)
PspAI	CCCGGG (Id. de sec. n.º 493)	C / C C G G G (Id. de sec. n.º 493) G G G C C / C (Id. de sec. n.º 493)
PspLI	CGTACG (Id. de sec. n.º 494)	C / G T A C G (Id. de sec. n.º 494) G C A T G / C (Id. de sec. n.º 494)
PspN4I	GGNNCC (Id. de sec. n.º 495)	G G N / N C C (Id. de sec. n.º 495) C C N / N G G (Id. de sec. n.º 495)
PsuI	RGATCY (Id. de sec. n.º 496)	R / G A T C Y (Id. de sec. n.º 496) Y C T A G / R (Id. de sec. n.º 496)
RcaI	TCATGA (Id. de sec. n.º 497)	T / C A T G A (Id. de sec. n.º 497) A G T A C / T (Id. de sec. n.º 497)
SduI	GDGCHC (Id. de sec. n.º 498)	G D G C H / C (Id. de sec. n.º 498) C / H C G D G (Id. de sec. n.º 498)
Sfr274I	CTCGAG (Id. de sec. n.º 499)	C / T C G A G (Id. de sec. n.º 499) G A G C T / C (Id. de sec. n.º 499)
Sfr303I	CCGCGG (Id. de sec. n.º 500)	C C G C / G G (Id. de sec. n.º 500) G G / C G C C (Id. de sec. n.º 500)
SfuI	TTCGAA (Id. de sec. n.º 501)	T T / C G A A (Id. de sec. n.º 501) A A G C / T T (Id. de sec. n.º 501)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
SgrBI	CCGCGG (Id. de sec. n.º 502)	C C G C / G G (Id. de sec. n.º 502) G G / C G C C (Id. de sec. n.º 502)
SiaI	CTCGAG (Id. de sec. n.º 503)	C / T C G A G (Id. de sec. n.º 503) G A G C T / C (Id. de sec. n.º 503)
SpaHI	GCAATG (Id. de sec. n.º 504)	G C A T G / C (Id. de sec. n.º 504) C / G T A C G (Id. de sec. n.º 504)
SseBI	AGGCCT (Id. de sec. n.º 505)	A G G / C C T (Id. de sec. n.º 505) T C C / G G A (Id. de sec. n.º 505)
SspBI	TGTACA (Id. de sec. n.º 506)	T / G T A C A (Id. de sec. n.º 506) A C A T G / T (Id. de sec. n.º 506)
SstI	GAGCTC (Id. de sec. n.º 507)	G A G C T / C (Id. de sec. n.º 507) C / T C G A G (Id. de sec. n.º 507)
SstII	CCGCGG (Id. de sec. n.º 508)	C C G C / G G (Id. de sec. n.º 508) G G / C G C C (Id. de sec. n.º 508)
SunI	CGTACG (Id. de sec. n.º 509)	C / G T A C G (Id. de sec. n.º 509) G C A T G / C (Id. de sec. n.º 509)
TatI	WGTACW (Id. de sec. n.º 510)	W / G T A C W (Id. de sec. n.º 510) W C A T G / W (Id. de sec. n.º 510)
Vha464I	CTTAAG (Id. de sec. n.º 511)	C I T T A A G (Id. de sec. n.º 511) G A A T T I C (Id. de sec. n.º 511)
VneI	GTGCAC (Id. de sec. n.º 512)	G / T G C A C (Id. de sec. n.º 512) C A C G T / G (Id. de sec. n.º 512)
VspI	ATTAAT (Id. de sec. n.º 513)	A T I T A A T (Id. de sec. n.º 513) T A A T / T A (Id. de sec. n.º 513)
XapI	RAATTY (Id. de sec. n.º 514)	R / A A T T Y (Id. de sec. n.º 514) Y T T A A / R (Id. de sec. n.º 514)
XhoII	RGATCY (Id. de sec. n.º 515)	R / G A T C Y (Id. de sec. n.º 515) Y C T A G / R (Id. de sec. n.º 515)
XmaCI	CCCGGG (Id. de sec. n.º 516)	C / C C G G G (Id. de sec. n.º 516) G G G C C / C (Id. de sec. n.º 516)
XmaIII	CGGCCG (Id. de sec. n.º 517)	C / G G C C G (Id. de sec. n.º 517) G C C G G / C (Id. de sec. n.º 517)
XmaJI	CCTAGG (Id. de sec. n.º 518)	C / C T A G G (Id. de sec. n.º 518) G G A T C / C (Id. de sec. n.º 518)
XmiI	GTMKAC (Id. de sec. n.º 519)	G T / M K A C (Id. de sec. n.º 519) C A K M / T G (Id. de sec. n.º 519)
ZhoI	ATCGAT (Id. de sec. n.º 520)	A T / C G A T (Id. de sec. n.º 520) T A G C / T A (Id. de sec. n.º 520)
Zsp2I	ATGCAT (Id. de sec. n.º 521)	A T G C A / T (Id. de sec. n.º 521) T / A C G T A (Id. de sec. n.º 521)
AocI	CCTNAGG (Id. de sec. n.º 522)	C C / T N A G G (Id. de sec. n.º 522) G G A N T / C C (Id. de sec. n.º 522)
AxyI	CCTNAGG (Id. de sec. n.º 523)	C C / T N A G G (Id. de sec. n.º 523) G G A N T / C C (Id. de sec. n.º 523)
Bpu1102I	GCTNAGC (Id. de sec. n.º 524)	G C / T N A G C (Id. de sec. n.º 524) C G A N T / C G (Id. de sec. n.º 524)
Bse21I	CCTNAGG (Id. de sec. n.º 525)	C C / T N A G G (Id. de sec. n.º 525) G G A N T / C C (Id. de sec. n.º 525)
Bsp1720I		G C / T N A G C (Id. de sec. n.º 526)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
	GCTNAGC (Id. de sec. n.º 526)	C G A N T / C G (Id. de sec. n.º 526)
BstPI	GGTNACC (Id. de sec. n.º 527)	G / G T N A C C (Id. de sec. n.º 527) C C A N T G / G (Id. de sec. n.º 527)
CelII	GCTNAGC (Id. de sec. n.º 528)	G C / T N A G C (Id. de sec. n.º 528) C G A N T / C G (Id. de sec. n.º 528)
Cpol	CGGWCCG (Id. de sec. n.º 529)	C G / G W C C G (Id. de sec. n.º 529) G C C W G / G C (Id. de sec. n.º 529)
Cspl	CGGWCCG (Id. de sec. n.º 530)	C G / G W C C G (Id. de sec. n.º 530) G C C W G / G C (Id. de sec. n.º 530)
Drall	RGNCCY (Id. de sec. n.º 531)	R G / G N C C Y (Id. de sec. n.º 531) Y C C N G / G R (Id. de sec. n.º 531)
Eco65I	GGTNACC (Id. de sec. n.º 532)	G / G T N A C C (Id. de sec. n.º 532) C C A N T G / G (Id. de sec. n.º 532)
Eco81I	CCTNAGG (Id. de sec. n.º 533)	C C / T N A G G (Id. de sec. n.º 533) G G A N T / C C (Id. de sec. n.º 533)
Eco91I	GGTNACC (Id. de sec. n.º 534)	G / G T N A C C (Id. de sec. n.º 534) C C A N T G / G (Id. de sec. n.º 534)
Espl	GCTNAGC (Id. de sec. n.º 535)	G C / T N A G C (Id. de sec. n.º 535) C G A N T / C G (Id. de sec. n.º 535)
KfiI	GGGWCCC (Id. de sec. n.º 536)	G G / G W C C C (Id. de sec. n.º 536) C C C W G / G G (Id. de sec. n.º 536)
LguI	GCTCTTC (Id. de sec. n.º 634)	G C T C T T C N / N N N (Id. de sec. n.º 635) C G A G A A G N N N N / (Id. de sec. n.º 636)
MabI	ACCWGGT (Id. de sec. n.º 539)	A / C C W G G T (Id. de sec. n.º 539) T G G W C C / A (Id. de sec. n.º 539)
PpuXI	RGGWCCY (Id. de sec. n.º 540)	R G / G W C C Y (Id. de sec. n.º 540) Y C C W G / G R (Id. de sec. n.º 540)
Psp5II	RGGWCCY (Id. de sec. n.º 541)	R G / G W C C Y (Id. de sec. n.º 541) Y C C W G / G R (Id. de sec. n.º 541)
PspEI	GGTNACC (Id. de sec. n.º 542)	G / G T N A C C (Id. de sec. n.º 542) C C A N T G / G (Id. de sec. n.º 542)
Rsr2I	CGGWCCG (Id. de sec. n.º 543)	C G / G W C C G (Id. de sec. n.º 543) G C C W G / G C (Id. de sec. n.º 543)
SauI	CCTNAGG (Id. de sec. n.º 544)	C C / T N A G G (Id. de sec. n.º 544) G G A N T / C C (Id. de sec. n.º 544)
AbsI	CCTCGAGG (Id. de sec. n.º 545)	C C / T C G A G G (Id. de sec. n.º 545) G G A G C T / C C (Id. de sec. n.º 545)
CciNI	GCGGCCGC (Id. de sec. n.º 546)	G C / G G C C G C (Id. de sec. n.º 546) C G C C G G / C G (Id. de sec. n.º 546)
FspAI	RTGCGCAY (Id. de sec. n.º 547)	R T G C / G C A Y (Id. de sec. n.º 547) Y A C G / C G T R (Id. de sec. n.º 547)
MauBI	CGCGCGCG (Id. de sec. n.º 548)	C G / C G C G C G (Id. de sec. n.º 548) G C G C G C / G C (Id. de sec. n.º 548)
MreI	CGCCGGCG (Id. de sec. n.º 549)	C G / C C G G C G (Id. de sec. n.º 549) G C G G C C / G C (Id. de sec. n.º 549)
MssI	GTTTAAAC (Id. de sec. n.º 550)	G T T T / A A A C (Id. de sec. n.º 550) C A A A / T T T G (Id. de sec. n.º 550)
RgaI	GCGATCGC (Id. de sec. n.º 551)	G C G A T / C G C (Id. de sec. n.º 551) C G C / T A G C G (Id. de sec. n.º 551)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
SdaI	CCTGCAGG (Id. de sec. n.º 552)	C C T G C A / G G (Id. de sec. n.º 552) G G / A C G T C C (Id. de sec. n.º 552)
SfaI	GCGATCGC (Id. de sec. n.º 553)	G C G A T / C G C (Id. de sec. n.º 553) C G C / A G C G (Id. de sec. n.º 553)
Sgfl	GCGATCGC (Id. de sec. n.º 554)	G C G A T / C G C (Id. de sec. n.º 554)
	554)	C G C / A G C G (Id. de sec. n.º 554)
SmlI	ATTAAAT (Id. de sec. n.º 555)	A T T T / A A A T (Id. de sec. n.º 555) T A A A T T T A (Id. de sec. n.º 555)
Sse232I	CGCCGGCG (Id. de sec. n.º 556)	C G / C C G G C G (Id. de sec. n.º 556) G C G G C C / G C (Id. de sec. n.º 556)
Adel	CACNNNGTG (Id. de sec. n.º 557)	C A C N N N / G T G (Id. de sec. n.º 557) G T G / N N N C A C (Id. de sec. n.º 557)
Aspl	GACNNNGTC (Id. de sec. n.º 558)	G A C N / N N G T C (Id. de sec. n.º 558) C T G N N / N C A G (Id. de sec. n.º 558)
Cail	CAGNNNCTG (Id. de sec. n.º 559)	C A G N N N / C T G (Id. de sec. n.º 559) G T C / N N N G A C (Id. de sec. n.º 559)
Psyl	GACNNNGTC (Id. de sec. n.º 560)	G A C N / N N G T C (Id. de sec. n.º 560) C T G N N / N C A G (Id. de sec. n.º 560)
Tell	GACNNNGTC (Id. de sec. n.º 561)	G A C N / N N G T C (Id. de sec. n.º 561) C T G N N / N C A G (Id. de sec. n.º 561)
Asp700I	GAANNNTTC (Id. de sec. n.º 562)	G A A N N I N N T T C (Id. de sec. n.º 562) C T T N N / N N A A G (Id. de sec. n.º 562)
BoxI	GACNNNGTC (Id. de sec. n.º 563)	G A C N N / N N G T C (Id. de sec. n.º 563) C T G N N / N N C A G (Id. de sec. n.º 563)
Bse8I	GATNNNNATC (Id. de sec. n.º 564)	G A T N N / N N A T C (Id. de sec. n.º 564) C T A N N / N N T A G (Id. de sec. n.º 564)
BseJI	GATNNNNATC (Id. de sec. n.º 565)	G A T N N / N N A T C (Id. de sec. n.º 565) C T A N N / N N T A G (Id. de sec. n.º 565)
BsiBI	GATNNNNATC (Id. de sec. n.º 566)	G A T N N / N N A T C (Id. de sec. n.º 566) C T A N N / N N T A G (Id. de sec. n.º 566)
BsrBRI	GATNNNNATC (Id. de sec. n.º 567)	G A T N N / N N A T C (Id. de sec. n.º 567) C T A N N / N N T A G (Id. de sec. n.º 567)
BstPAI	GACNNNGTC (Id. de sec. n.º 568)	G A C N N / N N G T C (Id. de sec. n.º 568) C T G N N / N N C A G (Id. de sec. n.º 568)
CjeNII	GAGNNNNNGT (Id. de sec. n.º 569)	G A G N N N N N G T (Id. de sec. n.º 569) C T C N N N N N C A (Id. de sec. n.º 569)
MamI	GATNNNNATC (Id. de sec. n.º 570)	G A T N N / N N A T C (Id. de sec. n.º 570) C T A N N / N N T A G (Id. de sec. n.º 570)
MroXI	GAANNNTTC (Id. de sec. n.º 571)	G A A N N / N N T T C (Id. de sec. n.º 571) C T T N N / N N A A G (Id. de sec. n.º 571)
OliI	CACNNNGTG (Id. de sec. n.º 572)	C A C N N / N N G T G (Id. de sec. n.º 572) G T G N N / N N C A C (Id. de sec. n.º 572)
Pdml	GAANNNTTC (Id. de sec. n.º 573)	G A A N N / N N T T C (Id. de sec. n.º 573) C T T N N / N N A A G (Id. de sec. n.º 573)
RseI	CAYNNNNRTG (Id. de sec. n.º 574)	C A Y N N / N N R T G (Id. de sec. n.º 574) G T R N N / N N Y A C (Id. de sec. n.º 574)
SmiMI	CAYNNNNRTG (Id. de sec. n.º 575)	C A Y N N / N N R T G (Id. de sec. n.º 575) G T R N N / N N Y A C (Id. de sec. n.º 575)
AccB7I		C C A N N N N / N T G G (Id. de sec. n.º 576)

ES 3 015 369 T3

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
	CCANNNNNNTGG (Id. de sec. n.º 576)	G G T N / N N N N A C C (Id. de sec. n.º 576)
AspEI	GACNNNNNGTC (Id. de sec. n.º 577)	G A C N N N / N N G T C (Id. de sec. n.º 577) C T G N N / N N N C A G (Id. de sec. n.º 577)
BalI	CCANNNNNNTGG (Id. de sec. n.º 578)	C C A N N N N / N T G G (Id. de sec. n.º 578) G G T N / N N N N A C C (Id. de sec. n.º 578)
BmeRI	GACNNNNNGTC (Id. de sec. n.º 579)	G A C N N N / N N G T C (Id. de sec. n.º 579) C T G N N / N N N C A G (Id. de sec. n.º 579)
BpII	GAGNNNNNCTC (Id. de sec. n.º 580)	NNNNN/NNNNNNNNNGAGNNNNNCTC/NNNNNNNNNNNNNN/ (Id. de sec. n.º 581) /NNNNNNNNNNNNNNCTC/NNNNNGAGNNNNNNNN/NNNNN (Id. de sec. n.º 582)
Bsc4I	CCNNNNNNNGG (Id. de sec. n.º 583)	C C N N N N N / N N G G (Id. de sec. n.º 583) G G N N / N N N N N C C (Id. de sec. n.º 583)
BseLI	CCNNNNNNNGG (Id. de sec. n.º 584)	C C N N N N N / N N G G (Id. de sec. n.º 584) G G N N / N N N N N C C (Id. de sec. n.º 584)
BsiYI	CCNNNNNNNGG (Id. de sec. n.º 585)	C C N N N N N / N N G G (Id. de sec. n.º 585) G G N N / N N N N N C C (Id. de sec. n.º 585)
BstENI	CCTNNNNNAGG (Id. de sec. n.º 586)	C C T N N / N N N A G G (Id. de sec. n.º 586) G G A N N N / N N T C C (Id. de sec. n.º 586)
BstMWI	GCNNNNNNNGC (Id. de sec. n.º 587)	G C N N N N N / N N G C (Id. de sec. n.º 587) C G N N / N N N N N C G (Id. de sec. n.º 587)
CjeI	CCANNNNNNGT (Id. de sec. n.º 588)	NNNNN/NNNNNNNNCCANNNNNNGTNNNNNNNNNNNNNN/ (Id. de sec. n.º 589) /NNNNNNNNNNNNNNGGTNNNNNNCCANNNNNNNNN/NNNNN (Id. de sec. n.º 590)
Cjul	CAYNNNNNRTG (Id. de sec. n.º 591)	C A Y N N N N N R T G (Id. de sec. n.º 591) G T R N N N N N Y A C (Id. de sec. n.º 591)
Cjull	CAYNNNNNCTC (Id. de sec. n.º 592)	C A Y N N N N N C T C (Id. de sec. n.º 592) G T R N N N N N G A G (Id. de sec. n.º 593)
Dril	GACNNNNNGTC (Id. de sec. n.º 594)	G A C N N N / N N G T C (Id. de sec. n.º 594) C T G N N / N N N C A G (Id. de sec. n.º 594)
Eam1105I	GACNNNNNGTC (Id. de sec. n.º 595)	G A C N N N / N N G T C (Id. de sec. n.º 595) C T G N N / N N N C A G (Id. de sec. n.º 595)
EclHKI	GACNNNNNGTC (Id. de sec. n.º 596)	G A C N N N / N N G T C (Id. de sec. n.º 596) C T G N N / N N N C A G (Id. de sec. n.º 596)
FalI	AAGNNNNNCTT (Id. de sec. n.º 597)	NNNNN/NNNNNNNNNAAGNNNNNCTTNNNNNNNNNNNNNN/ (Id. de sec. n.º 598) /NNNNNNNNNNNNNNTTCTNNNNNGAANNNNNNNN/NNNNN (Id. de sec. n.º 599)
HpyF10VI	GCNNNNNNNGC (Id. de sec. n.º 600)	G C N N N N N / N N G C (Id. de sec. n.º 600) C G N N / N N N N N C G (Id. de sec. n.º 600)
NgoAVIII	GACNNNNNTGA (Id. de sec. n.º 601)	NN/NNNNNNNNNNNNNGACNNNNNTGANNNNNNNNNNNNN/ (Id. de sec. n.º 602) /NNNNNNNNNNNNNNCTGNNNNNACTNNNNNNNNNNNN/NN (Id. de sec. n.º 603)
NruGI	GACNNNNNGTC (Id. de sec. n.º 604)	G A C N N N / N N G T C (Id. de sec. n.º 604) C T G N N / N N N C A G (Id. de sec. n.º 604)
PfiBI	CCANNNNNNTGG (Id. de sec. n.º 605)	C C A N N N N / N T G G (Id. de sec. n.º 605) G G T N / N N N N A C C (Id. de sec. n.º 605)
UbaF14I	CCANNNNNNTCG (Id. de sec. n.º 606)	C C A N N N N N T C G (Id. de sec. n.º 606) G G T N N N N N A G C (Id. de sec. n.º 607)
XagI		C C T N N / N N N A G G (Id. de sec. n.º 608)

Enzima de restricción de tipo IIS	Sitio de reconocimiento de secuencias	Sitio de corte
	CCTNNNNNAGG (Id. de sec. n.º 608)	G G A N N N / N N T C C (Id. de sec. n.º 608)
AasI	GACNNNNNNGTC (Id. de sec. n.º 609)	G A C N N N N / N N G T C (Id. de sec. n.º 609) C T G N N / N N N N C A G (Id. de sec. n.º 609)
BdaI	TGANNNNNNTCA (Id. de sec. n.º 610)	NN/NNNNNNNNNNNTGANNNNNNNTCANNNNNNNNNNNN/ (Id. de sec. n.º 611) /NNNNNNNNNNNNNACTNNNNNNNAGTNNNNNNNNNNNN/NN (Id. de sec. n.º 612)
Bsp24I	GACNNNNNNTGG (Id. de sec. n.º 613)	NNNNN/NNNNNNNNNGACNNNNNNNTGGNNNNNNNNNNNN/ (Id. de sec. n.º 614) /NNNNNNNNNNNNNNCTGNNNNNNNACCNNNNNNNN/NNNNN (Id. de sec. n.º 615)
CjePI	CCANNNNNNNTC (Id. de sec. n.º 616)	NNNNNN/NNNNNNNNCCANNNNNNNTCANNNNNNNNNNNNNN/ (Id. de sec. n.º 617) /NNNNNNNNNNNNNNGGTNNNNNNNAGNNNNNNNN/NNNNNN (Id. de sec. n.º 618)
DseDI	GACNNNNNNGTC (Id. de sec. n.º 619)	G A C N N N N / N N G T C (Id. de sec. n.º 619) C T G N N / N N N N C A G (Id. de sec. n.º 619)
UbaF9I	TACNNNNNRTGT (Id. de sec. n.º 620)	T A C N N N N N R T G T (Id. de sec. n.º 620) A T G N N N N N Y A C A (Id. de sec. n.º 621)
ArsI	GACNNNNNNTTYG (Id. de sec. n.º 622)	NNNNN/NNNNNNNNNGACNNNNNNNTTYGNNNNNNNNNNNN/ (Id. de sec. n.º 623) /NNNNNNNNNNNNNNCTGNNNNNNNAARCNNNNNNNN/NNNNN (Id. de sec. n.º 624)
BarI	GAAGNNNNNNNTAC (Id. de sec. n.º 625)	NNNNN/NNNNNNNNGAAGNNNNNNNTACNNNNNNNNNNNN/ (Id. de sec. n.º 626) /NNNNNNNNNNNNNNCTTCNNNNNNNATGNNNNNNNN/NNNNN (Id. de sec. n.º 627)
PciI	WCGNNNNNNNCGW (Id. de sec. n.º 628)	W C G N N N N / N N N N C G W (Id. de sec. n.º 628) W G C N N N / N N N N G C W (Id. de sec. n.º 628)
UbaF131	GAGNNNNNNCTGG (Id. de sec. n.º 629)	G A G N N N N N N C T G G (Id. de sec. n.º 629) C T C N N N N N N G A C C (Id. de sec. n.º 630)

En algunas alternativas, se proporciona un polinucleótido que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasas y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente. nucleótidos de timina y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasas está ubicado dentro de 1-55 pares de bases (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases) del sitio de escisión de endonucleasa la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa están dentro de 1 a 40 pares de bases (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases) de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. Algunas alternativas incluyen un polinucleótido que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina y un sitio de reconocimiento de endonucleasas dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 nucleótidos o un número de nucleótidos dentro de un intervalo definido por dos de los valores anteriormente mencionados a partir del residuo de timina más 5' del dominio poli(T) de la cadena molde, pero configurados o espaciados para permitir la acción enzimática escisión dentro del dominio poli(T). En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es específico para una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es AatII, AbaSI, Acc65I, Accl, AciI, AclI, Afel, AflII, AflIII, Agel, AhdI, AleI, AluI, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeKI, Apol, AscI, AseI, AsiSI, Aval, Avail, AvrII, BaeGI, BaeI, BamHI, BanI,

BanII, BbsI, BbvCI, BbvI, Bccl, BceAI, Bcgl, BciVI, Bell, BcoDI, Bfal, BfuAI, BfuCI, BgII, BgIII, Bipl, BmgBI, Bmrl, BmtI, Bpml, Bpu10I, BpuEI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, Bsal, BsaJI, BsaVI, BsaXI, BseRI, BseYI, BsgI, BsiEI, BsiHKAI, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BsoBI, Bsp1286I, BspCNI, BspDI, BspEI, BspHI, BspMI, BspQI, BsrBI, BsrDI, BsrFI, BsrGI, BsrI, BssHII, BssKI, BssSI, BstAPI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZ17I, Bsu36I, BtgI, BtgZI, BtsCI, BtsI, BtsIMutI, Cac8I, Clal, CspCI, CviAI, CviKI-1, CviQI, Ddel, Dpnl, DpnlI, DraI, DrdI, EaeI, EagI, EarI, Ecil, Fco53kI, EcoNI, EcoO109I, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, FatI, Faul, Fnu4HI, FokI, FseI, FspEI, FspI, HaeII, HaeIII, Hgal, HhaI, HincII, HindIII, HinfI, HinPII, Hpal, HpaII, HphI, Hpy166II, Hpy188II, Hpy188III, Hpy99I, HpyA, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V, I-CeuI, I-SceI, KasI, KpnI, LpnPI, MboI, MbolI, MfeI, MluCI, MluI, MlyI, Mmel, MnlI, MscI, MseI, MslI, MspA1I, Mspl, MspJI, MwoI, NaeI, NarI, BbvCI, BsmI, BsrDI, BtsI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NlaIII, NlaIV, NmeAIII, NotI, Nrul, NsiI, NspI, Nt.Awl, Nt.BbvCI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI, Nt.CviPII, PacI, PaeR7I, PciI, PfiFI, PfiMI, PI-PspI, PI-SceI, PliI, PluTI, PmlI, PmlI, PpuMI, PshAI, PsiI, PspGI, PspOMI, PspXI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, RsrI, SacI, SacII, SalI, SapI, Sau3AI, Sau96I, SbfI, ScrFI, SexAI, SfaNI, SfcI, SfiI, SfoI, SgrAI, Smal, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, StuI, StyD4I, Styl, SwaI, TaqI, TfiI, TllI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspMI TspRI, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, XmnI, o ZraI.

En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, la endonucleasa es StuI. En algunas alternativas, el sitio de restricción es un sitio de reconocimiento de restricción de endonucleasa invertido Acil, MnlI, AlwI, BbvI, Bccl, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, BsrI, BtsCI, FokI, Hgal, HphI, HpyAV, MbolI, MlyI, PliI, SfaNI, Acil, BciVI, BfuAI, BmgBI, Bmrl, Bpml, BpuEI, Bsal, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, Ecil, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, BaeI, BsaXI, CspCI, Afal, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1I, R9529, Hsp92II, HspAI, MaeI, Maell, Mvnl, Pall, RsaNI, SetI, SgeI, Sse9I, Trull, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, XspI, AflI, AgsI, AspS9I, AsuC2I, Asul, Bcefl, BcnI, Bisl, Blsl, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BsfFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, Caull, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FaqI, FinI, Fsp4HI, Glul, Hin4II, HpyF3I, Itai, MaeIII, MspR9I, Mval, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, Aaul, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AceII, Acsi, AcvI, Acyl, AhII, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, AsuII, AsuNHI, AvailI, Avill, BanIII, Baul, Bbel, BbrPI, Bbul, Bbv12I, BbvII, Bce83I, Bcol, Bcul, Bfml, BfrBI, BfrI, Bini, BmcAI, BmeT110I, Bmil, Bmul, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp13I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMII, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstACI, BstAFI, BstAUI, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSFI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, Bvel, CciI, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, DsaI, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoICRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, EgeI, Ehel, EhlI, FauNDI, Fbal, FbII, FriOI, FunI, FunII, GdII, Gsal, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI, KspI, MfiI, MhII, Misl, MluNI, Mly113I, Mph1103I, Mrol, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, Muni, Mvrl, NgoAIV, Nsbl, NspIII, NspV, Pael, PagI, Paul, Pcel, Pfi23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, Psul, Rcal, Sdul, Sfr274I, Sfr303I, Sful, SgrBI, Slal, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, Vnel, XapI, XhoII, XmaCI, XmaIII, XmaJI, Xmil, ZhoI, Zsp2I, Aocl, Axyl, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CellI, Cpol, Cspl, Drall, Eco065I, Eco81I, Eco91I, Espl, KfiI, Lgul, Mabl, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, Saul, AbsI, CciNI, FspAI, MauBI, Mrel, Mssl, Rgal, Sdal, SfaAI, Sgfi, Smil, Sse232I, Adel, Aspl, Cail, Psyl, Tell, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI, BstPAI, CjeNII, MamI, MroXI, OliI, Pdml, RseI, SmiMI, AccB7I, AspEI, BasI, BmeRI, BplI, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, Cjel, Cjul, Cjull, Dril, Eam1105I, EclHKI, Fall, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PfiBI, UbaF14I, XagI, AasI, Bdal, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, Arsl, BarI, Pcsi o UbaF13I. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, dicho sitio de reconocimiento de endonucleasas está ubicado dentro de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa o cualquier número de pares de bases entre los dos valores mencionados anteriormente, y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 pares de bases. de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina de la cadena molde o cualquier número de pares de bases entre cualquiera de los dos valores anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido y el sitio de escisión de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa y el sitio de escisión de endonucleasa comprenden una secuencia que se muestra en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona StuI, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de StuI, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y StuI se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es StuI. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de StuI está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, en donde la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5'

(o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, la endonucleasa se escinde en el lado 5' de la guanina., citosina o adenina.

En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS, en donde la endonucleasa de restricción de tipo IIS se escinde a una distancia del sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS comprende las secuencias para el sitio de reconocimiento de secuencias tal como se expone en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, la endonucleasa de restricción de tipo IIS es Acil, MnlI, AlwI, BbvI, BclI, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, BsrI, BtsCI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MbolI, MlyI, PstI, SfaNI, AclI, BciVI, BfuAI, BmgBI, Bmrl, Bpml, BpuEI, BsaI, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, EciI, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, BaeI, BsaXI, CspCI, AfaI, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1I, R9529, Hsp92II, HspAI, MaeI, MaeII, MvnI, PalI, RsaNI, SetI, SgeI, Sse9I, Tru1I, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, XspI, AflI, AgsI, AspS9I, AsuC2I, AsuI, BceII, BcnI, BsiI, BslI, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BsiFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, CaulI, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FaeI, FinI, Fsp4HI, GluI, Hin4II, HpyF3I, Itai, MaeIII, MspR9I, MvaI, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, AauI, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AcelII, Acsl, AcvI, Acyl, AhII, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, AsuII, AsuNHI, AvallI, AvilI, BanIII, Baul, Bbel, BbrPI, Bbul, Bbv12I, BbvII, Bce83I, BclI, Bcul, Bfml, BfrBI, BfrI, BlnI, BmcAI, BmeT110I, Bmil, Bmul, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMII, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstACI, BstAFI, BstAUI, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, Bvel, CciI, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, DsaI, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoLCRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, EgeI, Ehel, ErhI, FauNDI, Fbal, FblI, FriOI, FunI, FunII, GdiI, Gsal, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI, KspI, MfiI, MhlI, MlsI, MluNI, Mly113I, Mph1103I, MroI, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, MunI, Mvrl, NgoAIV, Nsbl, NspIII, NspV, PaeI, PagI, Paul, Pcel, Pfi23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, Psul, Rcal, Sdul, Sfr274I, Sfr303I, Sful, SgrBI, Sial, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, VneI, XapI, XhoI, XmaCI, XmaIII, XmaJI, XmiI, ZhoI, Zsp2I, AocI, AxyI, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CellI, Cpol, CspI, DralI, Eco065I, Eco81I, Eco91I, EspI, KfiI, LguI, Mabl, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, Saul, AbsI, CciNI, FspAI, MauBI, MreI, MssI, RgaI, SdaI, SfaAI, SgfI, SmiI, Sse232I, Adel, Aspl, Cail, Psyl, Tell, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI, BstPAI, CjeNII, MamI, MroXI, OliI, Pdml, RseI, SmiMI, AccB7I, AspEI, BasI, BmeRI, BplI, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, CjeI, Cjul, Cjull, Dril, Eam1105I, EclHKI, Fall, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PfiBI, UbaF14I, XagI, Aasl, Bdal, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, Arsl, BarI, Pcsi o UbaF13I. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de secuencias está invertido. En algunas alternativas, en donde el sitio de reconocimiento de la secuencia está invertido, la endonucleasa de restricción de tipo IIS puede escindirse dentro de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la endonucleasa puede escindirse dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, en donde la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, la endonucleasa se escinde en el lado 5' de la guanina., citosina o adenina.

En algunas alternativas, se proporciona un polinucleótido que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 1-55 pares de bases (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 pares de bases) del sitio de escisión de endonucleasa la endonucleasa y dicho sitio de escisión de

endonucleasa están dentro de 1 a 40 pares de bases (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 pares de bases) de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, tal como Cas9, un derivado de la misma o un fragmento activo de la misma, véase, por ejemplo, **Id. de sec. n.º 6-14**, una TALEN o una MegaTAL, en donde el tercer ácido nucleico está unido operativamente a la segunda secuencia de ácido nucleico que comprende la pluralidad de nucleótidos de timina en el extremo opuesto del primer ácido nucleico adjunto que comprende el sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es específico para una endonucleasa. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es específico para una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa comprende cualquiera de los sitios de reconocimiento de endonucleasas descritos en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). Algunas alternativas incluyen un polinucleótido que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina, una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, tal como Cas9, un derivado de la misma o un fragmento activo de la misma, véase, por ejemplo, **Id. de sec. n.º, 6-14**, una TALEN o una MegaTAL y un sitio de reconocimiento de endonucleasa dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 nucleótidos o un número de nucleótidos dentro de un intervalo definido por dos de los valores anteriormente mencionados (5' en orientación) del primer residuo de timina del dominio de poli(T), pero configurado o espaciado para permitir la escisión enzimática dentro del dominio de poli(T). En algunas alternativas, la endonucleasa es AatII, AbaSI, Acc65I, AccI, Acil, AclI, Afel, AflII, AflIII, AgeI, AhdI, AleI, AluI, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeKI, Apol, AscI, Asel, AsiSI, Aval, Avall, AvrII, BaeGI, Bael, BamHI, BanI, BanII, BbsI, BbvCI, BbvI, Bccl, BceAI, Bcgl, BciVI, Bell, BcoDI, Bfal, BfuAI, BfuCI, BglI, BglII, BplI, BmgBI, Bmrl, BmtI, Bpml, Bpu10I, BpuEI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, Bsal, BsaJI, BsaVI, BsaXI, BseRI, BseYI, BsgI, BsiEI, BsiHKAI, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BsoBI, Bsp1286I, BspCNI, BspDI, BspEI, BspHI, BspMI, BspQI, BsrBI, BsrDI, BsrFI, BsrGI, Bsrl, BssHII, BssKI, BssSI, BstAPI, BstBI, BstEI, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZ17I, Bsu36I, BtgI, BtgZI, BtsCI, BtsI, BtsIMutI, Cac8I, Clal, CspCI, CviAI, CviKI-1, CviQI, DdeI, DpnI, DpnII, DraI, DrdI, EaeI, EagI, EarI, EclI, Fco53kI, EcoNI, EcoO109I, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, Fati, Faul, Fnu4HI, FokI, FseI, FspEI, FspI, HaeII, HaeIII, HgaI, HhaI, HincII, HindIII, HinfI, HinP1I, HpaI, HpaII, HphI, Hpy166II, Hpy188I, Hpy188III, Hpy99I, HpyA, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V, I-CeuI, I-SceI, KasI, KpnI, LpnPI, MboI, MbolI, MfeI, MluCI, MluI, MlyI, MmeI, MnlI, MscI, MseI, MslI, MspA1I, MspI, MspJI, MwoI, NaeI, NarI, BbvCI, BsmI, BsrDI, BtsI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NlaIII, NlaIV, NmeAIII, NotI, Nrul, NsiI, NspI, Nt.AluI, Nt.BbvCI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI, Nt.CviPII, PacI, PaeR7I, PciI, PfiFI, PfiMI, PI-PspI, PI-SceI, PleI, PluTI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, PsiI, PspGI, PspOMI, PspXI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, RsrII, SacI, SacII, SalI, SapI, Sau3AI, Sau96I, SbfI, ScrFI, SexAI, SfaNI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, StuI, StyD4I, StyI, SwaI, TaqI, TfiI, TllI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspMI TspRI, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, XmnI, o ZraI. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, la endonucleasa es StuI. Las endonucleasas pueden ser una enzima que escinde el enlace fosfodiéster dentro de un polinucleótido. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona StuI, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de StuI, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y StuI se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es StuI. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de StuI está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAI está invertido. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona StuI, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de StuI, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y StuI se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es StuI. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de StuI está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, en donde la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina

5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, la endonucleasa se escinde en el lado 5' de la guanina., citosina o adenina.

Algunas alternativas se refieren a un ARNm que comprende una cola de poli A, en donde dentro de dicha cola de poli A o corriente arriba del primer residuo de adenina de dicha cola de poli(A) se encuentra el gen. Algunos de estos ARNm también incluyen una secuencia que codifica un gen, tal como una nucleasa (por ejemplo, Cas9) o un derivado de la misma o un fragmento activo de la misma, véase, por ejemplo, **Id. de sec. n.º 6-14**, TALEN o MegaTAL). En algunas alternativas, se proporciona un ARNm que tiene una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde el ARNm comprende una primera secuencia que comprende un gen, una segunda secuencia que comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina y una tercera secuencia que comprende una secuencia complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la primera secuencia está unida covalentemente a la segunda secuencia en el extremo 5' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina y en donde dicho ARNm comprende un tercer secuencia que comprende una secuencia complementaria para un sitio de reconocimiento de endonucleasa en donde la tercera secuencia está unida covalentemente a dicha pluralidad de nucleótidos de adenina de dicho segundo ácido nucleico en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina de dicho segundo ácido nucleico. Este tipo de ARNm puede producirse si el polinucleótido para transcribir el ARNm no se escindió con la endonucleasa de restricción de tipo IIS. Algunas alternativas incluyen un ARNm que tiene una pluralidad de nucleótidos de adenina y al menos una secuencia complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa, tal como Stul o BsaI (en la cadena sencilla) dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos o un número de nucleótidos dentro de un intervalo definido por dos de los valores anteriormente mencionados corriente arriba (orientación 5') del primer residuo de adenina del dominio de poli(A). En algunas alternativas, la secuencia complementaria es un complemento (en la cadena sencilla) al sitio de reconocimiento de endonucleasa de AatII, AbaSI, Acc65I, AccI, Acil, AclI, Afel, AfIII, AfIII, Agel, AhdI, AleI, AluI, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeKI, Apol, AscI, AseI, AsiSI, Aval, Avall, AvrII, BaeGI, BaeI, BamHI, BanI, BanII, BbsI, BbvCI, BbvI, Bccl, BceAI, BcgI, BciVI, Bell, BcoDI, Bfal, BfuAI, BfuCI, BglI, BglII, Bipl, BmgBI, Bmrl, BmtI, Bpml, Bpu10I, BpuEI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, Bsal, BsaJI, BsaWI, BsaXI, BseRI, BseYI, BsgI, BsiEI, BsiHKAI, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BsoBI, Bsp1286I, BspCNI, BspDI, BspEI, BspHI, BspMI, BspQI, BsrBI, BsrDI, BsrFI, BsrGI, Bsrl, BssHII, BssKI, BssSI, BstAPI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZ17I, Bsu36I, BtgI, BtgZI, BtsCI, BtsI, BtsIMutI, Cac8I, ClaI, CspCI, CviAI, CviKI-1, CviQI, Ddel, DpnI, DpnII, DraI, DrdI, EaeI, EagI, EarI, EciI, Fco53kI, EcoNI, EcoO109I, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, FatI, Faul, Fnu4HI, FokI, FseI, FspEI, FspI, HaeII, HaeIII, HgaI, HhaI, HincII, HindIII, HinfI, HinPII, HpaI, HpaII, HphI, Hpy166II, Hpy188I, Hpy188III, Hpy99I, HpyA, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V, I-CeuI, I-SceI, KasI, KpnI, LpnPI, MboI, MboII, MfeI, MluCI, MluI, MlyI, MmeI, MnlI, MscI, MseI, MslI, MspAII, MspI, MspJI, MwoI, NaeI, NarI, BbvCI, BsmI, BsrDI, BtsI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NlaIII, NlaIV, NmeAII, NotI, NruI, NsiI, NspI, Nt AlwI, Nt BbvCI, Nt BsmAI, Nt BspQI, Nt BstNBI, Nt CviPII, PacI, PaeR7I, PciI, PfiFI, PfiMI, PI-PspI, PI-SceI, PluTI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, Psil, PspGI, PspOMI, PspXI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, RsrII, SacI, SacII, SalI, SapI, Sau3AI, Sau96I, SbfI, ScrFI, SexAI, SfaNI, SfcI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, Stul, StyD4I, Styl, SwaI, TaqI, TfiI, TllI, TseI, Tsp45I, Tsp509I, TspMI TspRI, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, XmnI, o ZraI. En algunas alternativas, la secuencia de al menos un sitio de endonucleasa está invertida, en donde la secuencia que codifica el complemento de ARN es un complemento de la secuencia invertida de al menos un sitio de endonucleasa (en la cadena sencilla). En algunas alternativas, la secuencia que codifica el complemento de ARN es un complemento de cualquiera de los sitios de reconocimiento de endonucleasas descritos en la **Tabla 1** (endonucleasas de restricción de tipo IIS) (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, los sitios de reconocimiento de endonucleasa descritos en la **Tabla 1** están invertidos (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, en donde el sitio de endonucleasa es el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, los sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS son sitios de reconocimiento para Acil, MnlI, AlwI, BbvI, Bccl, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, Bsrl, BtsCI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MboII, MlyI, PfiI, SfaNI, Acui, BciVI, BfuAI, BmgBI, Bmrl, Bpml, BpuEI, Bsal, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, EciI, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, Bael, BsaXI, CspCI, Afal, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1II, R9529, Hsp92II, HspAI, MaeI, MaeII, Mvnl, Pali, RsaNI, SetI, Sgel, Sse9I, Trull, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, Xspl, Afil, AgsI, AspS9I, AsuC2I, Asul, Bcefl, BcnI, Bisl, Blsl, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BslFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, CaulI, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FaqI, FinI, Fsp4HI, Glul, Hin4II, HpyF3I, Itai, MaeIII, MspR9I, Mval, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, Aaul, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AceIII, Acsl, Acvl, Acyl, Ahll, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, Asull, AsuNHI, AvallI, AvillI, Baul, Bbel, BbrPI, Bbul, Bbv12I, BbvII, Bce83I, Bcol, Bcul, Bfml, BfrBI, BfrI, Bini, BmcAI, BmeT110I, Bmil, Bmul, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMII, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstACI, BstAFI, BstAUI, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSFI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, Bvel, Ccil, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, Dsal, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoCRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, Egel, Ehel, ErhI, FauNDI, Fbal, Fbli, FriOI, FunI, FunII, GdiI, Gsal, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI, Kspl, Mfil, MhII, Misl, MluNI, Mly113I, Mph1103I, Mrol, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, MunI, Mvrl, NgoAIV, Nsbl,

NspIII, NspV, Pael, PagI, Paul, Pcel, Pcf23III, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, PspUL, RcaI, SduI, Sfr274I, Sfr303I, SfuI, SgrBI, Slal, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, VneI, XapI, XhoII, XmaCI, XmaIII, XmaJI, Xmii, ZhoI, Zsp2I, AocI, AxyI, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CellI, CpoI, CspI, DraII, Eco065I, Eco81I, Eco91I, EspI, KfiI, LguI, Mabi, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, Saul, AbsI, CciNI, FspAI, MauBI, MreI, MssI, RgaI, SdaI, SfaAI, Sgfi, SmiI, Sse232I, Adel, Aspi, Cail, Psyl, Tell, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI, BstPAI, CjeNII, Mami, MroXI, OliI, PdmI, RseI, SmiMI, AccB7I, AspEI, BasI, BmeRI, BplI, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, CjeI, Cjul, Cjull, Dril, Eam1105I, EclHKI, Fall, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PfiBI, UbaF14I, XagI, Aasi, Bdal, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, Arsl, BarI, Pcsi y UbaF13I. En algunas alternativas, los sitios de reconocimiento están invertidos, por lo que la secuencia complementaria también está invertida. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, en donde la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, la endonucleasa se escinde en el lado 5' de la guanina, citosina o adenina.

La Bsal es una endonucleasa de restricción de tipo II que también pertenece al subgrupo de las endonucleasas de tipo IIS. Las endonucleasas de restricción de tipo IIS pueden escindir el ADN a una distancia definida de sus sitios de reconocimiento asimétrico no palindrómicos. Esta característica se puede usar, por ejemplo, para alargar la cola de un tramo de poli(A). Aunque puede crearse una cola, como un tramo de poli(A), mediante la inserción de la secuencia en cualquier sitio de restricción, solo puede usarse un sitio de restricción de tipo IIS para alargar una cola, como un tramo de poli(A) una vez que el tramo de poli(A) está en su lugar. Solo un sitio de restricción S de tipo II puede escindirse adyacente y no dentro de la secuencia de reconocimiento, escindiéndose así en la región de poli(T) de dicho polinucleótido y asegurando que la cola de poli(A) que se transcribe a partir de dicho polinucleótido no termine en una secuencia que esté relacionada con el propio sitio de restricción.

Stul es una endonucleasa de restricción de tipo II que deja un extremo romo cuando escinde un ADN bicatenario. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCC^T (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido.

Para que la cola de poli(A) termine sin incluir bases adicionales más allá de ella, puede colocarse un sitio de reconocimiento de restricción de tipo IIS corriente abajo del sitio de corte previsto y dentro de la cola de poli(A), en donde el sitio de restricción esté “invertido” o “orientado hacia el sitio de poli(A)”, de modo que el sitio de escisión de restricción esté dentro de la región de codificación de la poli(A) (la pluralidad de residuos de timina en la cadena molde). Por lo tanto, el sitio de restricción puede usarse para alargar la cola una vez que esté en su lugar. El sitio de restricción puede codificarse dentro de la región de codificación de poli(A). En algunas alternativas del polinucleótido, el polinucleótido comprende un sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo IIS corriente abajo del sitio de corte previsto, creando así un sitio de escisión de endonucleasa de tipo IIS corriente arriba del sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo IIS. En algunas alternativas, la restricción de tipo IIS está invertida. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa de tipo IIS está a una distancia de 1 a 55 bases del sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo IIS. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa de tipo IIS está a una distancia de 1, 5, 10, 20, 30, 40 o 55 bases del sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo IIS o a una distancia entre dos de las bases mencionadas anteriormente del sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo IIS.

En algunas alternativas, se proporciona un polinucleótido que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasas para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde el polinucleótido comprende una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico

comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa están dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente o cualquier número de nucleótidos de timina unidos covalentemente entre cualquiera de los dos valores anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, Acil, MnlI, AlwI, BbvI, BclI, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, BsrI, BtsCI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MboII, MlyI, PstI, SfaNI, AclI, BciVI, BfuAI, BmgBI, BmrI, BpmI, BpuEI, BsaI, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, EciI, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, BaeI, BsaXI, CspCI, Afal, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1I, R9529, Hsp92II, HspAI, MaeI, MaeII, MvnI, PstI, RsaNI, SetI, SgeI, Sse9I, TruI, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, XspI, AflI, AgsI, AspS9I, AsuC2I, AsuI, BceII, BcnI, BsiI, BslI, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BsiFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, CautI, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FaeI, FinI, Fsp4HI, GluI, Hin4II, HpyF3I, Itai, MaeIII, MspR9I, MvaI, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, AauI, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AceII, AclI, AcvI, AcyI, AhII, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, AsuI, AsuNHI, AvallI, AvilI, BanII, Baul, Bbel, BbrPI, Bbul, Bbv12I, BbvII, Bce83I, Bcol, Bcul, Bfml, BfrBI, BfrI, Bini, BmAI, BmeT110I, Bmil, Bmul, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMI, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstACI, BstAFI, BstAUI, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSFI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, Bvel, CciI, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, DsaI, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoCRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, EgeI, EhlI, FauNDI, Fbal, FblI, FriOI, FunI, FunII, GdII, Gsal, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI, KspI, MflI, MhlI, MslI, MluNI, Mly113I, Mph1103I, MroI, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, Muni, Mvri, NgoAIV, NsbI, NspIII, NspV, PaeI, PagI, Paul, PceI, Pfl23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, PsuI, RcaI, SduI, Sfr274I, Sfr303I, SfuI, SgrBI, Slal, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, VneI, XapI, XhoI, XmaCI, XmaIII, XmaJI, XmiI, ZhoI, Zsp2I, AclI, AxyI, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CellI, Cpol, CspI, DralI, Eco065I, Eco81I, Eco91I, EspI, KfiI, LguI, Mabl, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, SauI, AbsI, CciNI, FspAI, MauBI, MreI, MssI, RgaI, SdaI, SfaAI, Sgfi, Smil, Sse232I, Adel, Aspl, Cail, PslI, Tell, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI, BstPAI, CjeNII, Maml, MroXI, OliI, PdmI, Rsel, SmiMI, AccB7I, AspEI, BasI, BmeRI, BplI, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, Cjel, Cjul, Cjull, DrilI, Eam1105I, EclHKI, Fall, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PflBI, UbaF14I, XagI, AasI, Bdal, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, Arsl, BarI, Pcsi o UbaF13I. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de secuencias está invertido. En algunas alternativas, el sitio de corte o sitio de escisión de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa comprende cualquiera de los sitios de reconocimiento de endonucleasas descritos en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, la endonucleasa es Acil, MnlI, AlwI, BbvI, BclI, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, BsrI, BtsCI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MboII, MlyI, PstI, SfaNI, AclI, BciVI, BfuAI, BmgBI, BmrI, BpmI, BpuEI, BsaI, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, EciI, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, BaeI, BsaXI, CspCI, Afal, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1II, R9529, Hsp92II, HspAI, MaeI, MaeII, MvnI, PstI, RsaNI, SetI, SgeI, Sse9I, TruI, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, XspI, AflI, AgsI, AspS9I, AsuC2I, AsuI, BceII, BcnI, BsiI, BslI, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BsiFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, CautI, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FaeI, FinI, Fsp4HI, GluI, Hin4II, HpyF3I, Itai, MaeIII, MspR9I, MvaI, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, AauI, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AceII, AclI, AcvI, AcyI, AhII, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, AsuI, AsuNHI, AvallI, AvilI, BanII, Baul, Bbel, BbrPI, Bbul, Bbv12I, BbvII, Bce83I, Bcol, Bcul, Bfml, BfrBI, BfrI, Bini, BmAI, BmeT110I, Bmil, Bmul, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMI, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstACI, BstAFI, BstAUI, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSFI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, Bvel, CciI, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, DsaI, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoCRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, EgeI, EhlI, FauNDI, Fbal, FblI, FriOI, FunI, FunII, GdII, Gsal, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI,

Kspl, Mfil, Mhll, Misl, MluNI, Mly113I, Mph1103I, Mrol, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, MunI, Mvrl, NgoAIV, Nsbl, NspIII, NspV, Pael, PagI, Paul, Pcel, Pfl23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, Psul, Rcal, Sdul, Sfr274I, Sfr303I, Sful, SgrBI, Slal, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, Vnel, Xapl, XholI, XmaCI, XmaII, XmaJI, Xmil, Zhol, Zsp2I, Aocl, Axyl, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CellI, Cpol, Cspl, Drall, Eco065I, Eco81I, Eco91I, Espl, Kfil, Lgul, Mabl, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, Saul, AbsI, CciNI, FspAI, MauBI, Mrel, Mssl, Rgal, Sdal, SfaAI, Sgfl, Smil, Sse232I, Adel, Aspl, Cail, Psyl, Tell, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI, BstPAI, CjeNI, Maml, MroXI, Olil, Pdml, Rsel, SmiMI, AccB7I, AspEI, BasI, BmeRI, BplI, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, Cjel, Cjul, Cjull, Dril, Eam1105I, EclHKL, Fall, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PflBI, UbaF14I, Xagl, Aasl, Bdal, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, Arsl, BarI, Pcsi o UbaF13I. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o Stul y la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 55 nucleótidos del sitio de reconocimiento de endonucleasa o cualquier número de nucleótidos entre los dos valores anteriormente mencionados lejos del sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa, tal como Cas9 o un derivado del mismo o un fragmento activo del mismo, una TALEN o MegaTAL, véase, por ejemplo, *Id. de sec. n.º 6-14*. En algunas alternativas, se proporciona un método para fabricar un polinucleótido que tiene una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasas para una endonucleasa insertada en el mismo, y en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde el método comprende proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionando una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la molde hebra, en donde la hebra molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el segundo ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa y une dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho El sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o Stul, y la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 55 nucleótidos del sitio de reconocimiento de endonucleasa o cualquier número de nucleótidos entre los dos valores anteriormente mencionados lejos del sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa, tal como Cas9 o un derivado del mismo o un fragmento activo del mismo, una TALEN o MegaTAL, véase, por ejemplo, *Id. de sec. n.º 6-14*. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (*Id. de sec. n.º: 633*), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (*Id. de sec. n.º: 633*). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En la presente memoria se describen métodos para fabricar un polinucleótido lineal que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina unidos covalentemente (un tramo de poli(T)) y uno o más de los sitios de reconocimiento de endonucleasas anteriormente mencionados insertados en él o unidos a los mismos, así como composiciones que comprenden estos polinucleótidos y métodos de uso de los mismos. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de Bsal, y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS está invertido. En algunas alternativas, el sitio de la endonucleasa de restricción de tipo IIS es un sitio de restricción de la endonucleasa de restricción de Bsal invertido. En algunas alternativas, el polinucleótido o vector que tiene la pluralidad de residuos de timina unidos covalentemente comprende solo un sitio de restricción de Bsal, de modo que

dicho sitio de Bsal es único para un dominio conector definido por tener polímeros 5' y 3' de residuos de timina que flanquean dicho sitio de Bsal. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende o codifica un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es Cas9 o un derivado de la misma o un fragmento activo de la misma, una TALEN o MegaTAL, véase, por ejemplo, **Id. de sec. n.º 6-14**. En algunas alternativas, la restricción de tipo IIS está invertida. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa de tipo IIS está a una distancia de 11, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o 55 bases de nucleótidos del sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo IIS o a cualquier distancia entre cualquiera de los dos valores anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa de tipo IIS está a una distancia de 1 a 4 bases del sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo IIS. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

Plásmidos lineales

La clonación molecular requiere la incorporación de material genético en un ácido nucleico. A pesar de los avances en la secuenciación y la clonación molecular, la secuenciación y el análisis completos de las proteínas requieren la clonación de regiones específicas, tal como un sitio de unión o un sitio que confiere actividad catalítica. Sin embargo, muchas de estas regiones son difíciles de clonar en los vectores actuales, tales como los vectores circulares. Las regiones de codificación difíciles y los insertos grandes pueden ser la causa de la tensión superhelicoidal en los plásmidos circulares y pueden generar estructuras secundarias que son sustratos para la delección, particularmente en regiones que contienen numerosas repeticiones en tándem o invertidas. La transcripción de los promotores clonados también puede interferir con la estabilidad del plásmido.

Los vectores lineales proporcionan varias características deseables para el uso de plásmidos superenrollados circulares para la clonación. Los vectores lineales no están sujetos al superenrollamiento que se encuentra en los plásmidos circulares y pueden mantener de manera estable los insertos que tienen estructuras primarias o secundarias que son inestables cuando se superenrollan. Esta estabilidad adicional puede resultar en mejores datos de secuenciación y reducciones en el número de brechas de secuencia y brechas de clonación en los ensamblajes genómicos. Los vectores lineales también pueden exhibir la capacidad de clonar insertos más grandes usando métodos convencionales. Los sistemas de clonación de vectores lineales pueden clonar de manera estable un ácido nucleico, tal como el ADN, en el intervalo de 10 a más de 100 kb, sin el uso de los sistemas de empaquetamiento requeridos para la clonación de cósmidos. El concepto de usar un vector lineal para la clonación es similar al de un vector plasmídico lineal, que se describe, por ejemplo, en el documento WO 2007/087478 y en Godiska y col. (Nucleic Acids Research (2010), vol. 38, n.º 6), ambos incorporados expresamente en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Para crear un vector lineal a partir de un vector plasmídico lineal con un sitio de restricción de Bsal invertido único dentro de un sitio de clonación múltiple, se tuvo que eliminar una pluralidad adicional de sitios de Bsal. Por lo tanto, se usó un vector plasmídico lineal para sintetizar los plásmidos con varias longitudes de tramos codificantes de poli(A) (pEVL). El vector plasmídico lineal se usó para sintetizar un ácido nucleico que tiene un tramo de poli(T) de una longitud deseada y estos experimentos se describen con mayor detalle.

Los sistemas de clonación de vectores lineales se pueden usar para clonar secuencias de polinucleótidos difíciles que no se pueden clonar en vectores plasmídicos circulares convencionales. Por ejemplo, los vectores lineales pueden mantener fragmentos que son inestables en la forma de plásmido superenrollado. El modo lineal de replicación puede impartir una replicación de alta fidelidad de repeticiones, palíndromos grandes, ADN rico en AT y repeticiones altas, por ejemplo, una región rica en timina. Tal como se describe en la presente memoria, se puede usar un vector lineal para fabricar un polinucleótido que tenga una pluralidad de nucleótidos de timina unidos covalentemente (un tramo de poli(T)) y uno o más de los sitios de reconocimiento de endonucleasas anteriormente mencionados insertados en él o unidos a los mismos. El uso de un plásmido circular no puede soportar un molde para fabricar un tramo de poli(A) largo y los plásmidos disponibles comercialmente para transcribir un tramo de poli(A) se limitan normalmente a aproximadamente 30 adeninas. El uso de un plásmido linealizado, o un plásmido lineal, puede mejorar la transcripción de genes difíciles que son grandes y tienen muchas repeticiones. Un vector de clonación lineal puede incluir un telómero izquierdo y al menos un marcador seleccionable, un brazo derecho que comprende un telómero derecho y al menos un marcador seleccionable, y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. Tal como se describe en la presente memoria, el polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un telómero izquierdo y al menos un marcador seleccionable, un brazo derecho que comprende un telómero derecho y al menos un marcador

seleccionable, y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. Los telómeros se pueden usar para proteger los extremos del polinucleótido lineal contra la recombinación y la degradación. Los telómeros para vectores plasmídicos linealizados pueden incluir telómeros derivados de los bacteriófagos lambda N15, K02, PRD1 y PY54, y de cromosomas lineales de *Agrobacterium*, por ejemplo. Los “marcadores seleccionables”, tal como se describen en la presente memoria, se refieren a un gen introducido en un ácido nucleico para proteger una célula transformada de un factor específico en el entorno de crecimiento, y pueden ser un gen de resistencia a los antibióticos, un marcador metabólico o un marcador seleccionable. Los ejemplos de genes de resistencia a antibióticos que pueden residir en un polinucleótido de vector lineal pueden incluir, por ejemplo, kanamicina, ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol. Los marcadores metabólicos pueden incluir genes de síntesis de aminoácidos, por ejemplo, genes para la síntesis de trp. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el marcador seleccionable es un gen de resistencia a los antibióticos, un marcador metabólico o un marcador seleccionable. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un marcador metabólico. En algunas alternativas, el marcador metabólico comprende genes de síntesis de aminoácidos, por ejemplo, genes para la síntesis de trp. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un gen de resistencia a los antibióticos. En algunas alternativas, el gen de resistencia a los antibióticos es un gen resistente a la kanamicina, un gen resistente a la ampicilina, un gen resistente a la tetraciclina o un gen resistente al cloranfenicol. Las proteínas protelomerasas son enzimas responsables de la generación de horquillas cerradas en el ADN lineal. Los sitios diana de las protelomerasas pueden ser repeticiones invertidas. Las proteínas protelomerasas también pueden procesar un sitio objetivo, en donde el sitio diana puede tener un ADN simétrico de diádas. Las protelomerasas son una clase de proteínas únicas que funcionan para generar extremos en forma de horquilla cerrados covalentemente en el ADN. Estos extremos lineales de ADN están dispuestos de tal manera que una hebra gira y se convierte en la hebra complementaria. De este modo, estas moléculas de ADN lineales no tienen extremos libres o abiertos, y se espera que sean estables y no vulnerables a la degradación de la exonucleasa. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene un sitio diana para la protelomerasa. En algunas alternativas, el sitio diana tiene un sitio de ADN simétrico a la diáda. La función de la protelomerasa y los sitios para la unión de la protelomerasa se discuten en Godiska y col. (U.S. 9029134; incorporado por referencia en su totalidad).

Según un enfoque, un polinucleótido que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina se prepara dentro de un vector lineal. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan métodos para fabricar un ácido nucleico a partir de un polinucleótido lineal que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina y una endonucleasa dispuesta dentro de dicha pluralidad de nucleótidos de timina. Los métodos para mejorar la transcripción y la traducción utilizando dichas composiciones también son alternativas. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. El polinucleótido es un vector de clonación lineal, en donde el vector de clonación lineal comprende un telómero izquierdo y al menos un marcador seleccionable, un brazo derecho que comprende un telómero derecho y al menos un marcador seleccionable, y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho.

En algunas alternativas, se proporciona un polinucleótido lineal que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. El polinucleótido es un vector de clonación lineal, en donde el vector de clonación lineal comprende un telómero izquierdo

y al menos un marcador seleccionable, un brazo derecho que comprende un telómero derecho y al menos un marcador seleccionable, y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, un gen se clona en la región de clonación en donde el gen codifica una nucleasa. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricción de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, el polinucleótido comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525 o 550 residuos de timina unidos covalentemente dentro de la cadena molde. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS es una secuencia que se muestra en la **Tabla 1** y está invertida (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS es un sitio de reconocimiento de endonucleasa BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa BSAi está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene sólo un sitio de restricción de BsaI. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene un sitio de restricción de BsaI invertido. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen es de 10-50 kb. En algunas alternativas, el gen tiene 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 kb o cualquier longitud entre cualquiera de los dos valores anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el gen es de al menos 100 Kb. En algunas alternativas, el polinucleótido o vector que tiene la pluralidad de residuos de timina unidos covalentemente comprende solo un sitio de restricción de BsaI, de modo que dicho sitio de BsaI es único para un dominio conector definido por tener polímeros 5' y 3' de residuos de timina que flanquean dicho sitio de BsaI. En algunas alternativas, el polinucleótido o vector que tiene la pluralidad de residuos de timina unidos covalentemente comprende solo un sitio de restricción de BsaI, en donde el sitio de restricción de BsaI está invertido. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. El polinucleótido es un vector de clonación lineal, en donde el vector de clonación lineal comprende un telómero izquierdo y al menos un marcador seleccionable, un brazo derecho que comprende un telómero derecho y al menos un marcador seleccionable, y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En la presente memoria también se describen métodos para fabricar un polinucleótido que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasas para una endonucleasa insertada en el mismo, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El método de fabricación de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, proporcionar una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 covalentemente nucleótidos de timina unidos y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la mayor parte de la timina 5' (o timina en el extremo 5') en la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido

covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado dentro de 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 timinas unidas covalentemente o cualquier número de timinas entre cualquiera de los dos valores anteriormente mencionados. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, en donde el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina, lo que da como resultado una pluralidad de residuos de timina que pueden terminar en una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de Bsal, y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS está invertido. En algunas alternativas, el sitio de la endonucleasa de restricción de tipo IIS es un sitio de restricción de la endonucleasa de restricción de Bsal invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa comprende una secuencia de sitios de reconocimiento de endonucleasas expuesta en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de Bsal invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene sólo un sitio de restricción de Bsal. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 1, 5, 10, 20, 30, 40 o 50 Kb o cualquier número entre cualquiera de los dos valores anteriormente mencionados. En algunas alternativas, el gen es de al menos 100 Kb. En algunas alternativas, el gen es de 1-50 kb. En algunas alternativas, el polinucleótido o vector que tiene la pluralidad de residuos de timina unidos covalentemente comprende solo un sitio de restricción de Bsal, en donde el sitio de restricción de Bsal está invertido. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. El polinucleótido es un vector de clonación lineal, en donde el vector de clonación lineal comprende un telómero izquierdo y al menos un marcador seleccionable, un brazo derecho que comprende un telómero derecho y al menos un marcador seleccionable, y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

Amplificación por PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica usada para muchas aplicaciones biológicas e implica la amplificación de una o varias copias de un fragmento de un polinucleótido para generar miles o millones de copias de un ácido nucleico específico. La PCR puede producir múltiples copias de ADN. La PCR utiliza ciclos térmicos en los que varios ciclos de calentamiento y enfriamiento de la reacción dan como resultado la fusión del polinucleótido molde para la replicación, la replicación enzimática y la amplificación de copias del polinucleótido, lo que da como resultado miles o millones de copias del polinucleótido. El ciclo de fusión (de 90 °C a 105 °C), hibridación (5 °C por debajo de la temperatura de fusión del cebador) y amplificación (de 70 °C a 74 °C) se puede repetir de 12 a 35 veces y depende de la estabilidad del molde de polinucleótidos y los cebadores. La PCR puede requerir una ADN polimerasa termoestable, cebadores complementarios y nucleótidos. Los nucleótidos para la PCR pueden ser adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. Las ADN polimerasas para la PCR pueden ser una polimerasa termoestable que puede polimerizar el ADN a temperaturas de 90 °C a 105 °C. Las polimerasas termoestables pueden incluir, sin limitación, polimerasas Taq, polimerasas Taq de fusión que comprenden dominios que mejoran la procesividad, enzimas Taq modificadas genéticamente para alta fidelidad y rápida extensión, así como otras polimerasas termoestables conocidas por los expertos en la técnica.

La PCR de fusión también se puede usar para amplificar un ácido nucleico a partir de un molde de polinucleótido. Sin embargo, la PCR de fusión también se usa para extender la cadena nucleica amplificada en el extremo 5' o en el extremo 3', o para ambos extremos del ácido nucleico mediante el uso de cebadores extendidos. La PCR de fusión puede realizarse usando un cebador 5' y un cebador 3', en los que el cebador 5', el cebador 3' o ambos tienen una extensión de secuencias, así como un sitio que es complementario al molde de polinucleótido para la extensión. Por ejemplo, la PCR de fusión puede usarse para añadir una pluralidad adicional de nucleótidos de timina en el extremo 3' de una secuencia génica.

En la presente memoria se describen métodos para fabricar un ácido nucleico que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina unidos covalentemente (un tramo de poli(T)) y uno o más de los sitios de reconocimiento de endonucleasas anteriormente mencionados insertados en él o unidos a los mismos, así como composiciones que comprenden estos polinucleótidos y métodos de uso de los mismos. En algunas alternativas, los sitios de reconocimiento de endonucleasas están invertidos. En algunas alternativas, los sitios de reconocimiento de endonucleasas comprenden las secuencias de reconocimiento de endonucleasas expuestas en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es para la endonucleasa Acil, MnlI, AlwI, BbvI, BclI, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, BsrI, BtsCI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MboII, MlyI, PstI, SfaNI, AclI, BciVI, BfuAI, BmgBI, Bmrl, Bpml, BpuEI, BsaI, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, EciI, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, BaeI, BsaXI, CspCI, AfaI, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1I, R9529, Hsp92II, HspAI, MaeI, MaeII, MvnI, PalI, RsaNI, SetI, SgeI, Sse9I, TruI, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, XspI, AflI, AgsI, AspS9I, AsuC2I, AsuI, Bcefi, BcnI, BsiI, BslI, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BsiFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, Caull, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FaqI, FinI, Fsp4HI, Glul, Hin4II, HpyF3I, Itai, MaeIII, MspR9I, Mval, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, AauI, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AceIII, Acsi, AcvI, Acyl, AhII, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, AsuII, AsuNHI, AvaIII, AvII, BanIII, Baul, Bbel, BbrPI, Bbul, Bbv12I, BbvII, Bce83I, Bcol, Bcul, Bfml, BfrBI, BfrI, Bini, BmcAI, BmeT110I, Bmil, Bmul, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMII, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstACI, BstAFI, BstAUI, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSFI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, Bvel, CciI, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, DsaI, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoICRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, Egel, Ehel, ErhI, FauNDI, Fbal, FbII, FriOI, FunI, FunII, GdII, GsaI, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI, KspI, MflI, MhII, MIsI, MluNI, Mly113I, Mph1103I, MroI, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, MunI, Mvrl, NgoAIV, Nsbl, NspIII, NspV, PaeI, PagI, Paul, Pcel, Pfi23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, Psul, Rcal, Sdul, Sfr274I, Sfr303I, Sful, SgrBI, Slal, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, Vnel, XapI, XhoI, XmaCI, XmaIII, XmaJI, XmiI, XhoI, Zsp2I, AocI, Axyl, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CellI, Cpol, CspI, DralI, Eco065I, Eco81I, Eco91I, EspI, KfiI, LglI, Mabl, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, Saul, AbsI, CciNI, FspAI, MauBI, Mrel, MssI, Rgal, Sdal, SfaAI, Sgfi, Smil, Sse232I, Adel, Aspl, Cail, Psyl, Tell, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI, BstPAI, CjeNI, MamI, MroXI, OliI, Pdml, RseI, SmiMI, AccB7I, AspEI, BasI, BmeRI, BplI, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, Cjel, Cjul, Cjull, DriI, Eam1105I, EclHKI, Fail, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PfiBI, UbaF14I, XagI, Aasi, Bdal, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, Arsl, BarI, Pcsi o UbaF13I. En algunas alternativas, los sitios de reconocimiento de endonucleasas son específicos para una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa de restricción de tipo IIS es Acil, MnlI, AlwI, BbvI, BclI, BceAI, BsmAI, BsmFI, BspCNI, BsrI, BtsCI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, MboII, MlyI, PstI, SfaNI, AclI, BciVI, BfuAI, BmgBI, Bmrl, Bpml, BpuEI, BsaI, BseRI, BsgI, BsmI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BtgZI, BtsI, EarI, EciI, Mmel, NmeAIII, BbvCI, Bpu10I, BspQI, SapI, BaeI, BsaXI, CspCI, AfaI, AluBI, AspLEI, BscFI, Bsh1236I, BshFI, BshI, BsiSI, BsnI, Bsp143I, BspANI, BspFNI, BssMI, BstENII, BstFNI, BstHHI, BstKTI, BstMBI, BsuRI, CfoI, Csp6I, FaeI, Fail, FnuDII, FspBI, Glal, HapII, Hin1II, R9529, Hsp92II, HspAI, MaeI, MaeII, MvnI, PalI, RsaNI, SetI, SgeI, Sse9I, TruI, Tru9I, TscI, TspEI, TthHB8I, XspI, AflI, AgsI, AspS9I, AsuC2I, AsuI, Bcefi, BcnI, BsiI, BslI, Bme1390I, Bme18I, BmrFI, BscGI, BseBI, BsiLI, BsiZI, BsiFI, BsoMAI, BspNCI, Bst2UI, Bst71I, BstDEI, BstOI, BstSCI, Caull, CdiI, Cfr13I, Eco47I, EcoRII, FaqI, FinI, Fsp4HI, Glul, Hin4II, HpyF3I, Itai, MaeIII, MspR9I, Mval, NmuCI, Psp6I, PspPI, SatI, SinI, TscAI, VpaK11BI, AanI, AatI, AauI, Acc113I, Acc16I, AccB1I, AceIII, Acsi, AcvI, AhII, Alw21I, Alw44I, Ama87I, Aor51HI, AsiAI, AsnI, Asp718I, AspHI, AsuII, AsuNHI, AvaIII, AvII, BanIII, Baul, Bbel, BbrPI, Bbul, Bbv12I, BbvII, Bce83I, Bcol, Bcul, Bfml, BfrBI, BfrI, Bini, BmcAI, BmeT110I, Bmil, Bmul, BmyI, Bpu14I, BpvUI, Bsa29I, BsaOI, BsbI, BscBI, BscCI, Bse118I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BseSI, BseX3I, Bsh1285I, BshNI, BshTI, BshVI, BsiCI, BsiHKCI, BsiMI, BsiQI, BsiXI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp19I, Bsp68I, BspA2I, BspCI, BspGI, BspLU11I, BspMAI, BspMII, BspOI, BspT104I, BspT107I, BspTI, BspXI, BssAI, BssHI, BssNAI, BssNI, BssT1I, Bst1107I, Bst98I, BstACI, BstAFI, BstAUI, BstBAI, BstC8I, BstDSI, BstH2I, BstHPI, BstNSI, BstSFI, BstSLI, BstSNI, BstX2I, BstZI, BsuTUI, BtuMI, Bvel, CciI, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, Csp45I, CspAI, DinI, DrdII, DsaI, Ecl136II, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco88I, EcoICRI, EcoT14I, EcoT22I, EcoT38I, Egel, Ehel, ErhI, FauNDI, Fbal, FbII, FriOI, FunI, FunII, GdII, GsaI, HaeI, HgiAI, Hin1I, HindII, Hpy178III, Hpy8I, Hsp92I, Kpn2I, Ksp22I, KspAI, KspI, MflI, MhII, MIsI, MluNI, Mly113I, Mph1103I, MroI, MroNI, Msp20I, MspCI, MstI, MunI, Mvrl, NgoAIV, Nsbl, NspIII, NspV, PaeI, PagI, Paul, Pcel, Pfi23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspLI, PspN4I, Psul, Rcal, Sdul, Sfr274I, Sfr303I, Sful, SgrBI, Slal, SpaHI, SseBI, SspBI, SstI, SstII, SunI, TatI, Vha464I, Vnel, XapI, XhoI, XmaCI, XmaIII, XmaJI, XmiI, XhoI, Zsp2I, AocI, Axyl, Bpu1102I, Bse21I, Bsp1720I, BstPI, CellI, Cpol, CspI, DralI, Eco065I, Eco81I, Eco91I, EspI, KfiI, LglI, Mabl, PpuXI, Psp5II, PspEI, Rsr2I, Saul, AbsI, CciNI, FspAI, MauBI, Mrel, MssI, Rgal, Sdal, SfaAI, Sgfi, Smil, Sse232I, Adel, Aspl, Cail, Psyl, Tell, Asp700I, BoxI, Bse8I, BseJI, BsiBI, BsrBRI,

BstPAI, CjeNII, Maml, MroXI, Olil, Pdml, Rsel, SmiMI, AccB7I, AspEI, Basi, BmeRI, BpII, Bsc4I, BseLI, BsiYI, BstENI, BstMWI, Cjel, Cjul, Cjull, Dril, Eam1105I, EclHKL, Fall, HpyF10VI, NgoAVIII, NruGI, PflBI, UbaF14I, Xagl, Aasl, Bdal, Bsp24I, CjePI, DseDI, UbaF9I, Arsl, BarI, Pcsi o UbaF13I. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS está invertido y el sitio de escisión está invertido. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricción de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, el tramo de poli(T) del ácido nucleico se puede extender mediante PCR de fusión. En algunas alternativas, el tramo de poli(T) del ácido nucleico se puede extender en el extremo 5' de la cadena molde mediante PCR de fusión. En algunas alternativas, el tramo de poli(T) del ácido nucleico se puede extender en el extremo 3' mediante PCR de fusión. En algunas alternativas, el ácido nucleico se puede extender en los extremos 5' y 3' mediante PCR de fusión. En algunas alternativas, el ácido nucleico puede extenderse mediante una pluralidad de nucleótidos de timina en el extremo 3' mediante PCR de fusión.

En otras alternativas, se contempla un método para fabricar un ácido nucleico, en donde dicho método comprende proporcionar cualquiera de los polinucleótidos descritos anteriormente y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. El polinucleótido es un vector de clonación lineal, en donde el vector de clonación lineal comprende un telómero izquierdo y al menos un marcador seleccionable, un brazo derecho que comprende un telómero derecho y al menos un marcador seleccionable, y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, los cebadores pueden tener una secuencia de extensión en el extremo 5'. En algunas alternativas, los cebadores pueden tener una secuencia de extensión en el extremo 3'. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende una ADN polimerasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen es de 1-50 kb. En algunas alternativas, el gen comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 1, 5, 10, 20, 30, 40 o 50 Kb. En algunas alternativas, el ARNm comprende una cola de poli A, en donde dentro de dicha cola de poli A existe una secuencia que es complementaria a un sitio de endonucleasa (en la cadena sencilla), tal como el sitio Stul o BsaI. Una secuencia complementaria al sitio de reconocimiento de endonucleasa puede residir en el ARNm si no se proporciona una endonucleasa para escindir el polinucleótido antes de la transcripción. En algunas alternativas, la secuencia es complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa establecido en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, se proporciona un ARNm que comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde el ARNm comprende una primera secuencia que comprende al menos una secuencia complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la segunda secuencia

de ácido nucleico comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina y en donde la primera secuencia está unida covalentemente a la segunda secuencia de ácido nucleico en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina. En algunas alternativas, el ARNm codifica además un gen. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa, tal como Cas9 o un derivado del mismo o un fragmento activo del mismo, una TALEN o MegaTAL, véase, por ejemplo, **Id. de sec. n.º 6-14**. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa está invertido, y en donde la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento del sitio de endonucleasa invertido. En algunas alternativas, la al menos una endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de Bsal. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de Stul. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en una célula de mamífero, tal como una célula humana. En algunas alternativas, la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento de un sitio de reconocimiento de endonucleasa expuesto en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa tal como se muestra en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632) es una secuencia invertida. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

Transcripción *in vivo* e *in vitro*.

La transcripción *in vitro* e *in vivo* puede proporcionar la capacidad de sintetizar ARN que es fundamental para muchas técnicas biológicas. Por ejemplo, la transcripción *in vivo* e *in vitro* puede generar sondas de ARN marcadas radiactivamente y no isotópicamente que se pueden usar en hibridaciones por transferencia, ensayos de protección de nucleasas, así como ARN que se puede usar en la traducción para generar una proteína específica.

La transcripción *in vitro* requiere un molde de ADN lineal purificada que contenga un promotor de la ARN polimerasa, trifosfatos o nucleótidos de ribonucleótidos, un sistema tampón que incluya iones de magnesio y DTT y una ARN polimerasa apropiada. Las condiciones exactas usadas en la reacción de transcripción dependen de la cantidad de ARN necesaria para una aplicación específica. Se pueden usar protocolos de laboratorio básicos para la transcripción *in vitro*, así como kits comerciales, para sintetizar ácidos nucleicos, por ejemplo, ARN. Los kits comerciales para sintetizar ARN pueden incluir, por ejemplo, los kits MEGAscript (Life Technologies), el kit de transcripción de alto rendimiento TranscriptAid T7 (Thermo Scientific), el kit de transcripción *in vitro* HiScribe y MiniV™ (Epicentre). Pueden usarse otros kits de transcripción para producir ARN y son conocidos por los expertos en la técnica. El protocolo para la generación de ARN puede requerir moldes de polinucleótidos lineales de cualquier longitud que posean una región promotora de ARN y, preferiblemente, se pueden producir de 1 a aproximadamente 5 moles de ácido nucleico o ARN por mol de molde de polinucleótido. Las ARN polimerasas pueden incluir ARN polimerasa SP6, ARN polimerasa T7, ARN polimerasa II N4 y ARN polimerasas T3. La transcripción de un ARN puede realizarse a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. La transcripción también puede realizarse durante un tiempo de al menos, mayor de, igual a, o cualquier tiempo entre 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas. En algunas alternativas, las transcripciones de ARN pueden tener al menos, más de, igual a, o cualquier tamaño entre 0,5, 1, 2, 3, 4 o 5 Kb. El uso de un plásmido lineal puede estabilizar el gen para que se transcriba fácilmente, especialmente si el gen tiene dificultades para clonarse en plásmidos circulares superenrollados. En algunas alternativas, la transcripción del ARN se puede estabilizar a 30 °C - 37 °C durante al menos 100 horas usando el polinucleótido de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria para la transcripción. El transcrito de ARN o el ARNm con un tramo de poli(A) extendido puede usarse con éxito para la transfección, en donde el ARNm está protegido (por ejemplo, tapado) y puede mantenerse para la traducción *in vivo*. El ARN transcrito de un polinucleótido puede comprender un tramo de poli(A) que termina en guanina, citosina o uracilo. Si bien el ARNm natural comprende una secuencia de poliadenilación en la UTR 5' y/o UTR 3' de cada ARNm natural, una parte de la cual permanece en el ARNm, los ARNm fabricados según las enseñanzas descritas en la presente memoria no necesitan ni contienen dichas secuencias de poliadenilación de UTR

5' y/o UTR 3'. Por consiguiente, los ARNm elaborados según las enseñanzas descritas en la presente memoria no son ARNm de origen natural en virtud del hecho de que carecen de dichas secuencias de poliadenilación de 5'UTR y/o 3'UTR. Además, en varias alternativas, se añade guanilación o diguanilación a la secuencia de poli(A), preferiblemente en los extremos terminales, lo que puede proporcionar una estabilidad y una duración de expresión prolongadas. Además, algunos ARNm alternativos descritos en la presente memoria tienen codones optimizados para la expresión en seres humanos y los ARNm alternativos descritos en la presente memoria contienen colas de poli(A) que son más largas que los ARNm de origen natural para la secuencia particular. Por lo tanto, los ARNm fabricados según las enseñanzas descritas en la presente memoria no son ARNm de origen natural.

En algunas alternativas, los ARNm pueden comprender un gen. En este aspecto, pueden diseñarse muchos genes sintéticos para aumentar su nivel de expresión de proteínas. El proceso de diseño de la optimización de codones puede consistir en alterar codones raros por codones conocidos por aumentar la máxima eficiencia de expresión de proteínas. En algunos casos, se describe la selección de codones, en donde la selección de codones puede realizarse mediante el uso de algoritmos conocidos por los expertos en la técnica para crear transcripciones genéticas sintéticas optimizadas para un alto rendimiento proteico. Los expertos en la técnica conocen los programas que contienen algoritmos para la optimización de codones. Los programas pueden incluir, por ejemplo, algoritmos OptimumGene™, GeneGPS®, etc.

En la presente memoria se describen métodos para fabricar un ácido nucleico que tiene un polímero de nucleótidos de timina unidos covalentemente, que se puede extender hasta una longitud deseada en virtud de la presencia de un sitio de endonucleasa dentro de dicho polímero de nucleótidos de timina unidos covalentemente, de modo que un inserto de poli(T) de una longitud deseada se puede ligar al ácido nucleico que tiene el polímero de nucleótidos de timina unidos covalentemente y el sitio de endonucleasa se extiende así el tramo de poli(T) a la longitud deseada. Algunas alternativas incluyen métodos para fabricar un polinucleótido que tenga una pluralidad de nucleótidos de timina y un sitio de reconocimiento de endonucleasa dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos o varios nucleótidos dentro un intervalo definido por dos de los valores anteriormente mencionados del primer residuo de timina de un dominio de poli(T), pero configurado o espaciado para permitir la escisión enzimática dentro del dominio de poli(T). Después de la escisión enzimática y el ligamiento a un segundo polímero de nucleótidos de timina, este ácido nucleico resultante puede transcribirse a continuación para generar un ARN que tenga un tramo de poli(A) de la longitud deseada, por ejemplo, la longitud del polímero de poli(T) después del ligamiento con un inserto de poli(T). Por consiguiente, en algunas alternativas, los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir la etapa de poner en contacto un ácido nucleico que tiene un polímero de nucleótidos de timina unidos covalentemente, incluido un inserto de poli(T) colocado en un sitio de escisión de endonucleasa dentro del polímero de nucleótidos de timina unidos covalentemente o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos o varios nucleótidos dentro de un intervalo definido por dos de los valores anteriormente mencionados del primer residuo de timina de un dominio de poli(T) con una polimerasa en presencia de nucleótidos. En algunas alternativas, dicho ácido nucleico o polinucleótido comprende además un promotor para una ADN o ARN polimerasa. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la ARN polimerasa es la ARN polimerasa SP6, la ARN polimerasa T7, la ARN polimerasa II N4 o la ARN polimerasa T3. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, igual a, o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII).

En la presente memoria se describen métodos para estabilizar un ARN a 30 °C - 37 °C durante la traducción durante al menos 100 horas, el ARN generado a partir de un polinucleótido que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina unidos covalentemente (un tramo de poli(T)) y uno o más de los sitios de reconocimiento de endonucleasas anteriormente mencionados insertados en él o unidos a los mismos, así como composiciones que comprenden estos polinucleótidos. Los métodos para estabilizar el ARN durante la transcripción pueden realizarse durante al menos, más de, igual o un tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). En algunas alternativas, un ARNm comprende una cola de poli A, en donde dentro de dicha cola de poli A existe una secuencia que es complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa (en la cadena sencilla), tal como el sitio Stul o Bsal. En algunas alternativas, una secuencia que es complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa expuesto en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento está invertido. En algunas alternativas, el ARNm comprende una primera secuencia que codifica un complemento de ARN para al menos un sitio de endonucleasa (en la cadena sencilla), en donde la secuencia que codifica el complemento de ARN está unida covalentemente a un segundo ácido nucleico, en donde el segundo ácido nucleico comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, y en donde dicha primera secuencia que codifica un complemento de ARN a al menos un sitio

de endonucleasa de dicho primer ácido nucleico está unida covalentemente a dicho segundo ácido nucleico que comprende la pluralidad de nucleótidos de adenina en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina de dicho segundo ácido nucleico. En algunas alternativas, el ARNm comprende o codifica además un gen. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en una célula de mamífero, tal como una célula humana. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa, tal como Cas9, TALEN o MegaTAL, véase, por ejemplo, **Id. de sec. n.º. 6-14**). En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa está invertido, y en donde la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento del sitio de endonucleasa invertido (en la cadena sencilla). En algunas alternativas, la al menos una endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de BsaI. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de Stul. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa para una endonucleasa tal como se indica en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAI está invertido.

El método puede comprender proporcionar el polinucleótido lineal de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y poner en contacto dicho ácido nucleico con un ribosoma, en presencia de aminoácidos y ARNt, en donde dicho ARN es estable a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas) o dentro de un intervalo definido por cualquiera de los dos anteriormente mencionados. veces). En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura igual a 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, igual a, o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). En algunas alternativas, el ARN comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen es de 1-50 kb. En algunas alternativas, el gen comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 1, 5, 10, 20, 30, 40 o 50 Kb. En algunas alternativas, el ARNm comprende una cola de poli A, en donde dentro de dicha cola de poli A existe una secuencia que es complementaria a un sitio de endonucleasa (en la cadena sencilla) tal como el sitio Stul o BsaI. En algunas alternativas, dentro de dicha cola de poli A existe una secuencia que es complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa como se indica en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, la secuencia que es complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa es complementaria al sitio de reconocimiento de endonucleasa invertido. En algunas alternativas, el ARNm comprende una primera secuencia que codifica un complemento de ARN para al menos un sitio de endonucleasa (en la cadena sencilla), en donde la secuencia que codifica el complemento de ARN está unida covalentemente a una pluralidad de nucleótidos de adenina en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina. En algunas alternativas, el ARNm comprende o codifica además un gen. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en una célula de mamífero, tal como una célula humana. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa, tal como Cas9, un derivado del mismo o un fragmento activo del mismo, TALEN o MegaTAL, por ejemplo, las **Id. de sec. n.º. 6-14**. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa está invertido, y en donde la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento del sitio de reconocimiento de endonucleasa invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa invertido es un sitio de reconocimiento de endonucleasa expuesto en las secuencias de la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, la al menos una endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de BsaI. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de Stul. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas,

la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido.

Traducción.

La síntesis de proteínas puede realizarse *in vitro* así como *in vivo*. Para la síntesis *in vivo*, las proteínas se pueden sintetizar en células procariotas o eucariotas. La síntesis de proteínas *in vivo* puede controlarse mediante la longitud de la cola poli(A) del ARNm, lo que puede aumentar la semivida del ARNm y garantizar la traducción de una mayor concentración de proteína. Un ARNm con un extremo 3' protegido puede ser suficiente para la transfección y la traducción *in vivo* sostenida. En condiciones de crecimiento normales, un ARNm con un tramo de poli(A) mantenido de manera estable puede ser suficiente para la traducción a una temperatura de 30 °C a 37 °C durante al menos, más, igual o un tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos antes mencionados).

La síntesis *in vitro* de proteínas en extractos libres de células es una herramienta importante para los biólogos moleculares y tiene una variedad de aplicaciones, incluida la identificación rápida de productos génicos, la localización de mutaciones mediante la síntesis de productos génicos truncados, los estudios de plegamiento de proteínas y la incorporación de aminoácidos modificados o no naturales para estudios funcionales. El uso de sistemas de traducción *in vitro* puede tener ventajas sobre la expresión génica *in vivo* cuando el producto sobreexpresado es tóxico para la célula huésped, cuando el producto es insoluble o forma cuerpos de inclusión, o cuando la proteína sufre una rápida degradación proteolítica por parte de las proteasas intracelulares. En principio, debería ser posible preparar un extracto exento de células para la traducción *in vitro* de los ARNm de cualquier tipo de células. En la práctica, solo se han desarrollado unos pocos sistemas libres de células para la síntesis de proteínas *in vitro*.

Los sistemas de traducción *in vitro* pueden realizarse usando lisados celulares tratados en los que la maquinaria de traducción se usa para traducir una proteína de un ARNm purificado, y pueden incluir un lisado bacteriano tratado (es decir, sistemas libres de células de *E. coli*), extracto de germen de trigo, lisado de reticulocitos de conejo o incluso un lisado disponible en el mercado tratado específicamente para la traducción *in vitro*, por ejemplo. Los kits de traducción pueden incluir Retic Lysate IVT™ (Life Technologies), un sistema de traducción *in vitro* humano de 1 etapa (Thermo Scientific) y otros kits conocidos por los expertos en la técnica. Además, también hay kits de transcripción/traducción *in vitro* acoplados que se pueden usar para producir proteínas a partir del punto de partida de un ADN. El lisado celular tratado para la traducción *in vitro* debe contener componentes esenciales de la maquinaria de traducción celular, tales como los ribosomas, los factores de iniciación y alargamiento, los ARNt y otros componentes básicos necesarios para la síntesis de proteínas, que son conocidos por los expertos en la técnica. En algunas alternativas, la traducción se realiza con un sistema *in vitro*. El sistema *in vitro* puede comprender ribosomas, factores de iniciación y alargamiento, ARNt y otros componentes básicos necesarios para la síntesis de proteínas, tales como, por ejemplo, aminoácidos. Cuando se complementan con proteínas accesorias patentadas, ATP y un sistema de regeneración de energía, los extractos celulares tratados pueden mantener la síntesis de las proteínas diana a partir de los moldes de ARNm durante un máximo de 6 a 100 horas sin la necesidad de eliminar los subproductos inhibidores. Los métodos para la traducción *in vitro* pueden realizarse a temperaturas entre 30 °C y 37 °C. Sin embargo, la eficacia de la traducción también puede depender de la longitud del ARNm, la capa de ARNm y la cola de poli(A). La eficacia de la traducción puede depender de la longitud de la cola de poli(A) en donde una cola de poli(A) de 75 a 300 adeninas se une covalentemente tanto *in vivo* como *in vitro*.

En la presente memoria se describen métodos para aumentar la expresión de una proteína a partir de un ARNm generado a partir de un polinucleótido que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina unidos covalentemente (un tramo de poli(T)) y uno o más de los sitios de reconocimiento de endonucleasas anteriormente mencionados insertados en él o unidos a los mismos, así como composiciones que comprenden estos polinucleótidos. El método comprende generar un ARNm a partir del polinucleótido de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y traducir dicho ARNm en un péptido. En algunas alternativas, el ARNm comprende una cola de poli A, en donde dentro de dicha cola de poli A existe una secuencia que es complementaria a un sitio de endonucleasa (en la cadena sencilla), tal como el sitio Stul o Bsal. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa para una endonucleasa tal como se indica en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, el ARNm comprende una primera secuencia que codifica un complemento de ARN para al menos un sitio de endonucleasa (en la cadena sencilla), en donde la secuencia que codifica el complemento de ARN está unida covalentemente a una pluralidad de nucleótidos de adenina en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina. En algunas alternativas, el ARNm comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en una célula de mamífero, tal como una célula humana. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa, tal como Cas9, un derivado del mismo o un fragmento activo del mismo, TALEN o MegaTAL, por ejemplo, las **Id. de**

sec. n.º. 6-14. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa está invertido, y en donde la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento del sitio de endonucleasa invertido. En algunas alternativas, la al menos una endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de Bsal. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de Stul. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa para una endonucleasa tal como se indica en la Tabla 1 (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, la traducción se realiza a una temperatura al menos, mayor a, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la traducción se realiza durante al menos, más de, igual a, o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). En algunas alternativas, ARNm comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen es de 1-50 kb. En algunas alternativas, el método se lleva a cabo *in vivo*. En algunas alternativas, el método se lleva a cabo *in vitro*. En algunas alternativas, la traducción se realiza en células bacterianas. En algunas alternativas, la traducción se realiza en células eucariotas. En algunas alternativas, la traducción se realiza en células de mamíferos. En algunas alternativas, la traducción se realiza en células humanas. En algunas alternativas, la traducción se realiza en células hematopoyéticas CD34+ humanas. En algunas alternativas, la traducción se realiza en células T primarias humanas. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido.

ARNm terapéutico.

Hay muchas maneras de introducir un ácido nucleico en una célula. La transfección es un método para introducir un ácido nucleico en una célula. Puede introducirse un ácido nucleico en células eucariotas mediante métodos virales y no virales. El material genético, tal como el ADN plasmídico superenrollado, los constructos de ARNip y el ARNm, puede usarse para la transfección. Sin ser limitativos, pueden realizarse ejemplos de métodos de transfección basados en productos químicos usando Lipofectamine®, ciclodextrina, polímeros, liposomas, nanopartículas, coprecipitación con fosfato de calcio, dietilaminoetil-dextrano, DEAE-dextrano, polietilenimina o reactivos de transfección basados en lípidos catiónicos. Sin ser limitativos, los ejemplos de métodos de transfección no químicos pueden incluir la electroporación, la compresión celular, la administración hidrodinámica, la transfección óptica y la sonoporación. Como tal, existen numerosas formas de introducir un ácido nucleico en una célula, sin embargo, muchos de estos protocolos tienen limitaciones.

La administración de ADN desnudo a una célula puede tener varios inconvenientes, tales como la integración, además de ser tóxico para una célula. El uso de partículas virales para suministrar ADN también puede tener las desventajas de la mutagénesis por integración, así como de la introducción de elementos repetitivos. Sin embargo, el uso de ARN para la transfección, tal como un ARN modificado que comprende una cola de poli(A) de longitud controlada, puede tener la característica deseada de poder introducirse en una célula para la traducción controlada de una proteína sin integrarse en el genoma celular o sin tener los efectos de toxicidad similares al ADN. Además, dado que la cola de poli(A) controla la degradación, el ARNm puede usarse durante un tiempo controlado.

El ARN mensajero (ARNm) desempeña un papel fundamental e integral en todas las células vivas, ya que los ARNm son portadores de información genética y modelos para las proteínas durante la traducción. El ARNm permite la expresión transitoria de proteínas en todos los tipos de células y tiene muchas ventajas, especialmente sobre el ADN, para la transferencia de genes y la expresión de las moléculas diana. El ARNm no requiere localización ni transcripción nuclear y, por lo tanto, es una biomolécula muy segura. Además, el ARNm proporciona una enorme flexibilidad con respecto a la producción y la aplicación porque cualquier proteína con una secuencia conocida puede codificarse y expresarse.

Actualmente, los ARNm se están investigando como una nueva clase de tratamiento en áreas como las vacunas contra el cáncer, las vacunas profilácticas para enfermedades infecciosas y como fuente de productos genéticos terapéuticos y terapias de reemplazo de proteínas.

El ARNm puede aplicarse como molécula de administración de genes o ARNm terapéutico en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer y la investigación biomédica basada en células madre como alternativa al ADN plasmídico. El ARNm tiene varias ventajas, como la falta de requisitos de entrada nuclear, lo que representa una barrera significativa para la administración del ADN, especialmente en las células que no se dividen. El ARNm tampoco se integra en el

genoma del huésped, lo que evita la transcripción y expresión aberrantes de los oncogenes causadas por mutagénesis de inserción. La administración de ADN a una célula también puede ser más tóxica que la administración de ARNm.

Sin embargo, en estudios anteriores se demostró que las moléculas de ARNm desnudas no eran eficaces para inducir la maduración de las células presentadoras de antígenos o para aumentar la traducción de un gen específico. Sin embargo, el ARNm que se protege de manera eficiente puede prevenir o ralentizar la degradación mediada por la ARNasa. Tal como se describió, el uso de un ARNm estabilizado que puede producirse fácilmente puede utilizarse como un ARNm terapéutico para la producción de proteínas. Como fármaco, un ARNm estabilizado puede proporcionar las instrucciones biológicas para producir una proteína dentro de las células, especialmente para una persona que tiene un trastorno genético. El ARNm terapéutico también sería más eficiente que la terapia génica basada en el ADN (que requeriría que las células produjeran su propio intermediario de ARNm antes de producir una proteína) y más eficaz que la terapia con proteínas recombinantes.

El ARNm terapéutico puede usarse para la expresión de endonucleasas, enzimas de procesamiento de extremos y proteínas de fusión que tienen actividad de endonucleasa y procesamiento de extremos. Las nucleasas son enzimas capaces de escindir los enlaces fosfodiéster entre las subunidades de nucleótidos de los ácidos nucleicos. Los ejemplos de nucleasas pueden incluir, pero no se limitan a, Cas9 (por ejemplo, **Id. de sec. n.º 6-14**), TALEN y MegaTAL. La Cas9 (proteína 9 asociada a CRISPR) es una enzima endonucleasa del ADN guiada por ARN asociada al sistema de inmunidad adaptativa CRISPR (repeticiones palindrómicas agrupadas regularmente intercaladas) en bacterias, por ejemplo, *Streptococcus pyogenes*, entre otras bacterias. *S. pyogenes* puede utilizar Cas9 para memorizar y luego interrogar y escindir ADN extraño, tales como el ADN de bacteriófagos invasores o el ADN plasmídico. Cas9 realiza este interrogatorio desenrollando el ADN extraño y comprobando si es complementario a la región espaciadora de 20 pares de bases del ARN guía. Las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) son enzimas de restricción artificiales generadas mediante la fusión de un dominio de unión al ADN efector TAL con un dominio de escisión del ADN. MegaTAL es una fusión de una meganucleasa con un efector TAL, es una nueva clase de ADN que se dirige a las endonucleasas con mayor actividad y especificidad. El ARNm terapéutico puede introducirse en una célula y la célula puede administrarse directamente a un paciente para la escisión dirigida de una secuencia de ADN y para aplicaciones terapéuticas o profilácticas, por ejemplo, cáncer, isquemia, retinopatía diabética, degeneración macular, artritis reumatoide, psoriasis, infección por VIH, anemia falciforme, enfermedad de Alzheimer, distrofia muscular, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad vascular, fibrosis quística, accidente cerebrovascular, síndrome de hiperIGE, o hemofilia. En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden ARNm terapéutico. En algunas alternativas, las composiciones descritas en la presente memoria (por ejemplo, el ARNm terapéutico que codifica endonucleasas, enzimas de procesamiento de extremos y proteínas de fusión que tienen actividad de endonucleasa y procesamiento de extremos) pueden usarse en métodos para tratar, prevenir, mejorar o inhibir una enfermedad (por ejemplo, cáncer, isquemia, retinopatía diabética, degeneración macular, artritis reumatoide, psoriasis, infección por VIH, anemia falciforme, distrofia diabética, degeneración macular, artritis reumatoide, psoriasis, infección por VIH, anemia falciforme, enfermedad de Alzheimer, distrofia muscular, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad vascular, fibrosis quística, accidente cerebrovascular, síndrome de hiper-IGE o hemofilia) o mejorar una afección o síntoma asociado con una enfermedad, tal como el cáncer, la isquemia, la retinopatía diabética, la degeneración macular, la artritis reumatoide, la psoriasis, la infección por el VIH, la anemia falciforme, la enfermedad de Alzheimer, la distrofia muscular, las enfermedades neurodegenerativas, la enfermedad vascular, la fibrosis quística, el accidente cerebrovascular, el síndrome de hiperIGE o la hemofilia. En algunas alternativas, el ARNm terapéutico que codifica endonucleasas, enzimas de procesamiento final o proteínas de fusión que tienen actividad endonucleasa y de procesamiento final, se administra para tratar, prevenir, mejorar o inhibir una enfermedad autosómica dominante, como la acondroplasia, la pseudoacondroplasia, las displasias epifisarias múltiples, las condrodisplasias, la osteogénesis imperfecta, el síndrome de Marfan, la polidactilia, las neuropatías sensoriales motoras hereditarias I y II (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth), distrofia miotónica, o neurofibromatosis o mejorar una afección o síntoma asociado a una enfermedad autosómica dominante, como la acondroplasia, la pseudoacondroplasia, las displasias epifisarias múltiples, las condrodisplasias, la osteogénesis imperfecta, el síndrome de Marfan, la polidactilia, las neuropatías sensoriales motoras hereditarias I y II (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth), la distrofia miotónica o la neurofibromatosis. En algunas alternativas, el ARNm terapéutico que codifica endonucleasas, enzimas de procesamiento de extremos o proteínas de fusión que tienen actividad de endonucleasa y procesamiento de extremos, se introduce en las células. En algunas alternativas, las células se administran para tratar, prevenir, mejorar o inhibir una enfermedad causada por la mala regulación de los genes. En algunas alternativas, el ARNm terapéutico que codifica endonucleasas, enzimas de procesamiento de extremos o proteínas de fusión que tienen actividad de endonucleasa y procesamiento final, se administra para tratar, prevenir o inhibir un cáncer, tales como BCL-2, BCL-XI y FLIP, o para mejorar una enfermedad o síntoma asociado con un cáncer, tal como BCL-2, BCL-XI y FLIP, por ejemplo, aumentando la tasa de mutación de los genes con actividad antiapoptótica.

En algunas alternativas, se proporciona una composición, que no forma parte de la invención, en donde la composición comprende un ARN terapéutico de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y un vehículo farmacéutico. En algunas alternativas, dicha composición se administra a un sujeto necesitado.

En algunas alternativas, el ARNm comprende una cola de poli A, en donde dentro de dicha cola de poli A o yuxtapuesta a la misma existe una secuencia que es complementaria a un sitio de endonucleasa (en la cadena sencilla), tal como el sitio *StuI* o *BsaI*. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa para una endonucleasa tal como se indica en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, el ARNm comprende una primera secuencia que codifica un complemento de ARN para al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa (en la cadena sencilla), en donde la secuencia que codifica el complemento de ARN está

unida covalentemente a una pluralidad de nucleótidos de adenina en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina. En algunas alternativas, el ARNm comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en una célula de mamífero, tal como una célula humana. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa, tal como Cas9 o un derivado del mismo o un fragmento activo del mismo, TALEN o MegaTAL, por ejemplo, las **Id. de sec. n.º. 6-14**. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido, y en donde la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento del sitio de reconocimiento de endonucleasa invertido. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa para una endonucleasa tal como se indica en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa para una endonucleasa tal como se indica en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636), y el sitio de reconocimiento está invertido. En algunas alternativas, la al menos una endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de Bsal. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de Stul. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido.

En la presente memoria se describen métodos para fabricar un ácido nucleico para terapia, el ácido nucleico generado a partir de un polinucleótido lineal que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina unidos covalentemente (un tramo de poli(T)) y uno o más de los sitios de reconocimiento de endonucleasas anteriormente mencionados insertados en él o unidos a los mismos. En algunas alternativas, el ácido nucleico es adecuado o está configurado para la terapia y dichos constructos se administran a un sujeto que lo necesite. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína que tiene eficacia terapéutica. En algunas alternativas, el sujeto padece un trastorno genético o necesita una vacuna. En algunas alternativas, el sujeto padece cáncer o una enfermedad viral. En algunas alternativas, el ácido nucleico se administra mediante una molécula de suministro de genes, tal como un plásmido viral, electroporación o ambos. En algunas alternativas, el ácido nucleico es una vacuna de ARNm o ADN. En algunas alternativas, el ARNm es un ARNm terapéutico para la terapia. En algunas alternativas, el ARNm comprende una cola de poli A, en donde dentro de dicha cola de poli A existe una secuencia que es complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa (en la cadena sencilla) tal como el sitio Stul o Bsal. En algunas alternativas, la secuencia que es complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa para una endonucleasa tal como se indica en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, la secuencia que es complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa para una endonucleasa tal como se indica en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636) y está invertido. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido.

En algunas alternativas, el ARNm comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde el ARNm comprende una primera secuencia que comprende al menos una secuencia complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa unido covalentemente a una pluralidad de nucleótidos de adenina en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina. En algunas alternativas, el ARNm codifica además un gen. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa, tal como Cas9, un derivado del mismo o un fragmento activo del mismo, TALEN o MegaTAL, por ejemplo, las **Id. de sec. n.º. 6-14**. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa está invertido, y en donde la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento del sitio de endonucleasa invertido. En algunas alternativas, la secuencia que es complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa para una endonucleasa tal como se indica en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636). En algunas alternativas, la secuencia que es complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa para una endonucleasa tal como se indica en la **Tabla 1** (Id. de sec. n.º: 18-632, 634-636) y está invertido. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de BSAi. En algunas alternativas, el al

menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento Stul. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en una célula de mamífero, tal como una célula humana. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido.

Las alternativas adicionales incluyen un polinucleótido que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasas para una endonucleasa insertada en el mismo. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un quinto ácido nucleico, en donde el quinto ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad polinucleotídica de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 timinas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de Bsal. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la ADN polimerasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una región promotora de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una sexta secuencia, en donde la sexta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un

sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un método para fabricar un polinucleótido lineal que tiene una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en el mismo, y en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además telómeros. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende un brazo izquierdo en donde el brazo izquierdo comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho en donde el brazo derecho comprende un telómero derecho y una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un quinto ácido nucleico, en donde el quinto ácido nucleico comprende un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa es una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 timinas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ADN polimerasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, una citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una sexta secuencia, en donde la sexta secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de

escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de *StuI*, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y *StuI* se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es *StuI*. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de *StuI* está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de *BsaI* y la endonucleasa es *BsaI*. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de *BSA*i está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

Un método para fabricar un ácido nucleico que comprende proporcionar el polinucleótido lineal de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la mayor distancia de timina 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, se proporciona un método para elaborar un ácido nucleico, en donde el ácido nucleico comprende proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado mediante cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y poniendo en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor para una ADN o ARN polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa *Taq*. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, igual a, o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es *BsaI* o *StuI*. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de

especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un ácido nucleico fabricado mediante un método de una cualquiera de las alternativas de la presente memoria. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ADN. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas el ácido nucleico comprende además un gen. En algunas alternativas el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan en una guanina, citosina, timina o uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

Un método para mejorar la transcripción de un gen, que no forma parte de la invención, que comprende proporcionar el polinucleótido lineal de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria, en donde dicho polinucleótido comprende además un gen, y poner en contacto dicho polinucleótido con una ARN polimerasa en presencia de nucleótidos. El método comprende proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, o el polinucleótido fabricado por cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una ARN polimerasa en presencia de nucleótidos. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o Stul. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, el método se realiza durante al menos, más de, igual a, o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas

alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

También se contempla un método para estabilizar un ARN durante la traducción a 30 °C - 37 °C durante al menos 100 horas, en donde el método comprende proporcionar el polinucleótido de una cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y poner en contacto dicho ácido nucleico con un ribosoma, en presencia de aminoácidos y ARNt, en donde dicho ARN es estable a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas (por ejemplo, al menos o igual a 1, 5, 10, 20, 30), 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). En algunas alternativas, se proporciona un método para estabilizar un ARN durante la traducción *in vitro* a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas, en donde el método comprende proporcionar el ácido nucleico de cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria o un ácido nucleico fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y poner en contacto dicho ácido nucleico con un ribosoma, en presencia de aminoácidos y ARNt, en donde dicho ARN es estable a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos antes mencionados). En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura igual a 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, igual a, o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen codifica una proteína para la terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, las adeninas unidas covalentemente terminan con una guanina, una citosina, una timina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAI está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

También se contempla un método para estabilizar un ARN durante la traducción *in vivo* a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas en una célula. El método puede comprender transfectar en una célula el ácido nucleico de una cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria o un ácido nucleico fabricado mediante un método de una cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria, colocar la célula en un recipiente de cultivo con medio, suministrar a la célula nutrientes y aminoácidos para la traducción e incubar la célula durante al menos 100 horas para permitir la traducción. En algunas alternativas, el ARNm carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa,

tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo como que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

También se contemplan métodos para aumentar la expresión de una proteína que comprenden generar un ARNm a partir del polinucleótido de una cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria o a partir de un polinucleótido lineal fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y traducir dicho ARNm en un péptido. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, la etapa de traducción comprende además proporcionar una ARN polimerasa. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa de restricción de tipo IIS es BsaI o Stul. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, la traducción se realiza a una temperatura al menos, mayor a, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la traducción se realiza durante al menos, más de, igual a, o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ARN comprende además un gen que codifica una proteína. En algunas alternativas, la proteína es una proteína para terapia. En algunas alternativas, el gen codifica una nucleasa. En algunas alternativas, el gen codifica una endonucleasa. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, la traducción se realiza a una temperatura al menos, mayor a, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la traducción se realiza durante al menos, más de, igual a, o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). En algunas alternativas, el ARNm comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el ARNm carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias

requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un método para mejorar la estabilidad de un gen replicante, que no forma parte de la invención, en donde el método comprende proporcionar el polinucleótido lineal de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante cualquier método de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria, en donde dicho polinucleótido comprende además un gen, la transformación de una célula con dicho polinucleótido y la propagación de la célula, en donde el polinucleótido se replica. En algunas alternativas, la célula se propaga durante 1 día, 2 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 12 días, 14 días, o cualquier otro momento entre estos valores. En algunas alternativas, la célula se propaga a 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C o cualquier otra temperatura entre cualquiera de estos valores. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un polinucleótido lineal que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El polinucleótido lineal es tal como se define en la reivindicación 1. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y en donde la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BsaI o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es BsaI o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ADN polimerasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además una séptima secuencia, en donde la séptima secuencia es capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. Sin ser

limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un método para elaborar un polinucleótido lineal que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de timina de dicho tercer ácido nucleico comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 timinas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de timinas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS, y la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Stul, y en donde la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el polinucleótido tiene solo un sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, en donde la pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos una guanina, citosina o una adenina unidas covalentemente, en donde al menos una guanina, citosina o adenina unidas covalentemente se une opcionalmente a la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa comprende al menos una guanina, citosina o una adenina, en donde la endonucleasa se escinde entre una timina y la al menos una guanina, citosina o adenina. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas,

el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un método para elaborar un ácido nucleico que codifica una nucleasa, comprendiendo el método proporcionar el polinucleótido de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor para una ADN o ARN polimerasa. En algunas alternativas, la polimerasa es una ADN polimerasa. En algunas alternativas, la ADN polimerasa es una polimerasa termoestable, tal como la polimerasa Taq. En algunas alternativas, los nucleótidos son adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar un conjunto de cebadores. En algunas alternativas, el ácido nucleico es ADN. En algunas alternativas, se usa una ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, igual a, o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). En algunas alternativas, el ácido nucleico es ARN. En algunas alternativas, el ARN comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o Stul. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un método para mejorar la transcripción de un gen que codifica una nucleasa, que no forma parte de la invención, comprendiendo el método proporcionar un polinucleótido de una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método cualquiera de las

alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho polinucleótido con una ARN polimerasa en presencia de nucleótidos. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es BsaI o StuI. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura al menos, mayor de, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, el método se realiza durante al menos, más de, igual a, o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona StuI, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de StuI, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y StuI se escinde entre G y C, dejando un extremo como que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es StuI. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de StuI está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un ácido nucleico que codifica una nucleasa fabricada mediante uno cualquiera de los métodos de una cualquiera de las alternativas.

En algunas alternativas, se proporciona un método para estabilizar la traducción de un ARN que codifica una nucleasa a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas, en donde el método comprende proporcionar el ácido nucleico de una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria o un ácido nucleico fabricado mediante una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria y poner en contacto dicho ácido nucleico con un ribosoma, en presencia de aminoácidos y ARNt, en donde dicho ARN es estable a 30-37 grados centígrados durante al menos 100 horas. (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos antes mencionados). En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza a una temperatura igual a 37 °C. En algunas alternativas, la puesta en contacto se realiza durante al menos, más de, igual a, o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende una pluralidad de adeninas, en donde la pluralidad de adeninas comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 120. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 200. En algunas alternativas, el número de adeninas unidas covalentemente es superior a 300. En algunas alternativas, el ácido nucleico es un ARN. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14. En algunas alternativas, la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende además una guanina, una citosina o un uracilo, y en donde el número de adeninas unidas covalentemente termina con una

guanina, una citosina o un uracilo. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia palindrómica, en donde al menos una secuencia palindrómica puede formar una horquilla. En algunas alternativas, el ácido nucleico comprende además una secuencia capaz de formar una estructura terciaria tal como una horquilla. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un método para expresar una nucleasa o aumentar la expresión de una nucleasa, en donde el método comprende generar un ARNm a partir del polinucleótido de una cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria o un polinucleótido fabricado mediante un método cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y traducir dicho ARNm en un péptido. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, el método comprende además proporcionar una endonucleasa. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, la endonucleasa es una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es Bsal o Stul. En algunas alternativas, la traducción se realiza a una temperatura al menos, mayor a, igual a, o cualquier temperatura entre 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C. En algunas alternativas, la traducción se realiza durante al menos, más de, igual a, o tiempo entre 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas (por ejemplo, al menos, o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos anteriormente mencionados). En algunas alternativas, el ARNm comprende una pluralidad de adeninas, en donde la pluralidad de adeninas comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un método para replicar un gen que comprende una nucleasa o mejorar la estabilidad de un gen replicante que comprende una nucleasa, comprendiendo el método comprende proporcionar el polinucleótido lineal de una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria o un polinucleótido lineal fabricado mediante un método de una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria, en donde dicho polinucleótido comprende un gen que codifica una nucleasa, que transforma una célula con dicho polinucleótido y que propaga la célula. En algunas alternativas, la célula se propaga durante 1 día, 2 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 12 días, o 14 días o cualquier otro momento entre estos valores. En algunas alternativas, la célula se propaga a 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, o 37 °C o cualquier otra temperatura entre cualquiera de estos valores. En algunas alternativas, la nucleasa comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta en Id. de sec. n.º: 7-14.

En algunas alternativas, se proporciona un ARN que tiene una pluralidad de nucleótidos de adenina, comprendiendo el ARN una primera secuencia que comprende al menos una secuencia complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa unido covalentemente a una pluralidad de nucleótidos de adenina en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina, una segunda secuencia que comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de adeninas comprende al menos, más de, igual a cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 adeninas unidas covalentemente y en donde dicha secuencia

complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa de dicho primer ácido nucleico está unida covalentemente a dicha pluralidad de nucleótidos de adenina de dicho segundo ácido nucleico en el extremo 3' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina de dicho segundo ácido nucleico. En algunas alternativas, el ARNm codifica además un gen. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa está invertido, y en donde la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento del sitio de endonucleasa invertido. En algunas alternativas, la al menos una endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de Bsal o un sitio de reconocimiento de Stul. En algunas alternativas, el ARN carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona una célula fabricada mediante los métodos de una cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria.

En algunas alternativas, se proporciona una composición farmacéutica, que no forma parte de la invención, en donde la composición comprende un vehículo farmacéutico y un ácido nucleico de una cualquiera de las alternativas proporcionadas en la presente memoria o el ARNm de una cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un ácido nucleico para su uso en el tratamiento, la mejora o la inhibición de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende introducir en una célula el ácido nucleico de una cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria o el ARNm de una cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y administrar la célula al sujeto. En algunas alternativas, la célula es una célula T o una célula primaria. En algunas alternativas, la introducción se realiza mediante electroporación. En algunas alternativas, la célula es una célula humana.

En algunas alternativas, un método para tratar, mejorar o inhibir una enfermedad en un sujeto, que no forma parte de la invención, que comprende: administrar al sujeto la composición farmacéutica de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria.

En algunas alternativas, se proporciona el uso del ARNm en un método para tratar, mejorar o inhibir una enfermedad en un sujeto, que no forma parte de la invención, en donde el método comprende introducir en una célula el ARNm de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria y administrar la célula al sujeto. En algunas alternativas, la célula es una célula T o una célula primaria. En algunas alternativas, la introducción se realiza mediante electroporación. En algunas alternativas, la célula es una célula humana.

En algunas alternativas, se proporciona una composición farmacéutica, que no forma parte de la invención, en donde la composición comprende un vehículo farmacéutico y el ARNm de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria. En algunas alternativas, el ARNm carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII).

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento, la mejora o la inhibición de una enfermedad en un sujeto, que no forma parte de la invención, en donde el método comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria.

En algunas alternativas, se proporciona un método para tratar, mejorar o inhibir una enfermedad en un sujeto, que no forma parte de la invención, en donde el método comprende administrar al sujeto la célula de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria.

En algunas alternativas, el polinucleótido lineal que codifica una proteína, tal como una nucleasa, por ejemplo las Id. de sec. n.º 6-14, en donde dicho polinucleótido comprende un sitio de endonucleasa en el extremo 3' de dicho polinucleótido, preferiblemente fuera de la región codificante de dicha proteína, y dicho sitio de endonucleasa está unido a al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, o 500 residuos de timina unidos covalentemente o una cantidad de residuos de timina unidos covalentemente que esté dentro de un intervalo definido por se proporcionan dos de los valores anteriormente mencionados.

En algunas alternativas, se proporciona un ARNm que codifica una proteína, tal como una nucleasa, por ejemplo, Id. de sec. n.º: 6-14, en donde dicho ARNm comprende una cola de poli(A) que tiene al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400 o 500 residuos de longitud o una longitud que esté dentro de un intervalo definido por dos de las longitudes mencionadas anteriormente y, en donde dicho ARNm carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tal como una escisión/ sitio de unión del factor de especificidad de poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CFII).

En algunas alternativas, se proporcionan los polinucleótidos o ácidos nucleicos para su uso en el tratamiento, la mejora o la inhibición de una enfermedad en un sujeto, que no forman parte de la invención, en los que el método comprende introducir en una célula uno o más de los polinucleótidos o ácidos nucleicos establecidos en cualquiera de las alternativas mencionadas anteriormente; y administrar la célula al sujeto. En algunas alternativas, la célula es una célula T o una célula primaria. En algunas alternativas, dicha enfermedad es el cáncer, la isquemia, la retinopatía diabética, la degeneración macular, la artritis reumatoide, la psoriasis, la infección por VIH, la anemia falciforme, la enfermedad de Alzheimer, la distrofia muscular, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades vasculares, la fibrosis quística, el accidente cerebrovascular, el síndrome de hiperIGE y la hemofilia.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, los polinucleótidos o ácidos nucleicos se usan para tratar, mejorar o inhibir una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende administrar a un sujeto uno o más de los polinucleótidos o ácidos nucleicos establecidos en cualquiera de las alternativas mencionadas anteriormente. En algunas alternativas, dicha enfermedad es el cáncer, la isquemia, la retinopatía diabética, la degeneración macular, la artritis reumatoide, la psoriasis, la infección por VIH, la anemia falciforme, la enfermedad de Alzheimer, la distrofia muscular, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades vasculares, la fibrosis quística, el accidente cerebrovascular, el síndrome de hiperIGE y la hemofilia.

En algunas alternativas, se proporciona un método para aumentar y/o estabilizar la expresión de una proteína en donde el método comprende generar un ARNm a partir de uno o más de los polinucleótidos de una o más de las reivindicaciones anteriormente mencionadas y traducir dicho ARNm en un péptido.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para mejorar la transcripción o expresión de un gen, en donde el método comprende proporcionar uno o más de los polinucleótidos o ácidos nucleicos de una cualquiera o más de las alternativas mencionadas anteriormente, en donde dicho polinucleótido comprende además un gen, tal como un gen de nucleasa, por ejemplo las Id. de sec. n.º. 6-14; y poner en contacto dicho polinucleótido o ácido nucleico con una ARN polimerasa en presencia de nucleótidos.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un sistema para editar al menos un gen diana en una célula, en donde el sistema comprende un ácido nucleico que codifica una proteína endonucleasa que se dirige a al menos una secuencia en una célula, y al menos un ácido nucleico que codifica al menos una proteína que, solo o junto con otras proteínas, modifica la especificidad del sustrato de al menos una enzima o complejo enzimático de ubiquitina ligasa en la célula y, opcionalmente, un vector que comprende un molde de ácido nucleico para el direccionamiento de genes homólogos.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método de edición de al menos un gen diana en una célula, en donde el método comprende introducir en una célula una secuencia de ácido nucleico que codifica una endonucleasa, introducir en dicha célula al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína modificadora de la especificidad del sustrato del complejo enzima/enzima ubiquitina ligasa y, opcionalmente, introducir en dicha célula un vector que comprende una plantilla de ácido nucleico capaz de dirigir genes homólogos de al menos una secuencia genómica en la célula.

En algunas alternativas, se proporciona un polinucleótido lineal que comprende una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la

tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de BsaI. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de Stul. El polinucleótido es un polinucleótido lineal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de endonucleasa de restricción de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un ARNm que tiene una pluralidad de nucleótidos de adenina pero que no forma parte de la invención, en donde el ARNm comprende una primera secuencia que comprende al menos una secuencia complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa unido covalentemente a una segunda secuencia, en donde la segunda secuencia comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, y en donde dicha secuencia complementaria a un sitio de reconocimiento de endonucleasa de dicho primer ácido nucleico está unida covalentemente a dicha pluralidad de nucleótidos de adenina de dicho segundo ácido nucleico en el extremo 5' de dicha pluralidad de nucleótidos de adenina de dicho segundo ácido nucleico. En algunas alternativas, el ARNm codifica además un gen. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa, tal como Cas9, un derivado del mismo o un fragmento activo del mismo, TALEN o MegaTAL. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa está invertido, y en donde la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento del sitio de endonucleasa invertido. En algunas alternativas, la al menos una endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de BsaI. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de Stul. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en una célula de mamífero, tal como una célula humana. En algunas alternativas, el ARNm carece de una UTR 5' y/o 3' o carece de una UTR 5' y/o 3' nativa y/o carece de una o más secuencias requeridas para la poliadenilación nativa, tales como un sitio de unión del factor de especificidad de escisión/poliadenilación (CPSF), un sitio de unión del factor de estimulación de escisión (CstF), un sitio de unión del factor de escisión I (CFI) o un factor de escisión II sitio de unión (CFII). Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona una célula, en donde la célula se fabrica mediante cualquiera de los métodos proporcionados en la presente memoria. El método puede comprender proporcionar el polinucleótido lineal de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria, en donde dicho polinucleótido comprende además un gen, la transformación de una célula con dicho polinucleótido y la propagación de la célula, en donde el polinucleótido se replica.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para tratar, mejorar o inhibir una enfermedad en un sujeto. El método comprende introducir en una célula un polinucleótido lineal y administrar la célula al sujeto. En algunas alternativas, la enfermedad es anemia falciforme, hipercolesterolemia, cáncer, enfermedad autoinmunitaria, trastorno hereditario del metabolismo o inmunodeficiencia. En algunas alternativas, la enfermedad es el cáncer, la isquemia, la retinopatía diabética, la degeneración macular, la artritis reumatoide, la psoriasis, la infección por VIH, la anemia falciforme, la enfermedad de Alzheimer, la distrofia muscular, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades vasculares, la fibrosis quística, el accidente cerebrovascular, el síndrome de hiperlGE y la hemofilia. En algunas alternativas, la enfermedad es el cáncer, la isquemia, la retinopatía diabética, la degeneración macular, la artritis reumatoide, la psoriasis, la infección por VIH, la anemia falciforme, la enfermedad de Alzheimer, la distrofia muscular, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades vasculares, la fibrosis quística, el accidente cerebrovascular, el síndrome de hiperlGE o la hemofilia. El polinucleótido lineal se definió anteriormente. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa está invertido. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un promotor de la ARN polimerasa. En algunas alternativas, la célula es una célula T o una célula primaria. En algunas alternativas, la introducción se realiza mediante electroporación. En algunas alternativas, la célula es una célula humana. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para tratar, mejorar o inhibir la enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende introducir en una célula un ARNm de cualquier tipo y administrar la célula al sujeto, el ARNm codifica además un gen. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa, tal como Cas9, un derivado del mismo o un fragmento activo del mismo, TALEN o MegaTAL. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa está invertido, y en donde la secuencia que codifica un complemento de ARN es un complemento del sitio de endonucleasa invertido. En algunas alternativas, la al menos una endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de Bsal. En algunas alternativas, el al menos un sitio de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de Stul. En algunas alternativas, la célula es una célula T o una célula primaria. En algunas alternativas, la introducción se realiza mediante electroporación. En algunas alternativas, la célula es una célula humana. En algunas alternativas, el gen tiene codones optimizados para la expresión en una célula de mamífero, tal como una célula humana. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, que no forman parte de la invención, se proporciona un método para tratar, mejorar o inhibir una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende administrar una célula al sujeto. La célula se fabrica mediante cualquiera de los métodos proporcionados en la presente memoria. El método puede comprender proporcionar el polinucleótido lineal de cualquiera de las alternativas descritas en la presente memoria, en donde dicho polinucleótido comprende además un gen, la transformación de una célula con dicho polinucleótido y la propagación de la célula, en donde el polinucleótido se replica. En algunas alternativas, la célula es una célula humana.

En algunas alternativas de tratamiento, mejora o inhibición de una enfermedad en un sujeto, que no forman parte de la invención, la enfermedad es anemia falciforme, hipercolesterolemia, cáncer, enfermedad autoinmunitaria, trastorno hereditario del metabolismo o inmunodeficiencia.

En algunas alternativas, se proporciona un método para fabricar un polinucleótido que comprende un gen que codifica una proteína que se desea expresar, en donde el polinucleótido comprende una pluralidad de nucleótidos de timina y un sitio de reconocimiento de endonucleasa insertado en el mismo. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de BsaI y la endonucleasa es BsaI. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, un ARNm generado mediante los métodos descritos en la presente memoria se usa como un ARNm terapéutico para tratar una enfermedad administrando directamente el ARNm a un ser humano, o bien solo o bien junto con una sustancia encapsulante que promueve su suministro al interior de una célula. En algunas alternativas, el ARNm se introduce en una célula. En algunas alternativas, la célula es una célula primaria. En algunas alternativas, la célula se administra a un sujeto necesitado. En algunas alternativas, el sujeto es un ser humano.

En algunas alternativas del polinucleótido, el polinucleótido comprende un sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo IIS corriente abajo del sitio de corte previsto, creando así un sitio de escisión de endonucleasa de tipo IIS corriente arriba del sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo IIS. En algunas alternativas, la restricción de tipo IIS está invertida. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa de tipo IIS está a una distancia de 1 a 30 bases del sitio de reconocimiento de endonucleasa de tipo IIS. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un polinucleótido que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina y un sitio de reconocimiento de endonucleasa insertado en el mismo. El polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción y una tercera secuencia de ácido nucleico, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos,

más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa de restricción, en donde el sitio de escisión de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina y en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción está ubicado dentro de los 55 pares de bases del sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa de restricción y dicho sitio de escisión de endonucleasa de restricción está dentro de 1 a 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de al menos endonucleasas es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está entre 1-5 nucleótidos corriente arriba del sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa, por ejemplo, las **Id. de sec. n.º. 6-14**. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de Stul está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de Bsal y la endonucleasa es Bsal. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de BSAi está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

En algunas alternativas, se proporciona un método para elaborar un polinucleótido que tiene una pluralidad de nucleótidos de timina y un sitio de reconocimiento de endonucleasa insertado en el mismo. El método de elaboración de un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una nucleasa, una cadena molde, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y un sitio de escisión de endonucleasa para una endonucleasa insertada en la misma, en donde dicha cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, puede comprender proporcionar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa, proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa, en donde la tercera secuencia de ácido nucleico comprende la cadena molde, en donde la cadena molde comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina unidos covalentemente y en donde el tercer ácido nucleico comprende el sitio de escisión de endonucleasa, en donde el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases se separa de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina, uniendo dicho primer ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico y uniendo dicha tercera secuencia de ácido nucleico a un extremo de la segunda secuencia de ácido nucleico, en donde dicho segundo ácido nucleico está unido covalentemente a un extremo de dicha tercera secuencia de ácido nucleico, y en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasa se encuentra dentro de 55 pares de bases del el sitio de escisión de endonucleasa para la endonucleasa y dicho sitio de escisión de endonucleasa está entre 1 y 40 pares de bases de la timina más 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 timinas unidas covalentemente. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, el al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción de tipo II es un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción Bsal o Stul. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está entre 1-5 nucleótidos del sitio de reconocimiento de endonucleasa. En algunas alternativas, el polinucleótido comprende además un gen. En algunas alternativas, el gen es un gen de endonucleasa, por ejemplo, las **Id. de sec. n.º. 6-14**. Sin ser limitativo, una endonucleasa puede incluir, por ejemplo, una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II y una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, la endonucleasa es una CRISPR, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de restricción de tipo II o una endonucleasa de restricción de tipo IIS. En algunas alternativas, en donde se proporciona Stul, el sitio de escisión de endonucleasa es un sitio de escisión de Stul, AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633), y Stul se escinde entre G y C, dejando un extremo romo que termina en un GG. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa es AGGCCT (Id. de sec. n.º: 633). En algunas alternativas, la endonucleasa es Stul. En algunas alternativas, la pluralidad de adeninas termina en GG. En algunas alternativas, el sitio

de escisión de *StuI* está invertido. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de endonucleasa es un sitio de reconocimiento de restricción de *BsaI* y la endonucleasa es *BsaI*. En algunas alternativas, el sitio de reconocimiento de restricciones de *BSA*i está invertido. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) en la pluralidad de nucleótidos de timina. En algunas alternativas, el sitio de escisión de endonucleasa está ubicado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9 o 10 pares de bases de la timina más 5' (o timina 5' terminal) de la pluralidad de nucleótidos de timina.

Creación de plásmido lineal-OK MCS-pA-100, -200, y -300.

Para preparar el plásmido lineal-OK blunt (Lucigen) para la inserción de la cola de poli A, se ligó un MCS que comprendía múltiples sitios RE romos y con extremos pegajosos, así como un sitio *BsaI* terminal [*DraIII*-*FspI*-*BsiWI*-*NheI*-*BsaI*] al plásmido lineal-OK blunt para crear el plásmido lineal-OK-MCS. El plásmido lineal-OK-MCS se digirió con *NheI*, se hizo romo, y se desfosforiló con CIP. Para crear una cola larga de poli(A), se hibridaron oligos de 200 T y 50 A en una razón equimolar. Los oligos hibridados se trataron con polimerasa T4, fragmento de Klenow y T4 PNK para recortar las solapas, rellenar los huecos y crear extremos romos fosforilados. La mezcla resultante se procesó sobre un gel de agarosa al 3 % y se extrajeron en gel fragmentos en el intervalo de aproximadamente 200-800 pb. Después de la purificación, estos fragmentos se ligaron en el plásmido lineal OK MCS previamente preparado con ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 2 horas. Las colonias resultantes se examinaron para determinar la longitud del inserto en la cola mediante PCR de colonias usando cebadores que flanquean el sitio de inserción de MCS/cola y, a continuación, las colonias con insertos de la longitud adecuada se secuenciaron para confirmar la orientación correcta del inserto. Esto resultó en la identificación exitosa de longitudes de cola de 70, 172 y 325 pb. Estos constructos se denominaron plásmido lineal OK-MCS-PA-100, -200 y -300, respectivamente.

Creación del plásmido lineal-OK-MCS- Δ *BsaI*.

Para crear colas más largas, fue necesario mutar los 4 sitios *BsaI* nativos al plásmido lineal OK para permitir la digestión solo en el sitio *BsaI* en el MCS insertado. Un sitio fue eliminado por el ensamblaje de Gibson. Los 3 sitios restantes se eliminaron mediante digestión por restricción de un fragmento que contenía el sitio *BsaI* a mutar, así como un par de sitios RE flanqueantes, haciendo romo y ligando este fragmento en pUC57 digerido con *EcoRV*, mutagénesis dirigida al sitio del sitio *BsaI* y, a continuación, subclonando el fragmento mutado de nuevo en el plásmido OK MCS lineal usando los sitios RE flanqueantes incluidos. Este plásmido se denominó plásmido lineal-OK-MCS- Δ *BsaI*.

Creación de plásmidos de la serie pEVL.

Una vez eliminados todos los sitios *BsaI* nativos, el fragmento que contenía la cola de poliA del plásmido lineal-OK-MCS-pA-100, -200 y -300 se clonó en el plásmido lineal-OK-MCS- Δ *BsaI*, creando pEVL-100, -200 y -300. A continuación, pEVL-300 se digirió con *BsaI*, se hizo romo con Klenow, se desfosforiló con CIP y se ligó con un fragmento adicional de poli(A) de doble cadena romo preparado tal como se indicó anteriormente. El cribado como el anterior dio como resultado plásmidos con colas de p(A) de 425 y 525 pb. Estos se denominaron pEVL-400 y pEVL-500.

Clonación de la proteína 9 asociada a CRISPR (Cas9) y de las guías TCRA.

El constructo de expresión de Cas9 se obtuvo de Addgene (plásmido #41815). Para garantizar la expresión nuclear de Cas9 en las células T humanas primarias, se usan señales de localización nuclear (NLS) en los extremos 5' y 3' (2X-NLS). Para rastrear la eficacia de la transfección, Cas9 se fusionó con T2A-mCherry y se clonó en una versión modificada de pUC57 con un promotor T7 denominada pWNY2.0 para obtener pWNY2.0-2X-NLS-Cas9-T2A-mCherry. Posteriormente, se cortó y empalmó 2X-NLS-Cas9-T2A-mCherry de pWNY2.0 y se clonó en pEVL200.

Las guías dirigidas a la región constante del TCR alfa se diseñaron usando una herramienta de diseño CRISPR en línea. Las guías se diseñaron con un promotor U6 y se ordenaron como gBlocks (IDT). Posteriormente, el gBlock que comprende el promotor U6 y el ARNg (ARNcr+ARNtracr) se clonó en una estructura principal de vector AAV2 autocomplementario (sc), y se comprobó el mantenimiento de las ITR intactas. Se usaron cuatro constructos diferentes de guía de gBlock generados de este modo para la síntesis del AAV6 y, tras una serie de experimentos piloto, se eligió una guía con el mejor rendimiento para realizar análisis comparativos adicionales.

Producción de ARNm de IVT.

Para los constructos de BFP y TALEN, los insertos que contenían un promotor de T7 y una secuencia de Kozak se clonaron en pEVL-100 a pEVL-500. Estos constructos se digirieron con *BsaI* para crear una cola de poli(A) libre, así como un sitio RE corriente arriba del T7 (normalmente *XbaI* o *SpeI*) para facilitar la purificación. El ADN digerido se purificó mediante columna de sílice y se eluyó en agua o Tris 10 mM. La IVT con tapa de ARCA se llevó a cabo usando el kit mMessage mMachine T7 Ultra (Ambion) según las instrucciones del fabricante, con 200-500 ng del fragmento de molde de T7 a poli A. Las reacciones de IVT se extendieron rutinariamente a 150 minutos. La etapa de ADNasa se alteró o bien en el tiempo o bien en la cantidad de ADNasa para tener en cuenta la cantidad total de ADN molde en la reacción. Para los constructos de pEVL, después del tratamiento con ADNasa, la reacción se limpió usando el kit RNeasy Mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los constructos de pWNY, la etapa de asimetría enzimática del kit mMessage mMachine T7 Ultra se llevó a cabo según

las instrucciones del fabricante antes de la limpieza del ARN. La pureza del ARN se determinó mediante espectrofotometría NanoDrop y análisis en gel con el sistema de ARN FlashGel (Lonza).

Para la producción de ARNm de Cas9, el constructo pWNY2.0-2x-NLS-Cas9-T2a-mCherry se linealizó usando Adel (Dralll) y Pfl23II (BsiWI) (Fermentas FastDigest) y pEVL200-2x-NLS-Cas9-T2a-mCherry se digirió con BsaI y SpeI. Se comprobó la integridad de la digestión de ambos constructos en geles de agarosa al 1 %, se purificaron en columna y el ARN se transcribió in vitro usando el kit de transcripción mMessage mMachine T7 ULTRA (Life Technologies) con ligeras modificaciones con respecto al protocolo del fabricante. En resumen, la reacción de IVT se realizó durante 2,5 horas y el tratamiento con ADNasa durante 1 hora. La formación de colas de poli(A) para el constructo pWNY-2.0 se realizó durante 1 hora y, posteriormente, el ARNm se purificó usando el kit RNeasy (Qiagen), se dividió en alícuotas y se congeló a -80 °C.

Electroporación de ARNm de BFP y TALEN de células T humanas primarias.

Las células T humanas primarias recién aisladas se estimularon con microperlas anti-CD3/anti-CD28 (Dyna) en RPMI con FBS al 10 %, HEPES al 2,5 % y L-glut al 1 % con 5 ng/ml de IL-2 y 1 ng/ml de IL-15. Después de 2-3 días, se retiraron las perlas de estimulación y las células T se resuspendieron a 3×10^7 células/ml en el sistema de electroporación Neon Buffer T (Invitrogen) con 0,25-2 µg de ARNm por cada 300.000 células. La electroporación se llevó a cabo en el sistema de electroporación Neon a 1400 V, 10 ms y 3 pulsos. Inmediatamente después de la electroporación, las células se resuspendieron en un medio de células T completo con IL-2 e IL-15 (como anteriormente). Las células se colocaron en una incubadora a 37 °C o en una incubadora a 30 °C durante 24 horas y luego se trasladaron a una incubadora a 37 °C para una etapa de choque frío, que se ha observado que aumenta la cantidad de proteína por célula durante el periodo en donde el ARNm está presente (Doyon Y. y col. Transient cold-shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nature Methods* 7, 459-460 (2010), incorporado en la presente memoria como referencia en su totalidad). La expresión de la proteína codificada se sometió a ensayo mediante citometría de flujo. Para determinar la inactivación de TCR por TALEN o CRISPR, se analizó la pérdida de la expresión del TCR 72 horas y 7 días después de la electroporación mediante tinción con anticuerpo anti-CD3 (clon HIT3a, FITC directo o conjugado de PerCP-Cy5.5).

Comparación del ARNm de Cas9 (pWNY2.0 frente a pEVL) en células T humanas primarias usando TCRa-KO como lectura.

Las células T CD4+ congeladas aisladas de un donante se estimularon con el activador T humano CD3/CD28 Dynabeads (Life Technologies) durante 48 horas en medios RPMI sin antibióticos con FBS al 20 %, HEPES 100 mM, Glutamax 2 mM, b-ME 55 µM y citocinas (IL-2 = 50 ng/ml, IL-7 = 5 ng/ul e IL-15 = 5 ng/ul), denominadas a continuación en la presente memoria 'medios RPMI'. Las perlas se extrajeron magnéticamente 48 horas después de la estimulación y las células se dejaron reposar en medio RPMI durante 5 horas antes de prepararlas para la transfección de ARNm. El ARN transcrito in vitro tanto de PWN2.0-2x-NLS-Cas9-T2a-mCherry como de PEVL200-2x-NLS-Cas9-T2a-mCherry se sometió a electroporación en $4,5 \times 10^5$ células usando una punta de 10 µl a dos concentraciones diferentes: 3 µg y 1,5 µg (sistema de transfección Neon); Life Technologies) a 1400 V, 10 ms de ancho, pulsos = 3, después de lo cual las células descansaron durante 3 horas seguidas de una transducción con AAV a un volumen de cultivo constante del 10 %.

Citometría de flujo.

Las células se adquirieron para la expresión de Cas9-mCherry en un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences) a las 24, 48, 72 y 168 horas, respectivamente. El análisis del TCRa se realizó usando un anticuerpo anti-CD3 directamente conjugado con Alexa 488 (BioLegend) y los datos se analizaron usando el software FlowJo (Treestar). Las células se separaron en células vivas basándose en la dispersión frontal y lateral para el análisis posterior de la inactivación del TCR (KO).

Evaluación del acortamiento de la cola asociado a la transformación.

BFP-pEVL100, 200, y 300 se digirieron con Dralll (cortes 5' de BFP) y SwaI (cortes en la estructura principal de pEVL ~75 pb 3' de cola/sitio BsaI). Este fragmento se purificó en gel y se volvió a ligar en pEVL digerido con Dralll y SwaI y CIP, así como con PwNY digerido con Dralll y SmaI y CIP. Tras el ligamiento, la ligasa se destruyó térmicamente y todos los productos del ligamiento se transformaron por electroporación en células electrocompetentes BigEasyTSA (Lucigen) para pEVL o células electrocompetentes Top10 (Invitrogen) para pWNY. Después de la recuperación a 30 °C durante 1 h en SOC, se colocaron alícuotas de cada transformación por triplicado en placas Kan y se cultivaron a 25 °C (72 h), 30 °C (24 h) o 37 °C (20 h). Las colonias se examinaron para determinar la longitud de la cola mediante PCR de colonias con cebadores que se unen en BFP (5'-cgcaaacgctaaaactacc-3') y en 3' de la cola (5'-tcagttctatgtaccagcaagg-3'). Para los ligamientos de la cola de 325 pb en pWNY, no fue posible la recuperación de ningún clon con una cola completa, por lo que esto se excluyó de un análisis posterior. Para los ligamientos de colas de 70 pb y 172 pb en pWNY, se cultivaron 2 clones de cada uno de los cuales se seleccionaron de longitud completa mediante PCR de colonias durante la noche en 1 ml de TB con carbenicilina por triplicado, con 1 alícuota a 25 °C, 1 a 30 °C y una a 37 °C. Después de 24 horas, se sembró 1 µl de cada cultivo en una alícuota fresca de 1 ml de TB+Carb. El cultivo restante se centrifugó y el sedimento se congeló para su minipreparación en una fecha posterior. Esto se repitió durante un total de 7 días completos. En este momento, todos los gránulos congelados se miniprepararon. Para cada minipreparación, se digirieron 3 µg de ADN con BsiWI y BsaI para aislar el fragmento de la cola y el producto digerido se procesó en un gel de agarosa al

3 % y luego se tiñó con el colorante de ácido nucleico GelStar (Lonza). Debido a que hay un sitio BsiWI en el fragmento de cola que se insertó en pWNY2.0, así como otro que está presente en la cadena principal de pWNY2.0, hay una banda adicional de ~95 pb en estos geles que puede usarse como control de carga de ADN.

5 Evaluación del acortamiento de la cola asociado a la propagación.

Las colonias recién transformadas de pEVL-200 a -500 se examinaron para determinar la longitud de la cola mediante PCR de colonias y las colonias con las longitudes de cola correctas se sembraron en 4 alícuotas de 1 ml de TB+Kan y se cultivaron durante la noche, 2 a 30 °C y 2 a 37 °C. A cada temperatura, se cultivó 1 alícuota bajo inducción con arabinosa y 1 sin ella. Después de 24 horas, se sembró 1 ul de cada cultivo sin arabinosa en otro 1 ml de TC+Kan sin inducción. Esto se llevó a cabo durante 2 semanas. En el momento de sembrar cada día, se sembró otro 1 ul en un cultivo de 1 ml de TB+Kan+arabinosa. Cada cultivo inducido se centrifugó y el sedimento se congeló después de 24 horas de crecimiento. Al cabo de 2 semanas, todos estos gránulos congelados se miniprepararon y se digirieron con BsaI y BsiWI para aislar el fragmento de la cola. Estos fragmentos se procesaron en un gel de agarosa al 3 % y se tiñeron con el colorante de ácido nucleico GelStar.

Generación de un polinucleótido lineal que comprende una pluralidad de nucleótidos de timina unidos covalentemente y un sitio de reconocimiento de endonucleasa insertado en su interior.

Se construyó un polinucleótido que comprende una pluralidad de nucleótidos de timina unidos covalentemente (tramo de poli(T)) y un sitio de reconocimiento de endonucleasa insertado dentro del tramo de poli(T) en múltiples etapas de clonación. Se hace referencia a la **figura 1A**, que ilustra la estructura del polinucleótido lineal, pEVL, que resulta de la inserción del sitio de clonación múltiple (MCS) que contiene BsaI, la eliminación de la pluralidad de sitios BsaI y la adición de la región codificante de poli(A).

Para crear un polinucleótido lineal que comprendiera una pluralidad de nucleótidos de timina unidos covalentemente y un sitio de reconocimiento de endonucleasa insertado en su interior, se localizaron los sitios BsaI y, usando mutagénesis por PCR dirigida al sitio y cebadores para las mutaciones, se realizaron sustituciones de una sola base en los cuatro sitios BsaI, para dar como resultado mutaciones silenciosas. Los sitios de restricción únicos que flanquean las modificaciones se usaron para escindir el fragmento y clonarlo en un vector de clonación convencional (pUC57). La mutagénesis dirigida al sitio se usó en un vector pUC57 para alterar una base en el sitio BsaI, y los sitios de restricción únicos se usaron para mover el fragmento de nuevo al vector de clonación. Esto se repitió por etapas para cada uno de los cuatro sitios de BsaI.

Con la pluralidad de sitios BsaI eliminada, se construyó una nueva región de clonación múltiple, que incluía un sitio BsaI ahora único, y se usó para clonar en el vector lineal junto con una secuencia poli(A). En primer lugar, se introdujo un nuevo sitio de clonación múltiple (MCS) con sitios de restricción que permitirían la clonación en una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN) corriente arriba de un sitio de BsaI ahora único “orientado” hacia donde se introduciría el poli(A) corto (con las anotaciones “MCS” y “BsaI” en el mapa, respectivamente, **figura 1B**). El sitio de BsaI se diseñó para “mirar” hacia el poli(A) de tal modo que el sitio de corte (anotado como “corte de BsaI” en el mapa, **figuras 1A y 1B**) estuviera dentro de la secuencia de poli(A), 4 bases corriente arriba del extremo poli(A) de la cadena codificante. De este modo, las transcripciones de ARN creadas usando este vector como molde terminarían en un poli(A) sin bases adicionales más allá de él. En segundo lugar, el poli(A) se clonó directamente corriente arriba del sitio de BSAI y luego se alargó hasta las longitudes deseadas. Los oligonucleótidos de poli(T) y poli(A) sintéticos se fosforilaron y se hibridaron para crear concatámeros de poli(A/T) bicatenarios de varias longitudes. Esta mezcla se ligó directamente corriente arriba del sitio BsaI y se seleccionaron los clones que tenían un poli(A) de las longitudes deseadas en la orientación correcta. El clon más largo obtenido del cribado tenía un poli(A) de aproximadamente 300 bases de adenina de longitud, y se denominó pEVL300. También se guardaron una variante con un poli(A) de ~100 bases, y otra con un poli(A) de ~200 bases, que se designaron pEVL100 y pEVL200, respectivamente. Para extender el poli(A) más allá de 300 bases de longitud, el pEVL300 se digirió con BsaI y los mismos concatámeros de poli(A/T) usados en la etapa anterior se ligaron nuevamente en el vector. El cribado produjo clones con poli(A) de ~400 y ~500 bases, denominados pEVL400 y pEVL500, respectivamente. La **figura 1A** muestra un mapa final del vector lineal resultante que comprende extremos teloméricos, un marco de lectura abierto de telIN (ORF1), ORF6, ORF3, ORF5, una región codificante del tramo de poli(A), un gen de resistencia a Kan2, 4 sitios BsaI alterados y una secuencia de ORF4. Se hace referencia a la **figura 1B**, que muestra una versión ampliada del sitio de interés que comprende el tramo de codificación de poli(A) junto con el sitio de restricción de BsaI invertido.

Ensayo para determinar la estabilidad de la cola de poli(A).

Los vectores polinucleotídicos que comprenden una pluralidad de nucleótidos de timina unidos covalentemente y un sitio de reconocimiento de endonucleasa insertado en su interior se crearon con el protocolo descrito anteriormente. Se usaron cuatro vectores para determinar la estabilidad de la cola de poli(A) que tenía 100, 200, 300 o 500 timinas unidas covalentemente para transcribir un ARNm que comprendía 100, 200, 300 y 500 adenosinas (pEVL100, pEVL200, pEVL300 y pEVL500). Una vez que se generaron los vectores pEVL, se probó la estabilidad del ARNm que comprende los tramos de poli(A) para determinar su dependencia de la temperatura.

La estabilidad del poli(A) en los vectores de clonación estándar para generar un transcrito con una cola de poli(A) (por ejemplo, pUC57) es extremadamente limitada, acortándose a 30-60 bases durante la propagación nocturna, incluso en células hospedadoras químicamente competentes que supuestamente aumentan la estabilidad (por ejemplo, STBL3™). Para probar la estabilidad de los tramos de poli(A) de pEVL, se cultivó *E. coli* de forma continua en cultivo líquido durante un periodo de dos semanas a 30 °C o 37 °C. Los cultivos se separaron y se indujeron a producir plásmidos con alto número de copias para su preparación a los 1, 6 y 14 días. Los plásmidos se aislaron y se digirieron con BsaI en el extremo del poli(A) y XbaI corriente arriba del poli(A) mediante 151 pares de bases. Las bandas correspondientes a los tramos de poli(A) se resolvieron en un gel de agarosa al 3 % y se procesaron siguiendo los patrones de tamaño.

Tal como se muestra en la **figura 2**, el tramo de poli(A) de pEVL100 y pEVL200 parece ser estable cuando se cultiva a 30 °C o 37 °C durante al menos dos semanas; no se detectó ningún acortamiento. Tal como se muestra en los geles el día 6 y el día 14, las bandas permanecen nítidas en una longitud para el ARNm correspondiente a temperaturas de 30 °C o 37 °C. El tramo de poli(A) de pEVL300 fue menos estable cuando se cultivó a 37 °C, observándose un acortamiento mínimo el día 6, pero un acortamiento notable el día 14, en donde se muestra una mancha de producto de ARNm por debajo del marcador de 500 bases. Este acortamiento se evitó en gran medida en los cultivos cultivados a 30 °C, incluso a los 14 días. Aunque el poli(A) del pEVL500 se mantuvo durante un solo día de crecimiento a 30 °C, el tramo de poli(A) fue significativamente inestable y se acortó considerablemente el día 6, incluso a 30 °C. El pEVL500 era inestable a 37 °C y se había acortado en los cultivos desde los días 6 y 14. Cualquier trabajo a largo plazo realizado con pEVL500 requeriría un análisis y una validación de la longitud de poli(A) en cada punto. Sin embargo, un plásmido pEVL500 de punto final aún podría mantenerse fácilmente en una cepa congelada de *E. coli*, cultivarse durante la noche y purificarse si fuera necesario.

Por consiguiente, a partir de los datos se contempla que la longitud de poli(A) puede dictar la estabilidad del tramo de poli(A) y es susceptible de acortarse en tramos largos, pero la estabilidad es mayor de lo que podía lograrse anteriormente en un orden de magnitud (30 bases de Promega frente a 300 bases). Las longitudes del tramo de poli(A) que son estables en este sistema (por ejemplo, pEVL100, pEVL200, pEVL300) son capaces de producir ARNm que se puede usar *in vivo* directamente. Esto contrasta con los tramos de poli(A) de codificación corta en los plásmidos actualmente disponibles, que sólo admiten la generación de ARNm para su uso en la traducción *in vitro* o requerirían una poliadenilación enzimática adicional para su uso *in vivo*.

Longitud homogénea del ARN.

La producción de ARNm usando el vector pEVL, en donde se describió el método de creación del vector pEVL, como molde produce un ARNm altamente homogéneo, según lo previsto. Se hace referencia a la **figura 3A**, que muestran ARNm de una transcripción de pEVL típica en un Lonza Flashgel (agarosa al 1,2 %) mientras que el ARNm de una transcripción típica y poliadenilación enzimática se muestra en la **figura 3B**. Para crear este ARNm, los plásmidos pEVL200 (carriles 1 y 2) y pEVL300 (carriles 3 y 4) con insertos se digirieron con BsaI, se purificaron en columna y se usaron como molde para la transcripción usando el kit mMessage mMachine de Ambion. El ARNm resultante se purificó usando las columnas Rneasy de Qiagen, lo que dio como resultado un ARNm listo para la transfección. El ARNm listo para la transfección se validó aplicándolo en un Lonza FlashGel con un marcador de tamaño. El ARNm mostrado en la **figura 3B** se fabricó usando un vector de transcripción comercial estándar como molde seguido de poliadenilación enzimática y luego purificación usando columnas Rneasy de Qiagen.

Tal como se muestra en la **figura 3A**, una longitud de cola de poli(A) homogénea daría como resultado una sola banda estrecha de ARNm en el gel, ya que todos los productos de ARNm tendrían la misma longitud. La **figura 3A** ilustra las bandas de ARNm que se transcribieron de pEVL200 y pEVL300 como bandas nítidas y limpias. El ARNm producido a partir del vector de poli(A) codificado por pEVL era muy homogéneo, con solo una ligera mancha por debajo de la banda primaria, lo que indica subproductos mínimos de un tamaño principalmente más pequeño **figura 3B**. El ARNm producido mediante poliadenilación enzimática fue significativamente más variado. La mancha no sólo se extendió por encima y por debajo de la banda primaria, sino que también fue más pronunciada y se extendió a un intervalo mucho mayor. Es probable que esto se deba a la distribución gaussiana del grado de acetilación realizado por la enzima, y está respaldado por la banda primaria de menor concentración (atenuadora). Por consiguiente, a partir de los datos mostrados, se contempla que el ARNm producido usando el poli(A) codificado de pEVL es notablemente más homogéneo que el producido usando poliadenilación enzimática y es más estable.

Expresión de la proteína azul fluorescente (BFP) a partir de un vector lineal que codifica poli(A).

El ARNm producido a partir del plásmido lineal de poli(A) codificado fue al menos tan eficaz como el ARNm producido por poliadenilación enzimática tradicional. Para probar la eficacia del plásmido lineal, se prepararon plásmidos lineales que comprenden una pluralidad de nucleótidos de timina unidos covalentemente (tramo de poli(T)) y un sitio de reconocimiento de endonucleasa insertado dentro del tramo de poli(T) con el protocolo descrito anteriormente. El plásmido comprendía además un gen que codifica la proteína fluorescente azul (BFP), como proteína indicadora. Los cinco plásmidos lineales con el indicador BFP tenían 100, 200, 300, 400 y 500 tramos de poli(T) para transcribir un transcrito de ARNm con 100, 200, 300, 400 y 500 tramos de poli(A), respectivamente. Los plásmidos se usaron para transfectar 1 microgramo constante de diferentes ARNm que codifican BFP en células T humanas primarias y las células se analizaron 24 horas después mediante citometría de flujo.

Se produjo el ARNm que codifica la BFP a partir de dos tipos diferentes de plásmidos. El primer tipo de plásmido usado fue un plásmido de control que comprendía un vector de clonación circular estándar con un promotor de ARN T7, un sitio de unión al ribosoma (secuencia de Kozak), la secuencia codificante de la proteína mTagBFP2 y un sitio de restricción BsiWI para la linealización (pWNY). El segundo tipo de plásmido fue el vector poli(A) codificado previamente descrito, ya sea pEVL100, pEVL200, pEVL300, pEVL400 o pEVL500, con el gen que codifica el BPA clonado directamente corriente arriba del poli(A) codificado. Tres de los plásmidos pEVL de este experimento en particular también tenían una región no traducida de 150 pares de bases después de la secuencia codificante, pero antes del poli(A), marcado con “α”, esta secuencia tenía poco o ningún efecto sobre la expresión de la BFP. Los plásmidos pWNY se linealizaron y purificaron, se transcribieron, se poliadenilaron enzimáticamente y se purificaron según un protocolo Ambion estándar, conocido por los expertos en la técnica. Los plásmidos pEVL se linealizaron y purificaron, transcribieron y purificaron, omitiendo la etapa de poliadenilación enzimática.

Se hace referencia a la **figura 4**, en donde los datos muestran que el ARNm de los plásmidos pEVL transfecta al menos tan eficazmente como el ARNm de poli(A) codificado enzimáticamente y se traduce tan bien o mejor que el ARNm de poli(A) codificado enzimáticamente. El número de células positivas para BFP (eje Y izquierdo) en las muestras de pEVL estuvo a la par o fue ligeramente superior al de las muestras de pWNY, especialmente para longitudes de cola de poli(A) superiores a 100 bases. Los experimentos de traducción se realizaron a 30 °C. El nivel de traducción, inferido de la intensidad de la señal azul (intensidad media de fluorescencia, MFI, eje Y derecho), fue mayor en las muestras transfectadas con el ARNm producido a partir de los plásmidos poli(A) codificados. En general, el ARNm producido a partir del pEVL200 y el pEVL300 pareció dar los mejores resultados, especialmente en comparación con los ARNm codificados enzimáticamente. Esto puede deberse al hecho de que la poliadenilación enzimática solo añade aproximadamente 60-100 bases según el fabricante. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, dado que se transfectó 1 microgramo constante de ARNm, se transfectó una cantidad molar más baja de los ARNm de poli(A) más largos en comparación con los ARNm de poli(A) más cortos. Por consiguiente, a partir de los datos mostrados, se contempla que una cola de poli(A) producida a partir de la cola de pEVL200 y la pEVL300 pueda dar mejores resultados que indiquen la estabilidad del ARNm con 200 o 300 adeninas en la cola de poli(A) y, por lo tanto, puede usarse durante un período de tiempo más largo (24 horas) para la traducción de una proteína. Como tal, también se hace referencia a la **figura 3**, que indica la estabilidad del ARNm que puede usarse para la traducción.

Traducción de ARN generados por poliadenilación enzimática y vectores lineales a 30 °C y 37 °C.

La eficiencia de traducción es la velocidad de traducción del ARNm en proteínas que se encuentran dentro de las células. Se puede medir en las cantidades de proteína por ARNm por hora. Tal como se describió anteriormente, el ARN se generó a partir de un método estándar de adición de un tramo de poli(A) mediante un vector de transcripción y una enzima de poliadenilación. El vector lineal previamente descrito, pEVL, también se transcribió para generar un ARN para la traducción. Los ARN generados a partir de ambos métodos codificaron un indicador BFP para determinar la eficiencia de la traducción. Los ARN se transfectaron en células T primarias humanas.

Se llama la atención sobre la **figura 5**, que muestra la eficiencia de traducción de los ARN de la poliadenilación enzimática y el vector lineal a lo largo del tiempo en las células T primarias humanas. El ARN generado a partir de pEVL300 (cola codificada en 300 pA) y pWNY (poliadenilación enzimática) transfectados en células T primarias se comparó cuantificando el porcentaje de células positivas para BFP y la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células positivas para BFP a lo largo del tiempo, con y sin incubación a 30 °C.

Se descubrió que, aunque se ha descubierto que una incubación de 24 horas a 30 °C después de la transfección aumenta la acumulación de la proteína traducida, algunos tipos de células no toleran el cultivo anormal durante un período de tiempo tan prolongado (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas CD34+ entran en esta categoría). Se descubrió que el ARNm que codifica la BFP creado usando el plásmido poliA codificado como molde era más potente en comparación con el ARNm creado usando la poliadenilación enzimática estándar. Las células transfectadas con ARNm derivado del pEVL (pEVL300) tenían porcentajes más altos de células BFP+ a lo largo del tiempo, y las células BFP+ eran significativamente más brillantes (MFI más alto, barras rayadas). Aunque este efecto se observó en cierta medida cuando las células se incubaron a 30 °C durante 24 horas después de la transfección (barras oscuras), el efecto fue más pronunciado cuando se retiró esta incubación y las células se cultivaron de forma continua a 37 °C (barras claras). Este efecto puede deberse al hecho de que las pruebas se acercaban a la máxima eficiencia de transfección al realizar la incubación a 30 °C y, por lo tanto, no se observó una diferencia significativa debido a un intervalo dinámico experimental reducido.

Producción de ARNm.

El molde de ADN se linealizó/cortó con enzimas de restricción específicas (cadena principal: pWNY2.0 o pEVL 200) y los plásmidos linealizados se purificaron usando el kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen). El ARNm se obtuvo usando un kit (mMessage mMachine T7 Ultra; Ambion) con ligeras modificaciones con respecto al protocolo del fabricante. En resumen, la reacción de traducción *in vitro* (IVT) se realizó durante 2,5 horas y el tratamiento con ADNasa durante 1 hora. La extracción de residuos de poli(A), si fue necesario, se realizó durante 1 hora y el ARNm se limpió usando el kit RNeasy (Qiagen), se dividió en alícuotas y se congeló a -80 °C.

Transfección y transducción.

Las células T CD4⁺ primarias aisladas de un donante se estimularon con Dynabeads CD3/CD28 (Life technologies) en presencia de citocinas (IL-2, IL-7 e IL-15) durante 60 horas en medios libres de antibióticos. A continuación, las perlas se retiraron magnéticamente y las células se dejaron reposar en medio fresco con citocinas durante 2,5 a 5 horas antes de la electroporación. Las células primarias se lavaron con PBS y se resuspendieron en Buffer T (Life Technologies) a $4,5 \times 10^5$ células/10 ul y se mezclaron con las concentraciones requeridas de ARNm. Se usó Neon (Life Technologies) para electroporar el ARNm (1400 V, 10 ms de ancho, pulsos = 3) usando la punta de 10 ul/100 ul, después de lo cual las células descansaron durante 1-3 horas, seguidas de la transducción con AAV. AAV se añadió en función del título o por volumen (sin superar el 20 %).

Citometría de flujo.

El análisis de TCR α se realizó usando el citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences) y los datos se analizaron usando el software FlowJo (Treestar). En resumen, las células se marcaron con un anticuerpo CD3 directamente conjugado con Alexa 488 o PerCP-CY5.5, se lavaron y se adquirieron en LSRII. Las células se separaron en células vivas basándose en la dispersión frontal y lateral para el análisis posterior de la inactivación del TCR (KO).

Ensayo de endonucleasa I T7 (T7EI).

La eficacia de corte de Cas9 y ARNg se estimó usando el ensayo T7EI para los loci de TCR α y CCR5. Los loci genómicos diana se amplificaron mediante PCR usando oligos/cebadores específicos usando la ADN polimerasa Accuprime Pfx o Hifi Platinum Taq (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR se comprobaron en gel y se limpiaron con el kit de purificación por PCR QIAquick. Se midió la concentración de ADN de los productos de PCR y se desnaturalizaron 400 ng del producto purificado, se sometieron a digestión con T7EI durante 30 minutos y se analizaron en gel.

Construcción de Cas9 en un vector pEVL para la generación de un ARNm que codifica Cas9 con una cola poli(A).

El Cas9 se obtuvo de Addgene (plásmido n.º 41815), se amplificó por PCR y se clonó en un pEVL200 (constructo lineal) con un promotor T7 y dos señales de localización nuclear (NLS), una en los extremos N y C. mCherry se unió a Cas9 con un péptido T2A en el extremo 3' de Cas9. También se generó un control solo de mCherry con un promotor T7 y un solo NLS en el extremo 5' de mCherry. También se realizó la generación de un vector pEVL que codifica Cas9 en donde no se añadió una secuencia de mCherry al constructo. Las longitudes de la región de poli(T) que codifica la cola de poli(A) pueden oscilar entre 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 timinas unidas covalentemente. En algunas alternativas, la región de poli(T) que codifica la cola poli(A) puede oscilar entre 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 timinas unidas covalentemente o cualquier longitud entre las dos longitudes anteriormente mencionadas descritas en la presente memoria. En algunas alternativas, la cola de poli(A) comprende al menos 200 timinas unidas covalentemente.

Expresión de Talen bajo el control de un vector pEVL.

Tal como se muestra en la **figura 6**, el panel B es un esquema del vector pEVL (longitud variable extendida). Este vector codifica un promotor T7, necesario para la ARN polimerasa, un MCS para facilitar la clonación, una cola de poli-A codificada de múltiples longitudes, que van desde 60 pb (pEVL 100) hasta 500 pb (pEVL 500), y un sitio de escisión único, BsaI, para definir el final de la cola de poliA y terminar la transcripción. El gen que codifica TALEN se subclonó usando técnicas de clonación convencional para incorporar el gen TALEN en el vector pEVL. A continuación, se llevó a cabo la cuantificación de la inactivación de TCR α usando pEVL y otros vectores que codificaban un promotor de T7 que estaban poliadenilados enzimáticamente (**figura 6**, panel B). La inactivación de TCR α se logró usando TALEN, en donde las células T CD4⁺ humanas primarias se sometieron a electroporación usando la cantidad de ARN indicada en la **figura 6**, panel B (0,25 μ g, 0,25 μ g y 1 μ g). Tal como se muestra, los constructos de pEVL pueden lograr una inactivación del 90 % cuando las células se cultivan a 37 °C y, cuando se incuban a 30 °C durante 24 horas después de la electroporación, la dosis más baja de TALEN proporcionada por pEVL funciona mejor que ambos ARNm con cola enzimática.

La guía CRISPR n.º 4 del TCR α genera el TCR α -KO más alto cuando se usa con un Cas9 expresado a partir de un vector lineal para la generación de un ARNm poliadenilado.

Las células T CD4⁺ humanas primarias se descongelaron de un aislado congelado, estimuladas con dinabeads CD3/CD28 (Life Technologies) en presencia de citocinas (IL-2, IL-7 e IL-15) durante 60 horas en medios libres de antibióticos. A continuación, se retiraron las perlas y se electroporaron $4,5 \times 10^5$ células por condición usando una punta Neon de 10 ul (3×10^5 células después de la electroporación) y se añadió AAV 3 horas después de la electroporación. Se usó ARNm de Cas9 expresado a partir del constructo pEVL a 1,5 ug/muestra (1 ug tras la electroporación) y se añadieron AAV específicos de guía a una MOI de $1,33 \times 10^4$ /muestra. Tras la electroporación, las células se sembraron en una placa de 96 pocillos en un medio de 200 ul con citocinas y se dejaron en una incubadora de CO₂ a 30 °C durante 24 horas, después de lo cual las células se trasladaron a una incubadora de CO₂ a 37 °C. (Véase la **figura 7**).

A las 24 horas de la electroporación, se comprobó la expresión de Cas9-mCherry en las células y posteriormente a las 72, 96 y 168 horas tanto para mCherry como para TCR-KO con el anticuerpo CD3-Alexa488 (Biolegend) usando BD LSRII. Los voltajes se mantuvieron iguales durante todo el experimento. (Véase la figura 8).

- 5 Expresión transitoria de las proteínas Ad5^{wt} y Cas9 expresadas a partir de un vector pEVL para aumentar la transducción de AAV en las células T humanas.

La fluorescencia de la GFP de las células T humanas primarias se midió mediante un BD LSRII 24 o 48 horas después de la electroporación del ARNm de Cas9 generada a partir de un vector pEVL y la transducción con AAV de las células T humanas primarias. Las células se trataron con un volumen de cultivo al 1 % de AAV (equivalente a 2 ul), 1 ug de ARNm de Cas9 y 0,03 ug de cada proteína Ad5. Se añadió AAV 4 horas después de la electroporación, y las células se incubaron a 30 °C durante 24 horas después de la electroporación y, a continuación, se dejaron a 37 °C. “Ad5” se refiere a la combinación de las proteínas E4ORF6 y E1B55k, de tipo natural o de los mutantes H373A o H354 de E1B55k, según se indica. Tal como se indicó, el ARNm se generó a partir de un constructo de pEVL para incorporar una cola de poli(A) para la estabilidad del ARNm en el experimento. Tal como se muestra en la **figura 9**, es la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la GFP en las células T humanas primarias 24 o 48 horas después de la electroporación del ARNm de las proteínas Cas9 y Ad5 (de tipo natural o mutantes, según se indica) y la transducción del AAV. El ARNm de Cas9 se generó a partir de un constructo de pEVL para obtener una cola de poli(A) para la estabilidad del ARNm de Cas9. Las células se trataron con un volumen de cultivo del 10 % o el 1 % de AAV, 1 ug de mRNA de Cas9 y 0,03 ug de cada proteína Ad5. Se añadió AAV 4 horas después de la electroporación, y las células se incubaron a 30 °C durante 24 horas después de la electroporación y, a continuación, se dejaron a 37 °C. Como tal, el ARNm generado a partir del vector pEVL para aumentar la cola de poli(A) se puede usar para tecnologías de nucleasas.

- 25 Los tramos de poli(A) homopoliméricos de 200 pares de bases o más son extremadamente inestables en los plásmidos circulares.

BFP seguida de insertos del tramo de poli(A) de 70, 172 y 325 pares de bases unidos por los sitios de enzimas de restricción Dralll y SwAl se generaron mediante escisión con Dralll y SwAl a partir de los vectores de clonación de plásmidos lineales BFP-pEVL-100, BFP-pEVL-200 y BFP-pEVL-300. Los insertos se transformaron con el vector de clonación circular pWNY que se había digerido con Dralll y SmaI, y se transformaron en *E. coli* usando métodos convencionales. Las bacterias transformadas se colocaron en placas de agarosa bajo selección con ampicilina y se cultivaron a 25 °C. Las colonias individuales se amplificaron mediante PCR usando cebadores que flanqueaban el tramo de poli(A), y la longitud del tramo de poli(A) se determinó en función del tamaño de banda resultante. Típicamente, se obtuvo una banda del tamaño esperado, o de un tamaño más pequeño, lo que refleja el acortamiento del tramo de poli(A) durante la transformación. Las colonias se puntuaron para determinar si el fragmento del tramo de poli(A) tenía aproximadamente el tamaño esperado (círculo abierto, “inserto más grande”) o estaba sustancialmente acortado (círculo cerrado) (**figura 10**).

Para ilustrar las dificultades en la clonación y propagación de tramos homopoliméricos extendidos, intentamos ligar insertos que contenían tramos de poli(A) homopoliméricos de 70, 172 y 325 pares de bases, respectivamente, en un plásmido vectorial de clonación circular convencional (denominado pWNY) (**figura 10**). Para evaluar la estabilidad de los insertos a 25 °C después de la transformación y la colocación en placas durante la noche en medios selectivos, se realizó una PCR a través de los insertos utilizando ADN aislado de colonias bacterianas individuales. Tras el análisis mediante electroforesis en gel, los productos de PCR resultantes se resolvieron principalmente en bandas de dos tamaños diferentes (**figura 10**), los productos que reflejan los tamaños de inserción esperados se representan mediante círculos abiertos y los productos que representan tamaños sustancialmente acortados se representan mediante círculos cerrados. Como puede verse, los tramos de poli(A) de más de aproximadamente 100 pares de bases son extremadamente inestables incluso durante el proceso a corto plazo de ligamiento/transformación en un plásmido estándar, con un acortamiento sustancial del tramo que se produce a una alta frecuencia.

- 50 Los tramos de poli(A) homopoliméricos de al menos 500 pares de bases se pueden propagar de manera estable en un plásmido lineal.

Dralll y SwAl se generaron mediante escisión con Dralll y SwAl a partir de los vectores de clonación de plásmidos lineales pEVL-100, pEVL-200 y pEVL-300. Los insertos se ligaron en el vector de clonación circular pWNY que se había digerido con Dralll y SmaI, y se transformaron en *E. coli* usando métodos de electroporación convencional o, alternativamente, se subclonaron en pEVL y se transformaron en células Big Easy electrocompetentes (Lucigen, Madison, WI). Las bacterias transformadas se colocaron en placas de agarosa mediante selección con ampicilina (pWNY) o kanamicina (pEVL) y se cultivaron a 30 grados centígrados. Las colonias individuales se amplificaron mediante PCR usando cebadores que flanqueaban el tramo de poli(A), y la longitud del tramo de poli(A) se determinó basándose en el tamaño de banda resultante como en la **figura 10**. Típicamente, se obtuvo una banda del tamaño esperado, o de un tamaño más pequeño, lo que refleja el acortamiento del tramo de poli(A) durante la transformación. Las colonias se puntuaron para determinar si el fragmento del tramo de poli(A) tenía aproximadamente el tamaño esperado (círculo abierto, “inserto más grande”) o estaba sustancialmente acortado (círculo cerrado). D) Estabilidad de los tramos de poli(A) codificados tras la inducción de pEVL durante la noche para la preparación del molde. Los BFP-pEVL-200 a 500 y los BFP-pEVL-300-U, G, UU y GG se cultivaron durante una noche con inducción a 30 °C en

medio de TB+Kan+arabinosa y, a continuación, se prepararon al máximo con el kit NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante para plásmidos con bajo contenido de copias (difiere del protocolo estándar, es decir, en el uso de 8 a 12 ml de resuspensión, lisis), y tampones de neutralización por gramo de peso del gránulo). Para cada muestra preparada al máximo, se digirieron 2 ug de ADN durante la noche con BsiWI y Bsal para liberar el fragmento de cola de poli(A) del resto del plásmido. La digestión se realizó en un gel de agarosa al 3 % y se tiñó posteriormente con el colorante de ácido nucleico GelStar (Lonza). Se usó la escalera Generuler de 50 puntos de presión (ThermoScientific) para determinar la longitud de la cola del poli(A). E) Estabilidad de los tramos de poli(A) codificados en condiciones de propagación prolongadas para probar la estabilidad de la cola de poli(A) en condiciones de propagación estrictas, se cultivaron pEVL 100 a 500 durante 2 semanas a 30 °C y 37 °C en medios TB+Kan. Cada 24 horas, se sembró 1 ul de cada muestra en una alícuota fresca de 1 ml de medio TB+ Kan. Los días 0, 6 y 13, se sembró 1 ul de cada muestra a cada temperatura en 1 ml de medio TB+Kan+arabinosa y se cultivó durante una noche antes de miniprepararlo. Después de la minipreparación, se digirieron 2 ug de ADN de cada muestra durante la noche con BsiWI y Bsal para liberar el fragmento de cola poli(A) del resto del plásmido. La digestión se realizó en un gel de agarosa al 3 % y se tiñó posteriormente con el colorante de ácido nucleico GelStar (Lonza). Se usó el marcador molecular GeneRuler de 50 puntos de presión (Thermo Scientific) para determinar la longitud de la cola del poli(A).

El plásmido lineal usado fue un sistema de plásmido lineal basado en el bacteriófago N15 que, según se informa, es superior en la propagación del ADN genómico de organismos con genomas altamente repetitivos, pero no se ha informado previamente que apoye la clonación o propagación de tramos de polinucleótidos homopoliméricos. Para determinar si el plásmido lineal era capaz de clonar o propagar tramos de poli(A), se realizó una ligamiento *in vitro* de oligonucleótidos sintetizados químicamente para generar una población de polinucleótidos de poli(A) bicatenarios recocidos de longitudes variadas, luego se purificaron en gel cuando los polinucleótidos tenían longitudes de entre aproximadamente 100 y 850 pares de bases, y se intentó ligar esta población de oligonucleótidos en un derivado de plásmido con un MCS personalizado (**figura 11A**, parte superior). Esta reacción de ligamiento condujo al aislamiento de los derivados plasmídicos lineales que contenían tramos de poli(A) de aprox. 70 pares de bases, aprox. 170 pares de bases, y aprox. 325 pares de bases (**figura 11A**, parte inferior); los tamaños se evaluaron mediante electroforesis en gel (por ejemplo, como en la **figura 11D**, panel izquierdo). Para determinar el potencial del plásmido lineal para propagar de manera estable otros tramos de poli(A) extendidos, se desarrolló un método para la generación de tramos de poli(A) extendidos de longitud arbitraria (**figura 11B**). Este método requirió la modificación del plásmido lineal para colocar una enzima de restricción de tipo IIS única justo corriente abajo de un tramo de poli(A) codificado, de modo que pudiera escindirse dentro del tramo de poli(A); para lograr esto, se eliminaron todos los sitios Bsal internos del plásmido lineal para producir un plásmido lineal que carecía de los sitios Bsal originales (**figura 11A**, panel central). La clonación de los tramos de 70, 172 y 325 pares de bases generados previamente en el plásmido lineal generó pEVL-100, pEVL-200 y pEVL-300 respectivamente, y la posterior clonación de una población de polinucleótidos de poli(A) de terminación roma generada de forma similar en pEVL-300 digerido/hecho romo por Bsal dio lugar a la incorporación de tramos adicionales de 100 y 200 pares de bases de poli(A) al final del tramo de poli(A) de pEVL-300, permitiendo así el aislamiento de pEVL-400 y pEVL-500 (**figura 11D**, panel izquierdo).

Se descubrió que los insertos que poseen secuencias de poli(A) de hasta 300 pares de bases se subclonan fácilmente en pEVL (**figura 11C**, **figura 11D**). Estos tramos también son muy estables durante la propagación prolongada a través de un ciclo de dos semanas de cultivo líquido en serie (**figura 11E**, también respaldado por la secuenciación del ADN en ambas direcciones a lo largo de la cola del poli(A) del pEVL300 tras la expansión, la congelación hasta obtener una reserva de glicerol y la reexpansión; véase la **figura 14** con electroferogramas de cebador directo e inverso que demuestran que el tramo de poli(A) del pEVL300 se extiende al menos 300 pares de bases). Por el contrario, se observa que existe una tendencia a que el tramo de poli(A) del pEVL-500 se acorte durante la clonación, aunque siempre es posible identificar los clones que poseen insertos con un tramo de poli(A) del tramo de poli(A) del tamaño de aprox. 500 pares de bases. De manera similar, la propagación prolongada del pEVL-500 también muestra una tendencia a que el tramo de poli(A) se acorte (**figura 11E**), y es necesario volver a aislar periódicamente las colonias que tienen colas largas para mantener el tramo de poli(A) en la longitud deseada.

El ARNm que incorpora colas de poliA extendidas generadas a partir de moldes de pEVL exhibe propiedades de traducción superiores.

La capacidad del pEVL para la generación de ARNm de la IVT se validó clonando casetes de IVT de proteína azul fluorescente (BFP) corriente arriba de los tramos de poli(A) en el pEVL-100/200/300/400/500. Usando los respectivos derivados de pEVL escindidos por Bsal como moldes de ARNm de IVT, se generó el ARNm de IVT usando la química de protección ARCA desde BFP-pEVL-100 hasta BFP-pEVL-500 (**figura 12A**, panel izquierdo). Los ARNm resultantes tenían el tamaño previsto para cada derivado de pEVL y eran muy uniformes en comparación con los ARN poliadenilados enzimáticamente (**figura 12A**, panel derecho, se muestran ejemplos de ARNm poliadenilados enzimáticamente de la poli(A) polimerasa (EPAP) de E. coli con protección ARCA típicos). La potencia del ARNm producido a partir de pEVL se validó comparando la expresión de BFP tras la electroporación de los ARNm generados mediante poliadenilación enzimática y a partir de pEVL-100 y pEVL-300 en células T humanas primarias, seguida de un análisis mediante citometría de flujo (**figura 12B**). Se observó una mejora sorprendente de la potencia, evaluada mediante la intensidad de fluorescencia media máxima de la BFP 24 horas después de la electroporación, para el ARNm generado a partir del pEVL-300 frente al pEVL-100 o para el ARNm poliadenilado enzimáticamente. Es importante destacar que, por lo general, se observó que el ARNm codificado por pEVL producía una población celular con una distribución más estrecha de la fluorescencia de la BFP frente al ARNm poliadenilado enzimáticamente (por ejemplo, compare los gráficos de flujo en la **figura 12B**, panel inferior). Los análisis que

compararon la expresión de la BFP impulsada por el ARNm generado de pEVL-100 a pEVL-500 durante un periodo de 7 días (**figura 12C**) confirmaron las observaciones anteriores: el ARNm derivado de pEVL-100 y pEVL-200 que poseía longitudes de cola de poli(A) de 72 pares de bases y 165 pares de bases, respectivamente, mostró una potencia reducida en comparación con los ARNm derivados de pEVL-300, pEVL-400 o pEVL-500 (colas de poli(A) de longitudes de aproximadamente 325, 420 y 500 pares de bases (las longitudes son aproximadas y se deducen de las comparaciones de electroforesis en gel con los patrones de MW en la **figura 11E**). No se detectaron diferencias de potencia significativas entre los ARNm derivados de pEVL que poseen tramos de poli(A) codificados de 300.

Basándose en la evidencia de la secuenciación de los ARN celulares, que ha identificado correlaciones entre la longitud del ARN y la presencia de residuos de uridina o guanina simples o dobles en los extremos 3' 24-26 del ARNm, se usó además el sistema pEVL-300 para generar ARNm con extremos definidos que consisten en bases de uridina o guanina simples o dobles, y se evaluó su capacidad para apoyar la expresión de proteínas fluorescentes tras la transfección en células T humanas primarias (**figura 15**). De manera consistente, se observó que los ARNm que poseían extremos de uridina en 3' (U o UU) mostraban una potencia reducida (tanto en la magnitud total como en la duración de la expresión) en comparación con una cola de poli(A) convencional de idéntica longitud, mientras que los que tenían extremos de guanina de 3' (G o GG) impulsaban una expresión de BFP que era indistinguible de las colas de poli(A) convencional de longitud comparable.

Finalmente, se evaluó el rendimiento del ARNm de IVT derivado del pEVL en una aplicación de edición de genes: alteración del locus TCR α en las células T humanas primarias (**figura 13**). Para ello, las ORF que codifican TALEN dirigidos al locus de TCR α se clonaron en pEVL-300 y se usaron para la producción de ARNm de IVT en paralelo con la producción de ARNm de TALEN a partir de un plásmido circular convencional. Tras la electroporación del ARNm TALEN derivado de pEVL en las células T humanas primarias, se observó que las tasas de pérdida de CD3, que se producen tras la alteración del gen TCR α debido a la necesidad de una interacción entre el holorreceptor TCR α/β y el CD3 para apoyar la expresión superficial del CD3, eran consistentemente superiores a los pesos iguales del ARNm poliadenilado enzimáticamente generado en paralelo (**figura 13A**). Esto se interpretó en el sentido de que era coherente con la observación general de que el aumento de la expresión de las nucleasas que editan genes da como resultado tasas más altas de modificación del sitio diana. Como segunda evaluación del rendimiento del ARNm derivado de pEVL para las aplicaciones de edición de genes, la nucleasa Cas9 fusionada a través de un ligador 2A con mCherry se clonó en un vector plasmídico circular o pEVL-200, y usó el ARNm derivado de estos vectores para expresar Cas9 y mcherry en las células T humanas primarias, al tiempo que expresaba simultáneamente un ARN guía dirigido a la región constante de TCR α mediante un AAV (**figura 13B**). En el caso de la expresión de Cas9-2a-mCherry usando ARNm poliadenilado enzimáticamente o derivado de pEVL-200, se observó nuevamente que el ARNm derivado de pEVL producía poblaciones con una distribución de fluorescencia más ajustada, así como una fluorescencia promedio más alta, y que esto se correlacionaba con una mayor eficiencia de la edición génica mediada por CRISPR (panel superior). En conjunto, estos datos respaldan el concepto de que el nivel y la duración de la expresión de las nucleasas son determinantes importantes de la actividad de escisión observada en una nucleasa en un sitio diana genómico de una célula viva 27, y que el uso de ARNm con colas de poli(A) de más de 250 pares de bases para expresar nucleasas de edición génica aumentará la eficiencia de edición de genes en comparación con el uso de ARNm con colas de poli(A) más cortas.

Crecimiento de la línea de células T H9 después de la transfección con ARNm codificado por pEVL.

Las células T H9 se cultivaron y se resuspendieron 1×10^6 células en un tampón de electroporación Neon. Se añadieron 0,66 ug de ARNm de BFP generado mediante transcripción in vitro a partir del vector pEVL-300 a la cubeta de electroporación, y las células se electroporaron a 1000 voltios $\times$ 2 pulsos, seguido de transferencia y cultivo a 37 °C en medios de cultivo normales. 24 horas tras la transfección, se analizó la fluorescencia de la BFP mediante citometría de flujo, lo que demuestra que casi el 60 % de las células expresaban la BFP, lo que indica una transfección altamente eficaz con el ARNm codificado por pEVL. (**Figura 16**).

La línea celular K562 crece después de la transfección con ARNm codificado por pEVL.

Las células T K562 se cultivaron y se resuspendieron 1×10^6 células en un tampón de electroporación Neon. Se añadió 1,0 ug de ARNm de BFP generado mediante transcripción in vitro a partir del vector pEVL-300 a la cubeta de electroporación, y las células se electroporaron a 1000 voltios $\times$ 2 pulsos, seguido de transferencia y cultivo a 37 grados centígrados en medios de cultivo normales. La fluorescencia de BFP se analizó mediante citometría de flujo y demostró que el 70 % de las células expresaban la BFP, lo que indica una transfección altamente eficaz con el ARNm codificado por el pEVL. (**Figura 17**).

Crecimiento de células Jurkat después de la transfección con el ARNm codificado por pEVL.

Las células T cultivadas con Jurkat 1×10^6 se electrodepositaron de forma simulada o se electroporaron con 1,5 microgramos de ARNm que codificaba una proteína Cas9-2a-mCherry. Las células transfectadas se pusieron en cultivo durante 24 horas, tras lo cual se recogieron las células y se analizaron para determinar la expresión de mCherry mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la figura, se demostró que > 75 % de las células eran mCherry+, lo que indica una transfección altamente eficaz. (**Figura 18**).

Crecimiento de células hepáticas HepG2 después de la transfección con el ARNm codificado por pEVL.

Las células HepG2 se cultivaron y se resuspendieron 3×10^5 células en tampón de electroporación Neon. Se añadió 0,25 ug de ARNm de BFP generado mediante transcripción in vitro a partir del vector pEVL-300 a la cubeta de electroporación, y las células se electroporaron a 1295 voltios $\times$ 3 pulsos, seguido de transferencia y cultivo a 37 grados centígrados en medios de cultivo normales. 24 y 48 horas después de la transfección, se analizó la fluorescencia de BFP mediante citometría de flujo, lo que demostró que casi el 95 % de las células expresaban BFP a las 24 horas y permanecían en un nivel elevado de BFP+ a las 48 horas, lo que indica una transfección altamente eficiente con el ARNm codificado por pEVL. (**Figura 19**).

Células CD34 humanas transfectadas con ARNm de BFP.

Las células CD34 humanas se cultivaron en medios de cultivo SCGM suplementados con FLT3-L/SCF/TPO/IL-3 y se incubaron durante 48 horas a 37 grados centígrados. A continuación, las células se resuspendieron en un tampón de electroporación Neon T. Se generaron 1,5 ug de ARNm de BFP mediante transcripción in vitro a partir de vectores pEVL-300 que, preparados por Trilink, se añadieron a células de $0,2 \times 10^6$ /ml. Las células se sometieron a electroporación a 1300 voltios, 1 pulso, 20 ms, luego se transfirieron y se cultivaron a 30 grados durante 16 horas y, posteriormente, a 37 grados centígrados durante días adicionales. Las células se analizaron mediante citometría de flujo a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la electroporación. Las células transfectadas con ARNm de BFP muestran > 80 % de señales de BFP a las 24 y 48 horas de la electroporación. Las señales de BFP disminuyen gradualmente del 80 % al 20 % a las 120 horas después de la electroporación. (**Figura 20**).

pELV

pEVL puede actuar como molde durante la síntesis del ARN. El molde puede elaborarse con una cola de poliA codificada de una longitud predefinida y no requiere PCR para su síntesis. Los plásmidos de pEVL pueden tener un sitio de clonación múltiple (MCS) directamente corriente arriba de un tramo de poliA de una longitud definida que termina en una enzima de restricción de tipo IIS única, Bsal. Bsal puede orientarse de tal modo que la escisión se produzca al final y dentro del tramo de poliA, por lo que el sitio de reconocimiento de la enzima se invierte. Pueden existir múltiples plásmidos de pEVL con longitudes de poliA que varían de aproximadamente 100 a 500 pb de longitud; el nombre corresponde a la longitud de la cola, por ejemplo, pEVL100 y pEVL500, respectivamente. La clonación de un promotor y un gen de la ARN polimerasa T7 en MCS, y luego escindir el ADN purificado con Bsal, puede generar un molde para la generación de ARN poliadenilado. Este molde puede usarse para generar ARN con una longitud de cola de poliA homogénea y predefinida en tan solo un paso enzimático.

El pEVL generado puede mantenerse congelado o a -20°C cuando no se usa activamente. El pEVL también puede protegerse con proteínas producidas por *telN*.

Selección de cepas de *E. coli*.

La *E. coli* puede usarse con pELV. Por ejemplo, la cepa *E. coli* BigEasy puede usarse con el pELV, especialmente cuando se desea un mayor número de copias del plásmido. Los plásmidos de pEVL también pueden ser derivados lineales del plásmido OK y, por lo tanto, los plásmidos pueden ser resistentes a la kanamicina (Kan). Kan puede usarse a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o cualquier otra concentración entre cualquiera de los dos valores anteriormente mencionados, preferiblemente, 2000x (10 mg/ml).

Clonación molecular.

Durante la clonación, pueden usarse adaptadores u otros sitios de reconocimiento variables, tales como los sitios DralII-BsiWI o DralII.

Digiriendo el plásmido.

La digestión del plásmido puede realizarse mediante la endonucleasa apropiada y depende del sitio de reconocimiento de endonucleasa en el plásmido.

Ligamientos y transformaciones.

El ligamiento de un tramo de poliT en el plásmido puede realizarse mediante procedimientos de clonación molecular convencionales y resolución de problemas convencionales. Los plásmidos pueden transformarse en células bacterianas cultivadas en placas de medios convencionales, por ejemplo, placas de agar LB. Estos procedimientos son conocidos por los expertos en la técnica.

Los plásmidos lineales también pueden cribarse para comprobar el mantenimiento de la longitud del inserto y de la poliA. Sin ser limitativos, la PCR, la PCR de colonias, la secuenciación y otros métodos conocidos por un experto en la técnica pueden usarse para buscar el acortamiento de poliA.

Cultivo de células con pEVL.

Las células que albergan los plásmidos lineales se pueden cultivar en un medio nutricional tales como TB y el antibiótico de selección apropiado. Pueden usarse células tales como *E. coli*, cepas de *E. coli* BigEasy, por ejemplo. Los ejemplos de antibióticos de selección pueden incluir, pero no se limitan a, kanamicina, ampicilina, penicilina y cloranfenicol. Si hay un operón o una región promotora, puede usarse una molécula para inducir la inducción. Por ejemplo, si hay un operón de arabinosa, la arabinosa puede usarse para la inducción. Las células que contienen plásmidos pueden congelarse para su uso posterior, tales como reservas de glicerol, por ejemplo.

Crecimiento para preparaciones de ADN.

Si el constructo de pEVL fabricado es un plásmido con pocas copias, el pEVL puede requerir una masa mayor de bacterias para obtener cantidades convencionales de plásmido a partir de una preparación comercial (por ejemplo, Macherey Nagel Nucleobond Xtra Maxi). La bacteria puede cultivarse en presencia de un antibiótico de selección, según la resistencia a los antibióticos.

Preparaciones de ADN y ARN plasmídicos.

Las preparaciones de plásmidos de ADN pueden realizarse con técnicas conocidas por los expertos en la técnica, así como con kits disponibles en el mercado, por ejemplo (por ejemplo, los kits Maxi y MiniPrep de Qiagen y el kit Maxi de Invitrogens). Los kits disponibles comercialmente son conocidos por los expertos en la técnica y los kits pueden tener ARNasa, tampones de lisis, por ejemplo. Los kits también se pueden usar para recuperar ARN y evitar la contaminación por ARN y evitar bajos rendimientos.

Transcripción de ARN mediante pEVL.

El constructo de pEVL puede digerirse con la endonucleasa adecuada, por ejemplo, cuando el sitio de reconocimiento de restricción es BsaI, puede usarse BsaI. La cantidad de enzima requerida depende del tamaño del inserto, ya que los insertos más grandes (y, por lo tanto, plásmidos más grandes) tendrán un menor número de sitios por µg de ADN y, por lo tanto, requerirán menos enzima, por ejemplo.

Después de la digestión, puede llevarse a cabo la purificación de la reacción. La purificación puede realizarse mediante técnicas de purificación convencionales conocidas por los expertos en la técnica, o mediante un kit disponible en el mercado, tal como las columnas de purificación de PCR Qiagen, por ejemplo.

Reacción de transcripción.

Después de la purificación del molde, el molde puede usarse para la reacción de transcripción.

En este caso se describe el desarrollo y la aplicación de un sistema vectorial plasmídico lineal (plásmido de longitud variable extendida (pEVL)), que permite la generación de ARNm de IVT con tramos de poli(A) que poseen extremos 3' definidos de hasta al menos 500 pares de bases. Además, se ha demostrado que los ARNm de IVT generados con pEVL tienen una alta potencia cuando se usan junto con la electroporación de células T humanas primarias, y que la potencia observada es más alta en los transcritos que poseen tramos de poli(A) 3' de más de aproximadamente 300 pares de bases y residuos de adenina o guanina en su extremo 3'.

Se construyó pEVL usando la región de entramado de un plásmido lineal, en donde el plásmido lineal se desarrolló para la clonación de ADN altamente repetitivo a partir de genomas bacterianos. Tal como se esquematiza en la **figura 11B**, la adaptación del plásmido lineal para la generación fácil de tramos de poli(A) extendidos requirió su modificación de modo que poseyera un sitio diana único para la enzima de restricción BsaI de tipo IIS, ya que el sitio 3' de BsaI al tramo de poli(A) es fundamental para el método desarrollado para la clonación iterativa de oligonucleótidos poli(A) de extremos romos con el fin de extender el poli(A) codificado A) se extiende hasta una longitud superior a 300 pares de bases. El sitio BsaI u otro sitio de restricción o sitio de endonucleasa también puede usarse para generar residuos terminales alternativos arbitrarios en el extremo 3' del ARNm, que, como se muestra en la **figura 15**, pueden incluir una o dos guaninas terminales a continuación del tramo de poli(A) homopolimérico y seguir produciendo ARNm con una potencia indistinguible de un tramo de poli(A) homopolimérico, al menos en células T primarias.

Uno de los usos más importantes de pEVL será la generación a gran escala de ARNm para aplicaciones terapéuticas. pEVL se amplía fácilmente para la producción a gran escala de plásmidos GMP mediante la selección con kanamicina, y permite la generación de ARNm poliadenilados y de tamaño uniforme en una sola reacción usando la química estándar de la ARN polimerasa T7. Como ejemplos de validación de la utilidad de pEVL a escala, pEVL-200 y pEVL-300 pueden usarse y demostrar que generan ARNm de altísima calidad y potencia que codifican TALEN, BFP, transposasa Sleeping Beauty y Cas9-2A-mCherry a escala de 10 mg usando métodos de IVT de ARNm convencionales.

pEVL también representa una nueva herramienta para los investigadores interesados en la biología del ARNm. Al proporcionar un método para la generación de transcripciones que poseen colas de poli(A) de longitud arbitraria y residuos terminales, el pEVL permite realizar estudios detallados sobre la relación entre la arquitectura del ARNm y la eficiencia traduccional en una gama más amplia de longitudes de cola de poli(A) de lo que era posible anteriormente.

El pEVL es un avance significativo hacia la síntesis a gran escala simple, eficiente y consistente de ARNm altamente potentes para aplicaciones terapéuticas, así como una nueva herramienta para el estudio de la arquitectura y función de los ARNm que poseen tramos de poli(A) definidos en el intervalo fisiológico (>200 pares de bases).

- 5 Con respecto al uso de sustancialmente cualquier término plural y/o singular en la presente memoria, los expertos en la técnica pueden traducir del plural al singular y/o del singular al plural según sea apropiado para el contexto y/o la aplicación. Las diversas permutaciones singular/plural pueden exponerse expresamente en la presente memoria por motivos de claridad.
- 10 Los expertos en la técnica entenderán que, en general, los términos usados en la presente memoria, y especialmente en las reivindicaciones adjuntas (por ejemplo, los cuerpos de las reivindicaciones adjuntas) generalmente pretenden ser términos “abiertos” (por ejemplo, el término “incluir” debe interpretarse como “que incluye pero no se limita a”, el término “tener” debe interpretarse como “que tiene al menos”, el término “incluye” debe interpretarse como “incluye pero no se limita a”, etc.). Los expertos en la técnica entenderán además que si se pretende un número específico de recitación de
- 15 una reivindicación introducida, dicha intención se enumerará explícitamente en la reivindicación y, en ausencia de dicha enumeración, no existe tal intención. Por ejemplo, como ayuda a la comprensión, las siguientes afirmaciones adjuntas pueden contener el uso de las frases introductorias “al menos una” y “una o más” para introducir recitaciones de afirmaciones. Sin embargo, el uso de dichas frases no debe interpretarse en el sentido de que la introducción de un enunciado de reivindicación mediante los artículos indefinidos “un” o “una” limita cualquier reivindicación particular que
- 20 contenga dicha recitación de reivindicación introducido a alternativas que contengan sólo una de dichas recitaciones, incluso cuando la misma reivindicación incluya las frases introductorias “uno o más” o “al menos uno” y artículos indefinidos como “un” o “una” (por ejemplo, “uno” y/o “una” deben interpretarse en el sentido de “al menos uno” o “uno o más”); lo mismo ocurre con el uso de artículos definidos que se usan para introducir recitaciones de reclamos. Además, incluso si se recita explícitamente un número específico de una reivindicación introducida, los expertos en la técnica reconocerán que dicha recitación debe interpretarse en el sentido de que significa al menos el número recitado (por
- 25 ejemplo, la mera recitación de “dos recitaciones”, sin otros modificadores, significa al menos dos recitaciones, o dos o más recitaciones). Además, en los casos en que se use una convención análoga a “al menos una de A, B y C, etc.”, en general, tal interpretación se entiende en el sentido en que un experto en la técnica entendería la convención (por ejemplo, “un sistema que tenga al menos uno de A, B y C” incluiría, pero no se limita a, los sistemas que tienen A solo, B solo, C solo, A y B juntos, A y C juntos, B y C juntos, y/o A, B y C juntos, etc.). En aquellos casos en que se use una convención análoga a “al menos una de A, B o C, etc.”, en general, tal interpretación se entiende en el sentido en que un experto en la técnica entendería la convención (por ejemplo, “un sistema que tenga al menos uno de A, B o C” incluiría, pero no se limita a, los sistemas que tienen A solo, B solo, C solo, A y B juntos, A y C juntos, B y C juntos, y/o A, B y C juntos, etc.). Los expertos en la técnica comprenderán además que prácticamente cualquier palabra y/o frase disyuntiva que presente
- 30 dos o más términos alternativos, ya sea en la descripción, las reivindicaciones o los dibujos, debe entenderse que contempla las posibilidades de incluir uno de los términos, cualquiera de los términos o ambos términos. Por ejemplo, se entenderá que la frase “A o B” incluye las posibilidades de “A” o “B” o “A y B”.
- Además, cuando las características o aspectos de la divulgación se describen en términos de grupos de Markush,
- 40 los expertos en la técnica reconocerán que la divulgación también se describe de ese modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.
- Tal como entenderá un experto en la técnica, para todos y cada uno de los propósitos, tal como en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos descritos en la presente memoria también abarcan todos y cada uno de los posibles subintervalos y combinaciones de subintervalos de los mismos. Cualquier intervalo enumerado puede reconocerse fácilmente como suficientemente descriptivo y permite desglosar el mismo intervalo en mitades, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc., al menos iguales. A modo de ejemplo no limitativo, cada intervalo descrito en la presente memoria puede dividirse fácilmente en un tercio inferior, un tercio medio y un tercio superior, etc. Como también comprenderá un experto en la técnica, todos los términos como “hasta”, “al menos”, “mayor que”, “menor que” y similares incluyen el número mencionado y se refieren a intervalos que pueden dividirse posteriormente en subintervalos, tal como se indicó anteriormente. Finalmente, como entenderá un experto en la técnica, un intervalo incluye cada elemento individual. Así, por ejemplo, un grupo que tiene 1-3 artículos se refiere a grupos que tienen 1, 2 o 3 artículos. De manera similar, un grupo que tiene 1-5 artículos se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4 o 5 artículos, etc.
- 45
- 50
- 55 Si bien se han descrito diversos aspectos y alternativas en la presente memoria, otros aspectos y alternativas serán evidentes para los expertos en la técnica. Los diversos aspectos y alternativas descritos en la presente memoria tienen fines ilustrativos y no pretenden ser limitativos, y el verdadero alcance y espíritu se indican en las siguientes reivindicaciones.
- Un experto en la técnica apreciará que, para este y otros procesos y métodos descritos en la presente memoria,
- 60 las funciones realizadas en los procesos y métodos pueden implementarse en un orden diferente. Además, las etapas y operaciones descritas sólo se proporcionan como ejemplos, y algunas de las etapas y operaciones pueden ser opcionales, combinarse en menos etapas y operaciones, o expandirse en etapas y operaciones adicionales sin restar valor a la esencia de las alternativas descritas.
- 65 Un experto en la técnica apreciará que, para este y otros procesos y métodos descritos en la presente memoria, las funciones realizadas en los procesos y métodos pueden implementarse en un orden diferente. Además, las

etapas y operaciones descritas sólo se proporcionan como ejemplos, y algunas de las etapas y operaciones pueden ser opcionales, combinarse en menos etapas y operaciones, o expandirse en etapas y operaciones adicionales sin restar valor a la esencia de las alternativas descritas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para elaborar un ácido nucleico que comprende:

a) proporcionar un vector lineal, que comprende:

(i) proporcionar un plásmido lineal que comprende un brazo izquierdo que comprende un telómero izquierdo, un brazo derecho que comprende un telómero derecho, y una primera secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasas,

(ii) proporcionar una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una pluralidad de nucleótidos de timina, en donde dicha pluralidad de nucleótidos de timina comprende al menos, más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o 550 nucleótidos de timina consecutivos unidos covalentemente, y

(iii) insertar el segundo ácido nucleico en el plásmido lineal, uniendo así dicha primera secuencia de ácido nucleico a dicha segunda secuencia de ácido nucleico de tal modo que el segundo ácido nucleico comprenda un sitio de escisión de la endonucleasa que esté dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 nucleótidos de la timina terminal 5' en la pluralidad de nucleótidos de timina, y

en donde dicho primer ácido nucleico está unido covalentemente a dicho segundo ácido nucleico en un extremo de dicho segundo ácido nucleico y, en donde dicho sitio de reconocimiento de endonucleasas está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 nucleótidos del sitio de escisión de la endonucleasa, y

(b) poner en contacto dicho vector lineal con una ARN polimerasa en presencia de nucleótidos, generando así el ácido nucleico.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el sitio de escisión de la endonucleasa está dentro de la pluralidad de nucleótidos de timina.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el plásmido lineal comprende un brazo izquierdo que comprende un telómero izquierdo; un brazo derecho que comprende un telómero derecho; y que comprende una región de clonación ubicada entre el brazo izquierdo y el brazo derecho.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el plásmido lineal comprende además un tercer ácido nucleico que comprende un gen que codifica una nucleasa que es una endonucleasa.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la endonucleasa comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en Id. de sec. n.º: 6 o está codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en una cualquiera de Id. de sec. n.º: 7-14.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasas es un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción de tipo II, tal como un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción de tipo IIS.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasas es un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción Bsal o un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción Stul.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el ácido nucleico generado es ARN, tal como un ARN que comprende una pluralidad de nucleótidos de adenina, en donde la pluralidad de nucleótidos de adenina comprende más de, igual a, o cualquier número entre 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, o 500 adeninas consecutivas unidas covalentemente.

9. Un método para estabilizar un ARN durante la traducción *in vitro* que comprende: proporcionar el ácido nucleico fabricado mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y poner en contacto dicho ácido nucleico con un ribosoma en presencia de aminoácidos y ARNt, generando así un ARN, en donde dicho ARN es estable a una temperatura en un intervalo de 30 °C a 37 °C y durante un periodo mayor de o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o durante un periodo dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos mencionados anteriormente.

10. El método de la reivindicación 9, en donde el ARN comprende además un gen que codifica una proteína para terapia, o una nucleasa, tal como una endonucleasa.
- 5 11. Un método para estabilizar un ARN durante la traducción *in vivo* en una célula, tal como una célula humana, tal como una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula primaria, una célula T primaria humana, una célula CD4+ y una célula CD8+, comprendiendo el método:

10 transfectar en una célula el ácido nucleico fabricado mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8;
 colocar la célula en un recipiente de cultivo con medios;
 suministrar a la célula nutrientes y aminoácidos para la traducción; y
 incubar la célula durante un periodo mayor de o igual a 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 horas o durante un periodo dentro de un intervalo definido por dos de los tiempos mencionados anteriormente y a una temperatura en un intervalo de desde 30 °C hasta 37 °C.
15 12. Un método para aumentar y/o estabilizar la expresión de una proteína que comprende generar un ácido nucleico realizando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8; y traducir dicho ácido nucleico en un péptido.

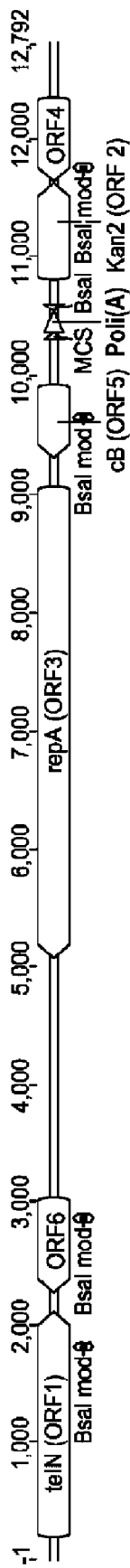


Figura 1A

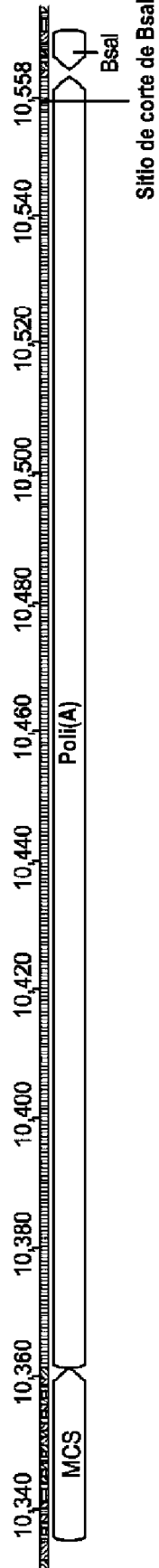


Figura 1B

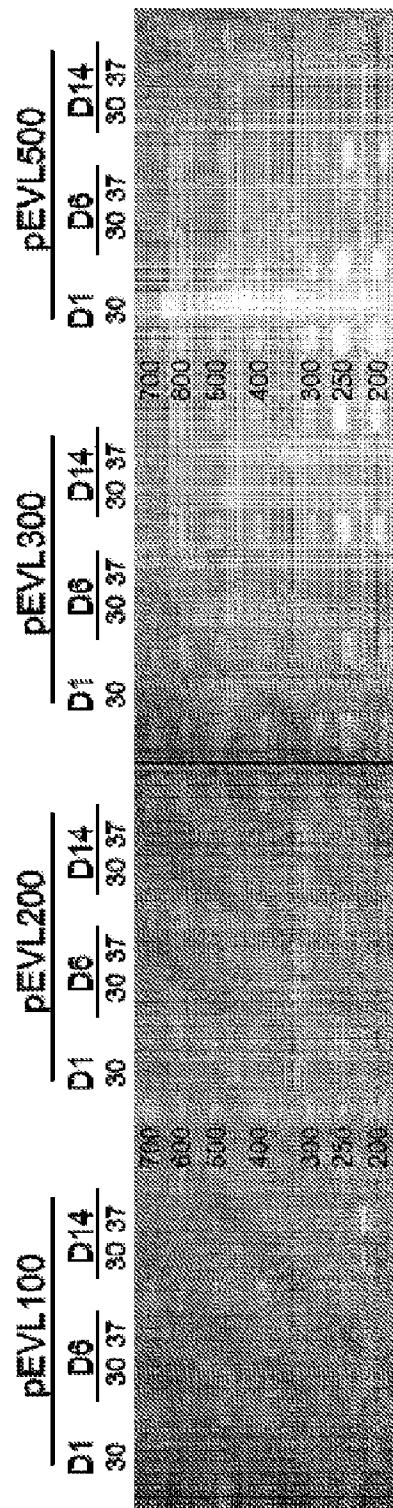


Figura 2

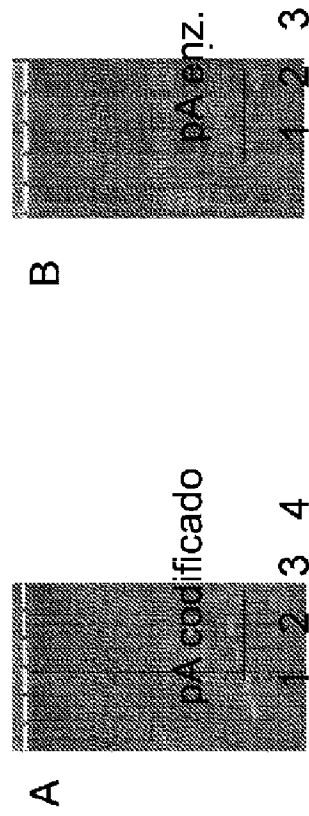


Figura 3

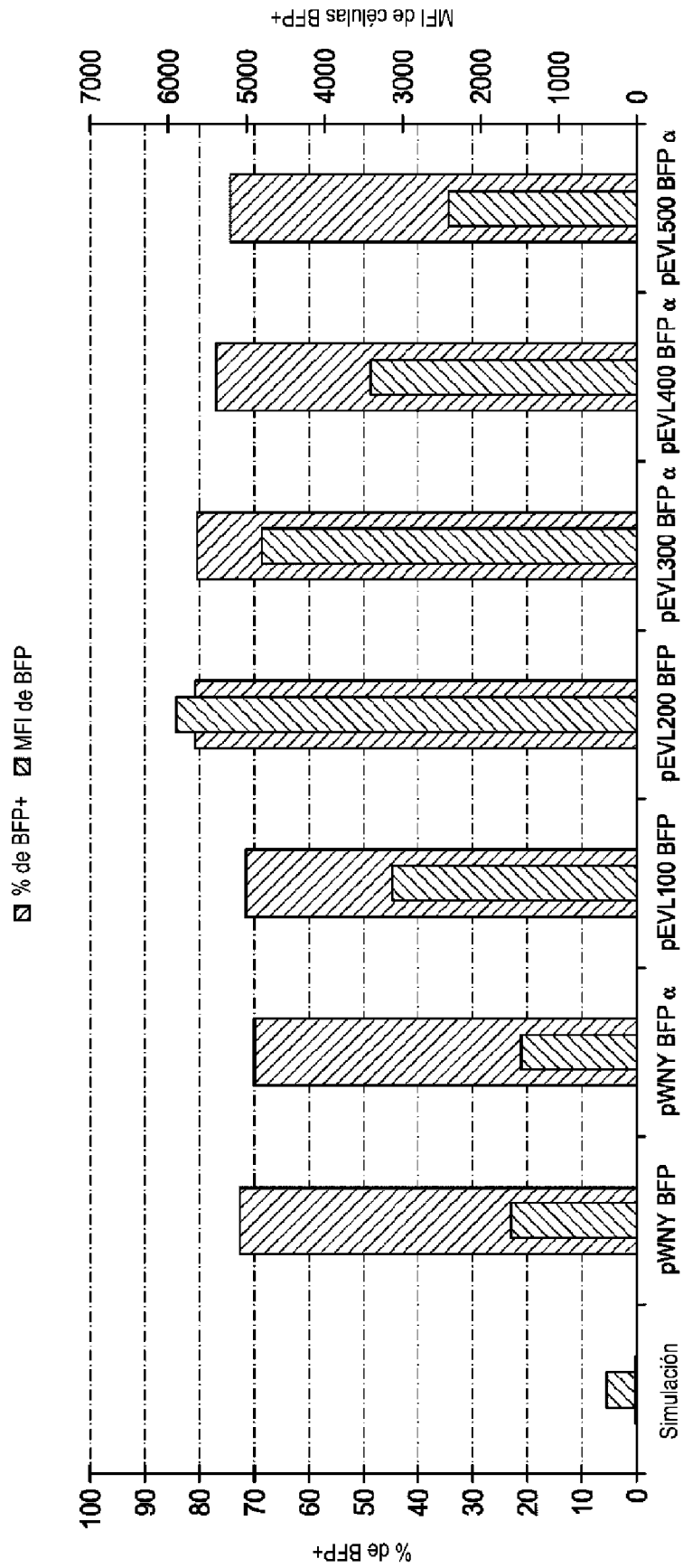


Figura 4

pA BFP enzimática y codificada frente al tiempo

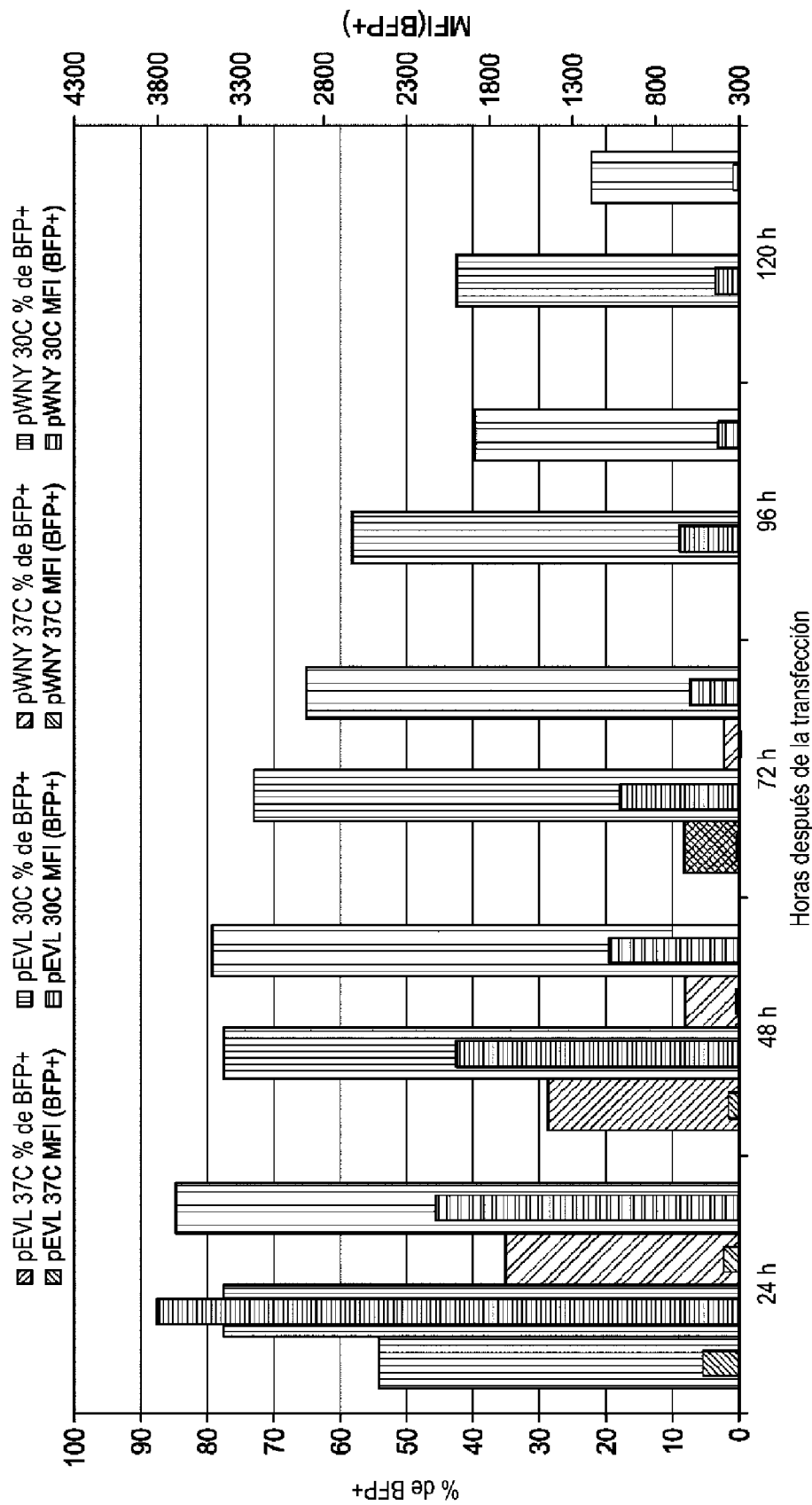


Figura 5

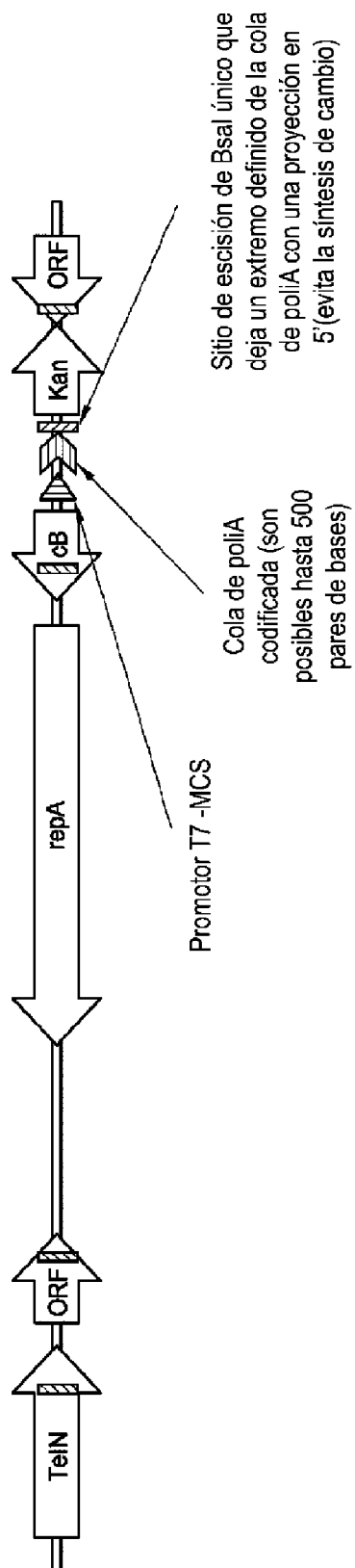


Figura 6A

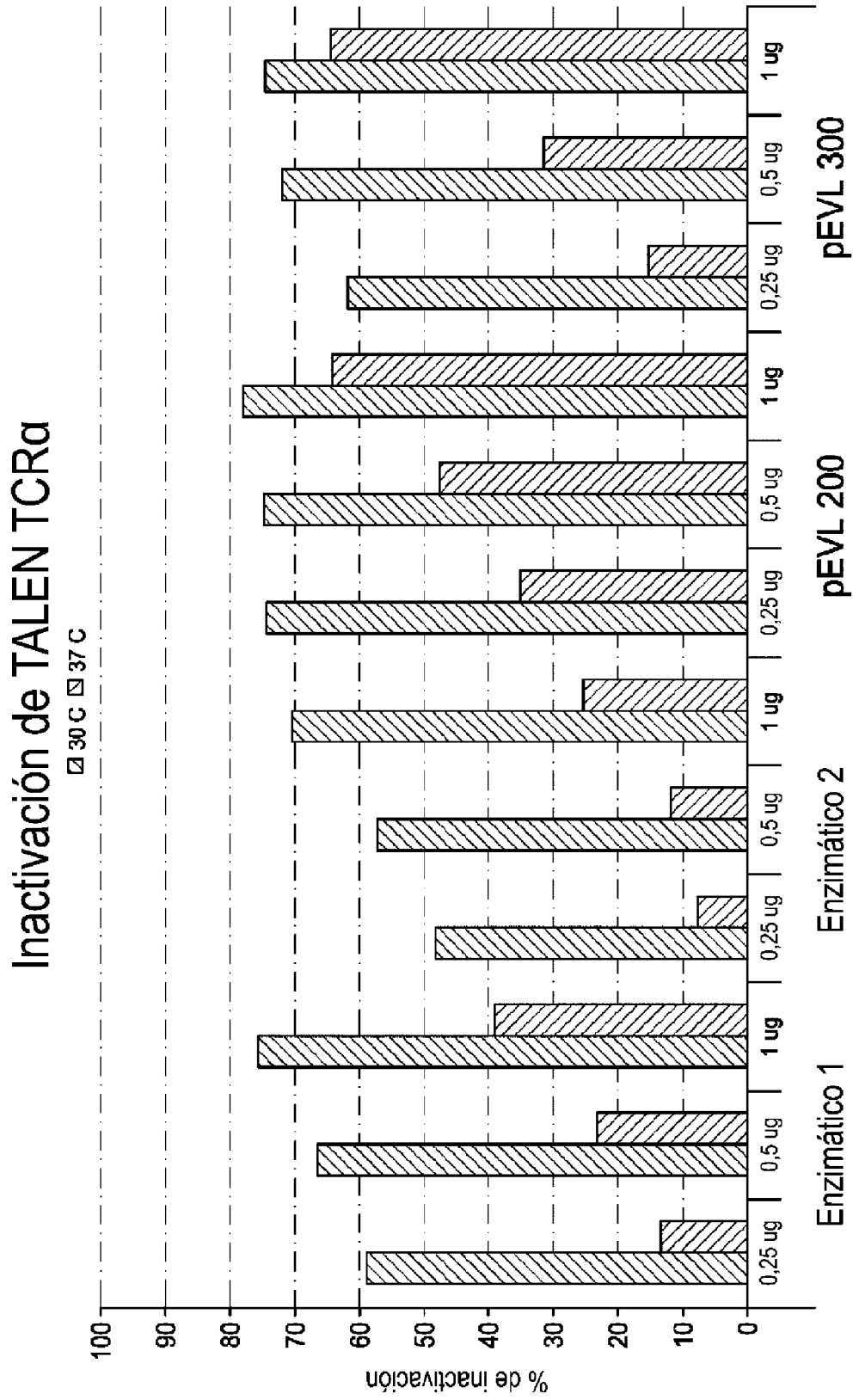


Figura 6B

TCRa CRISPR guía#4 genera el mayor TCRa-KO (inactivación)

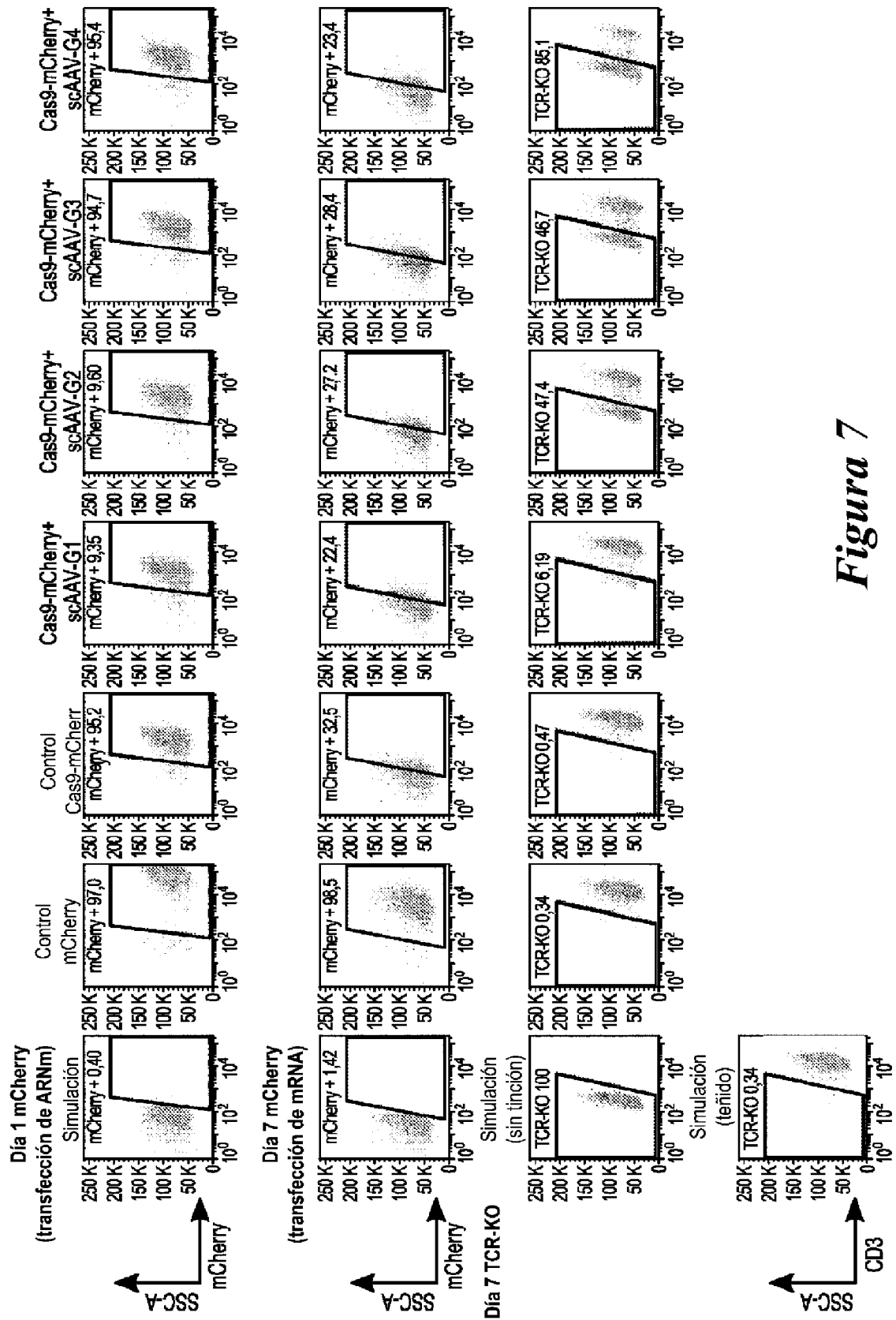


Figura 7

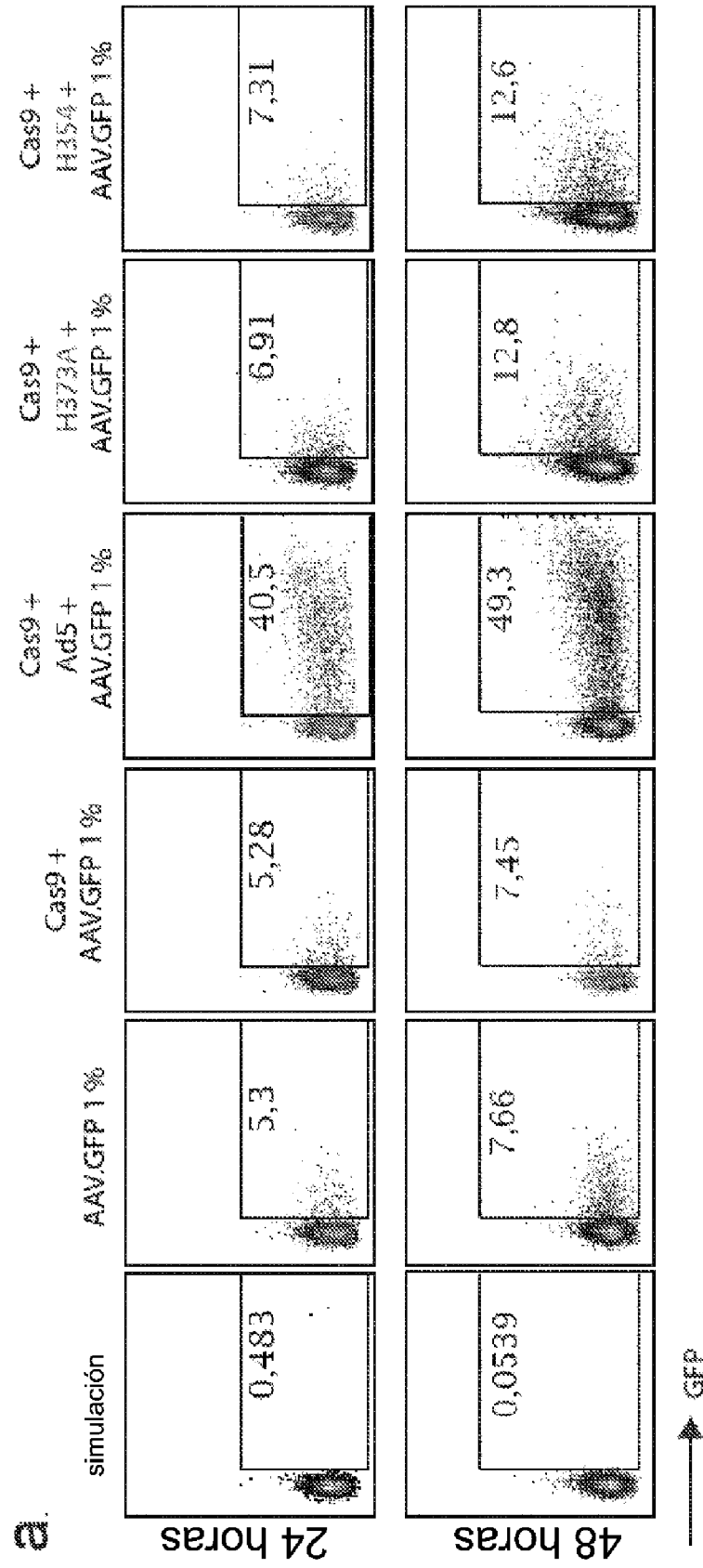


Figura 8

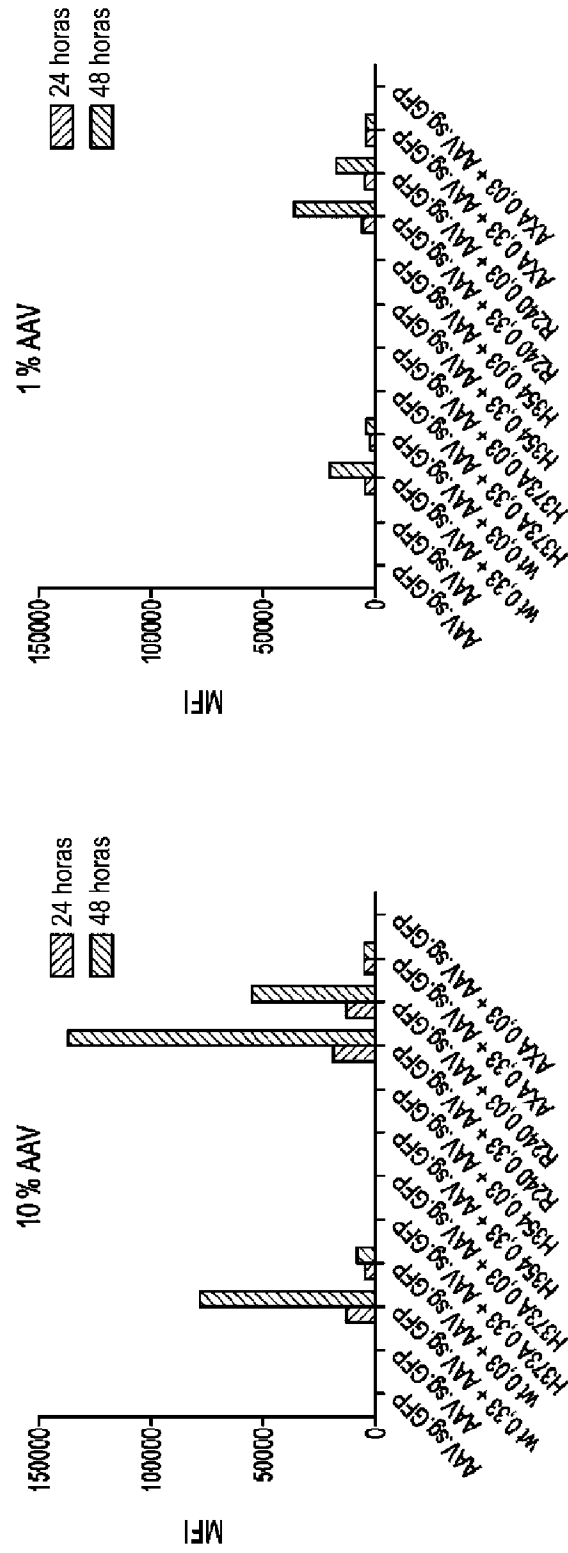


Figura 9

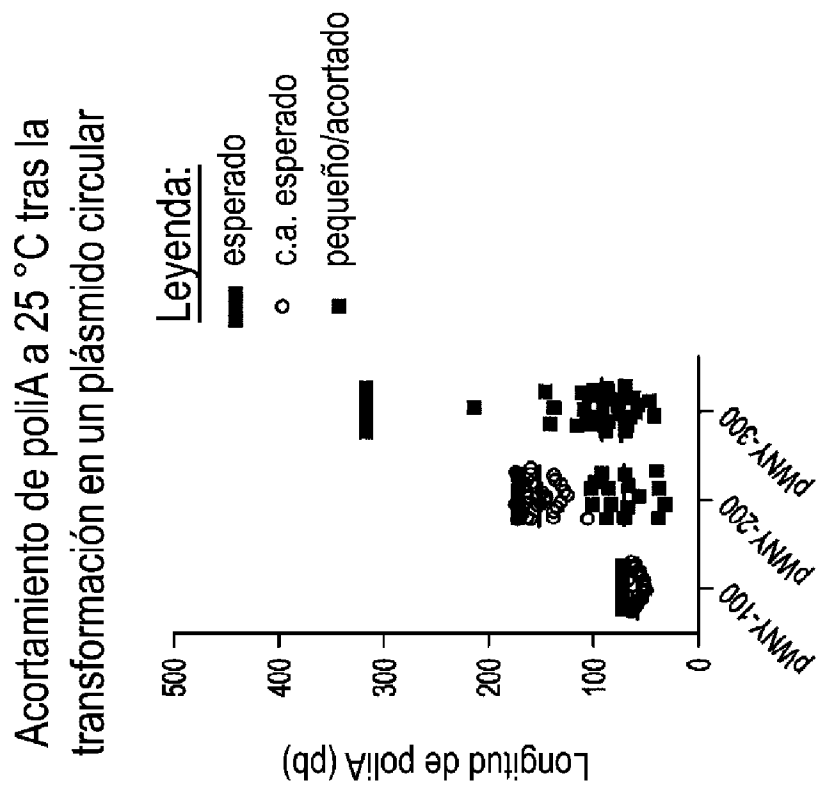


Figura 10

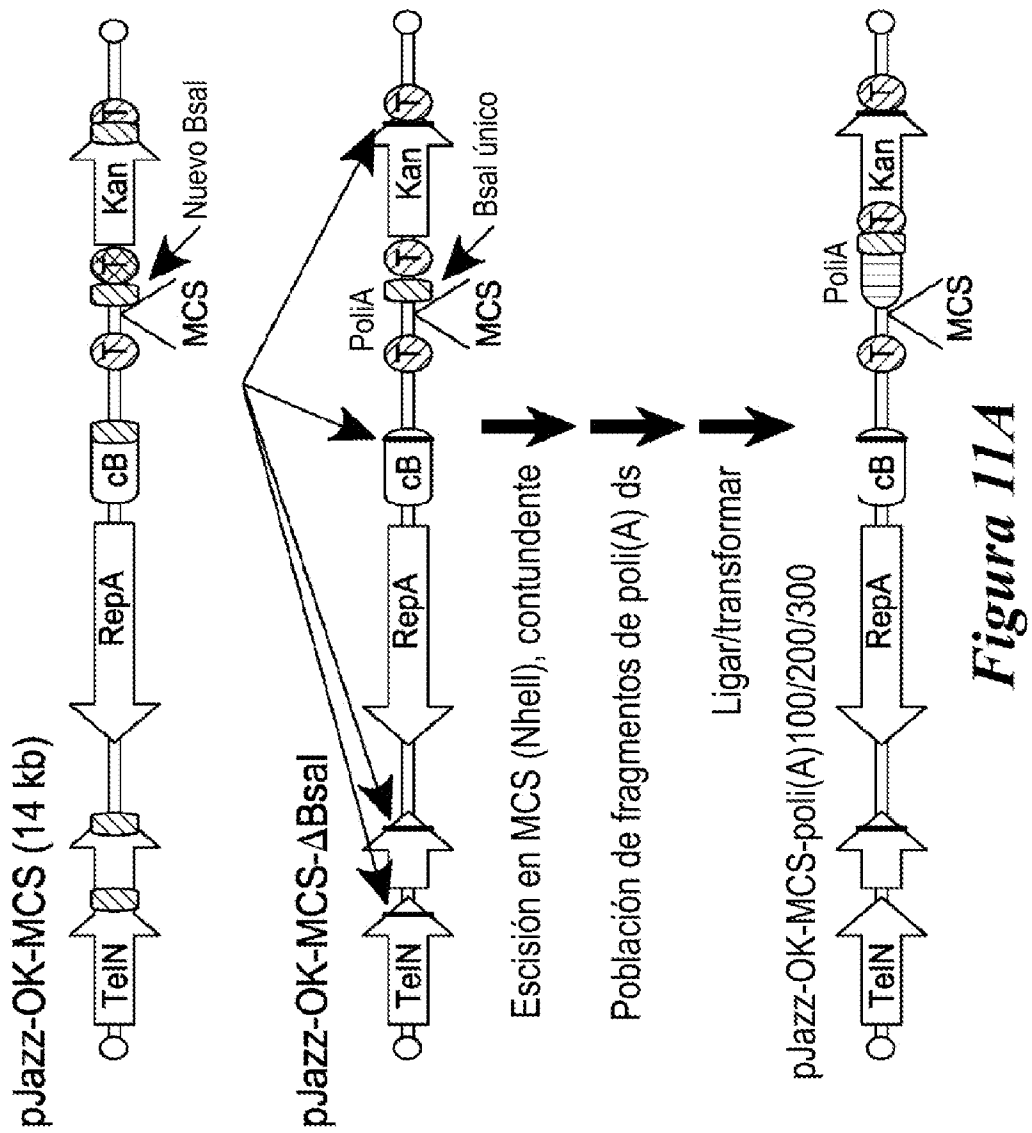


Figura 11A

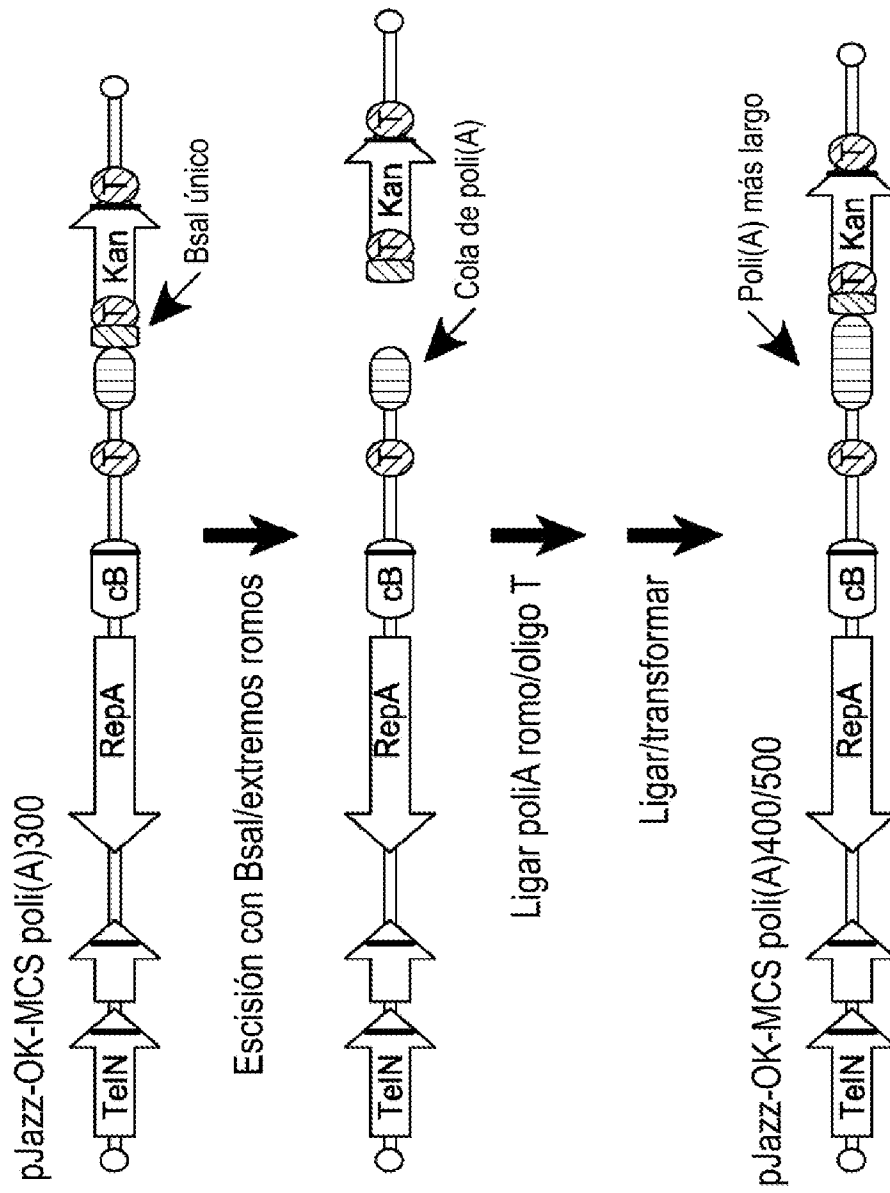


Figura 11B

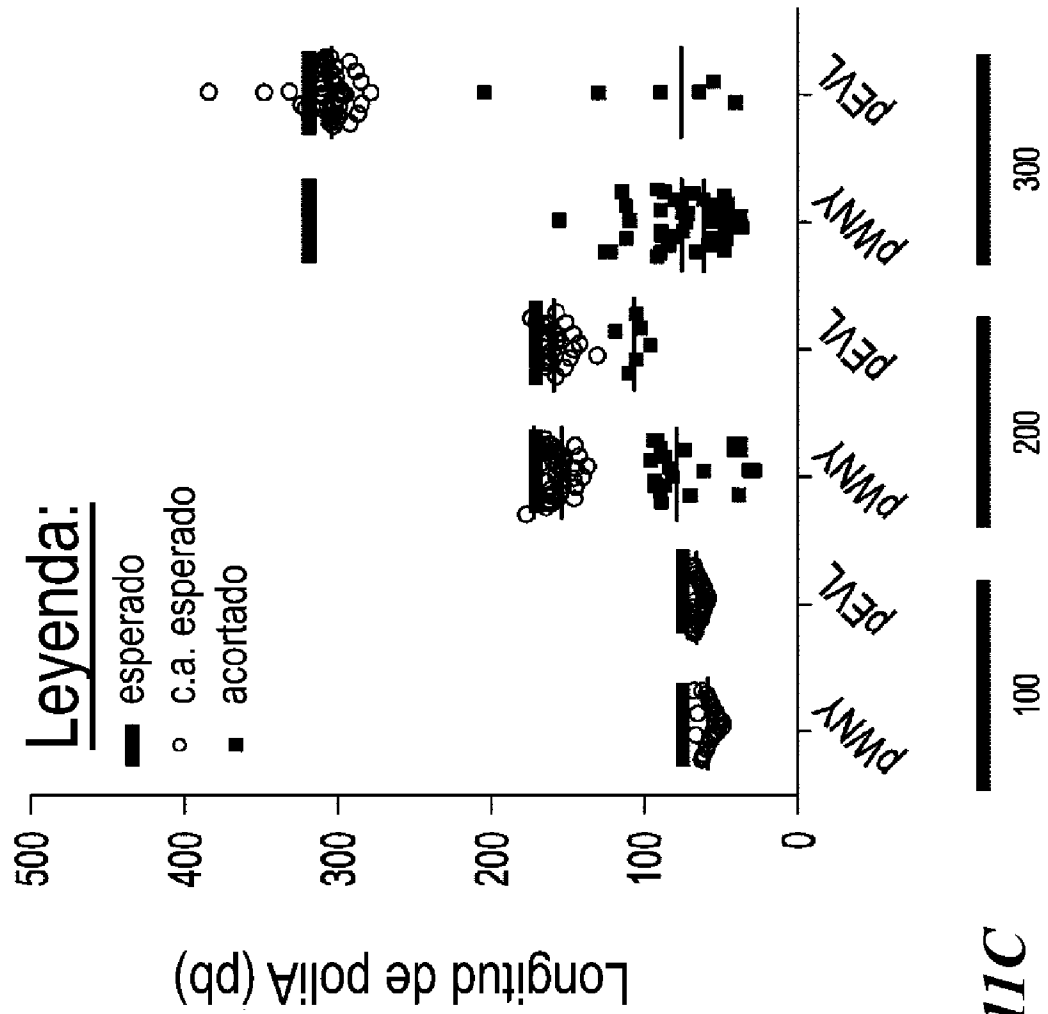


Figura 11C

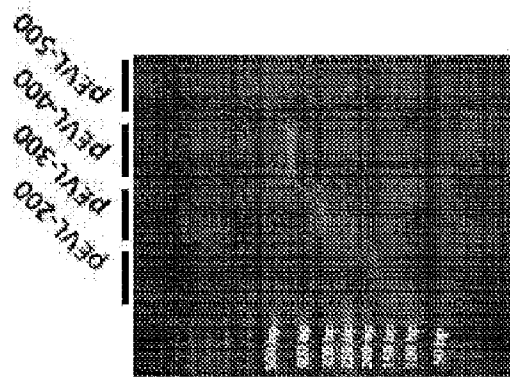


Figura 11D

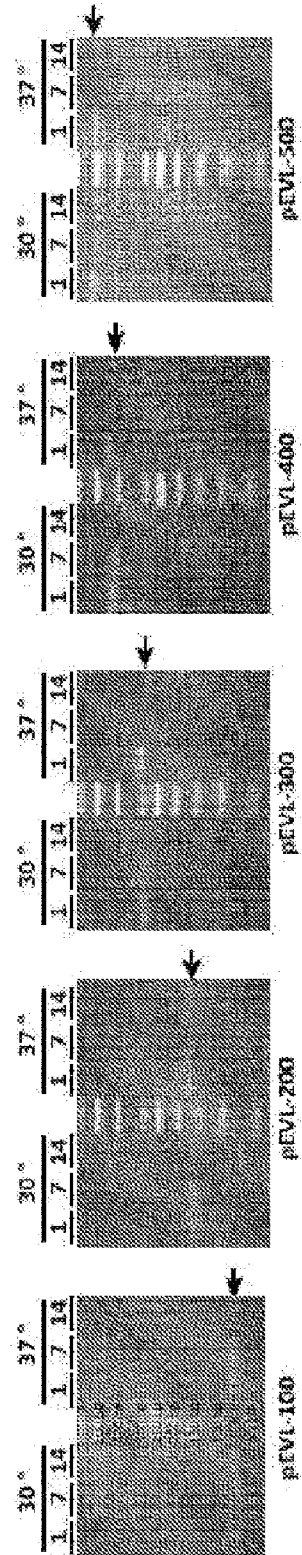


Figura 11E

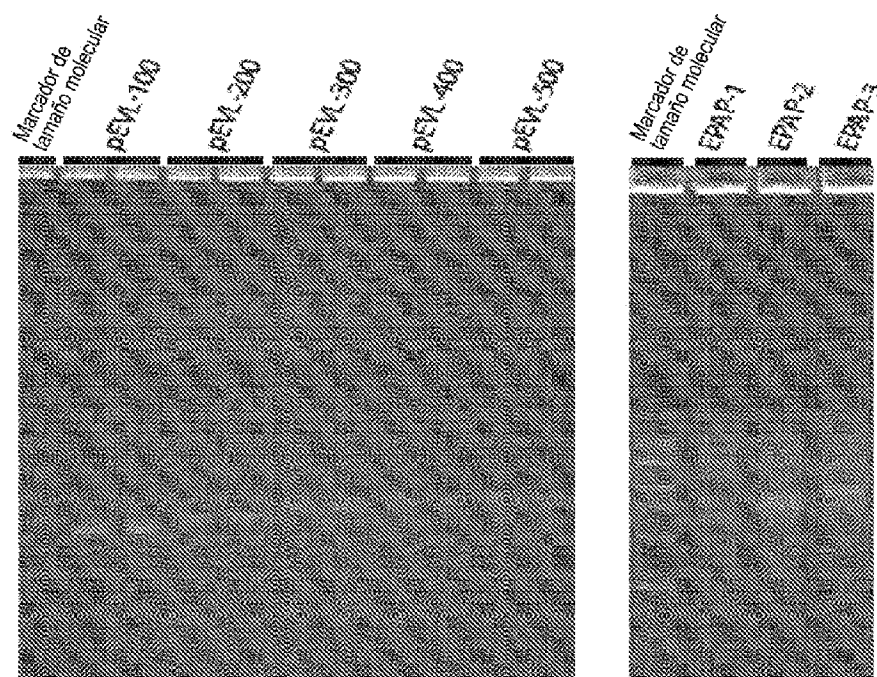


Figura 12A

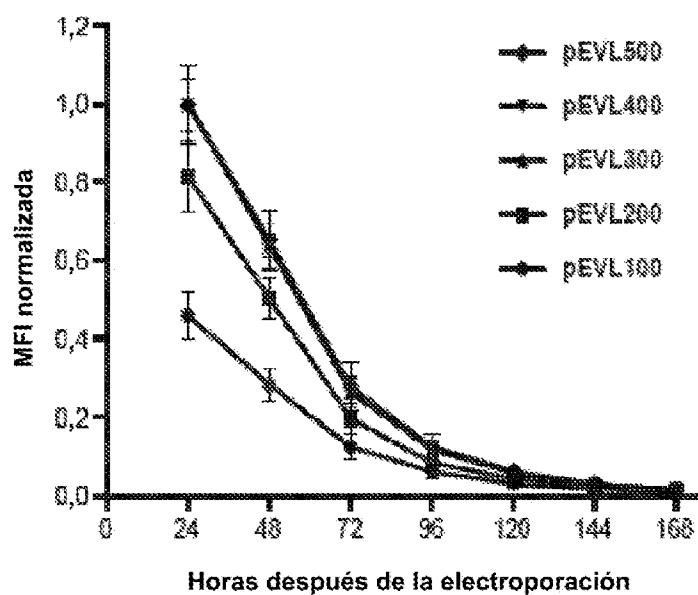


Figura 12B

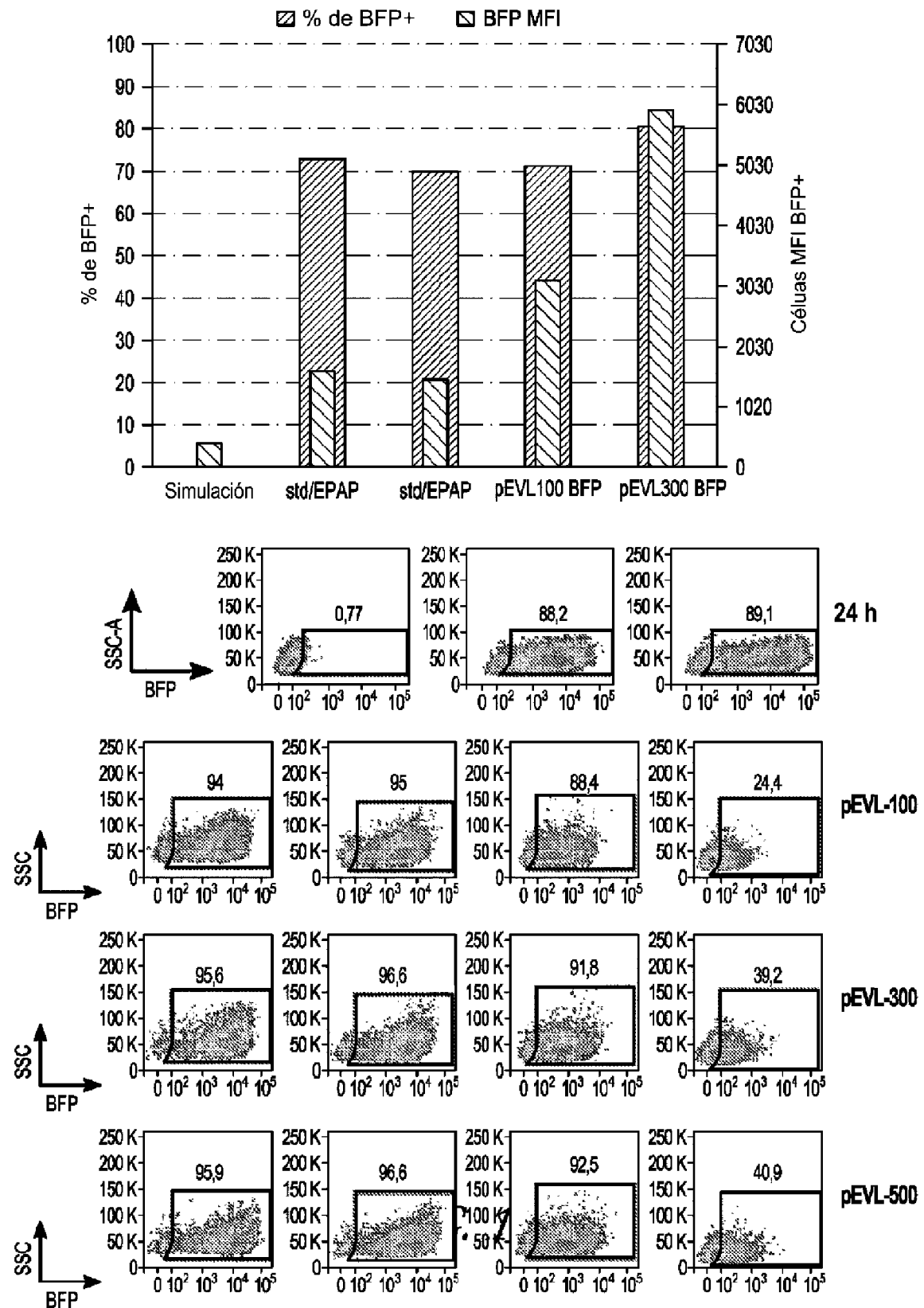


Figura 12B

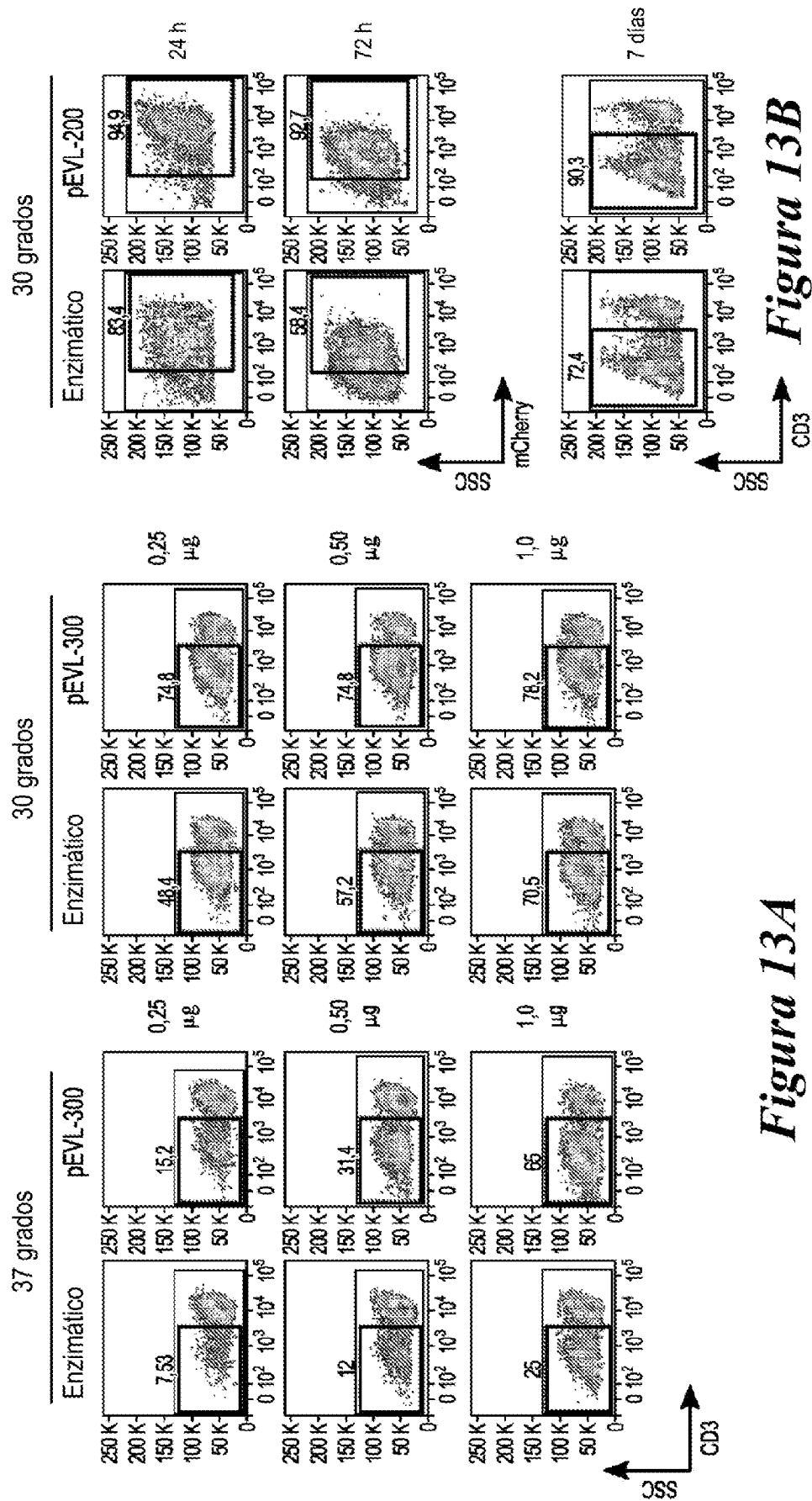


Figura 13A

Figura 13B

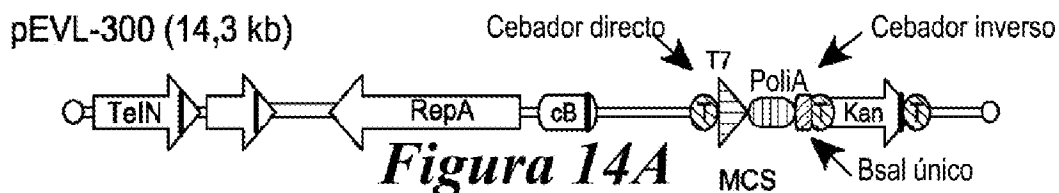


Figura 14A

Electroferograma de cebador directo

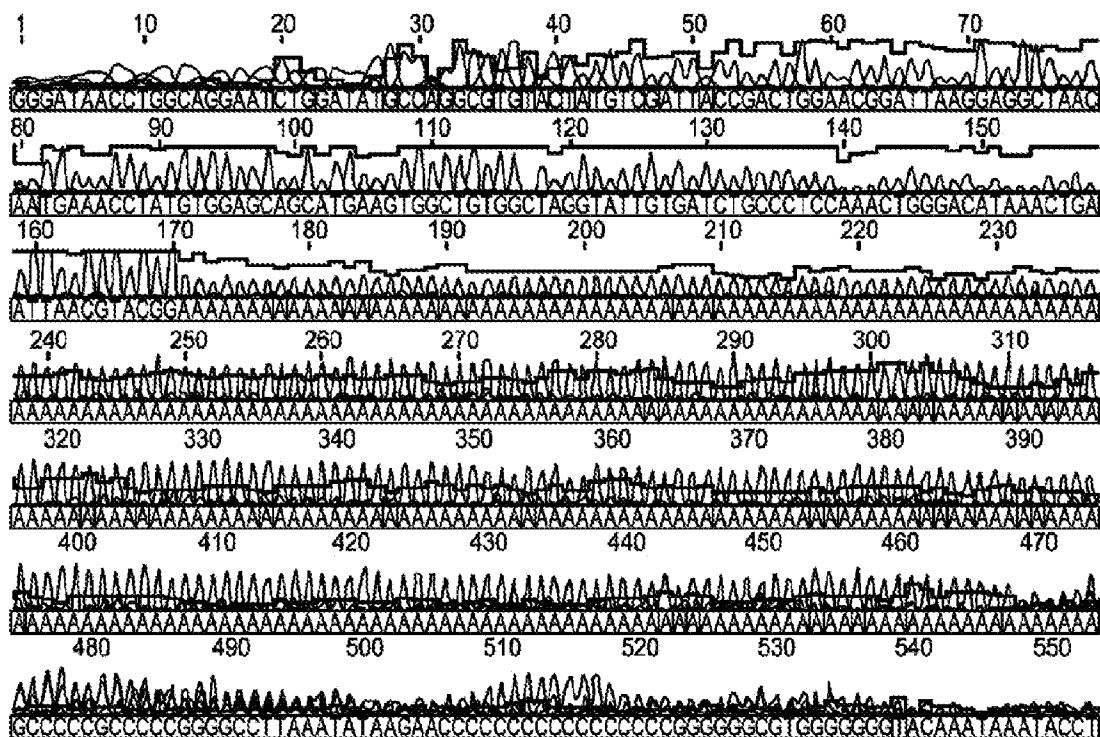


Figura 14B

Electroferograma de cebador inverso

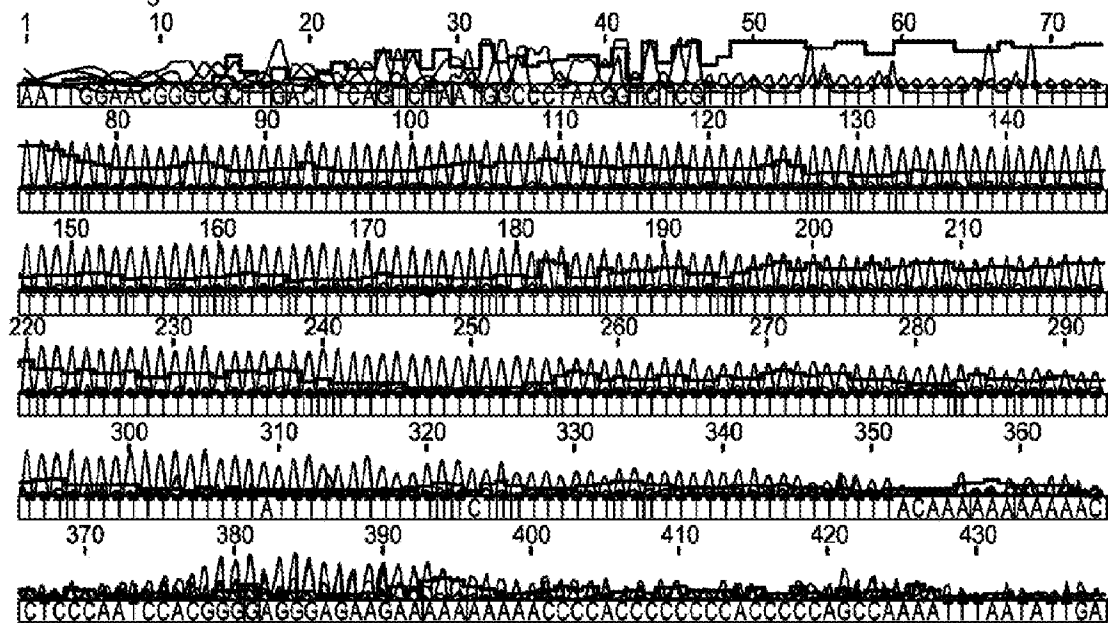


Figura 14C

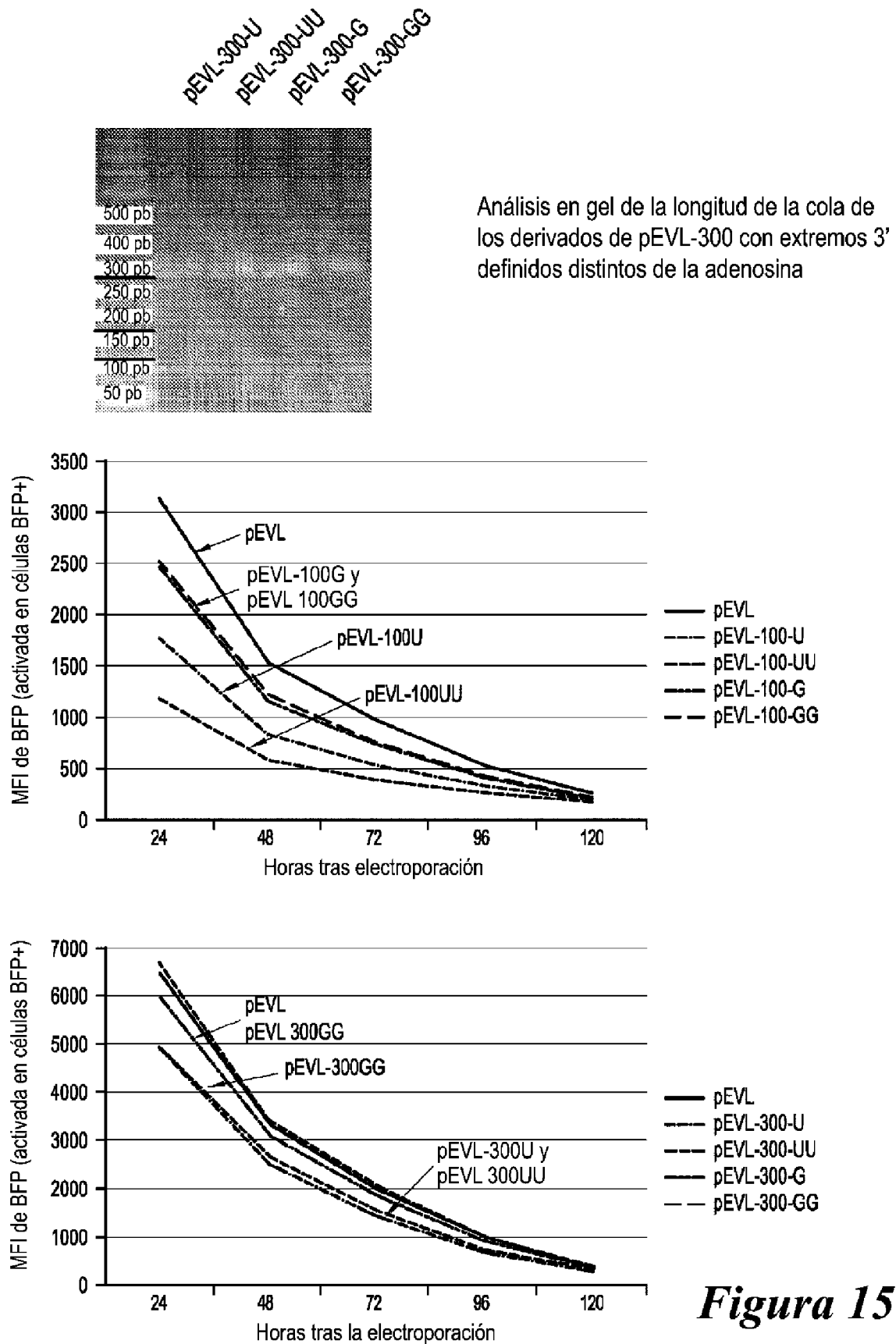


Figura 15

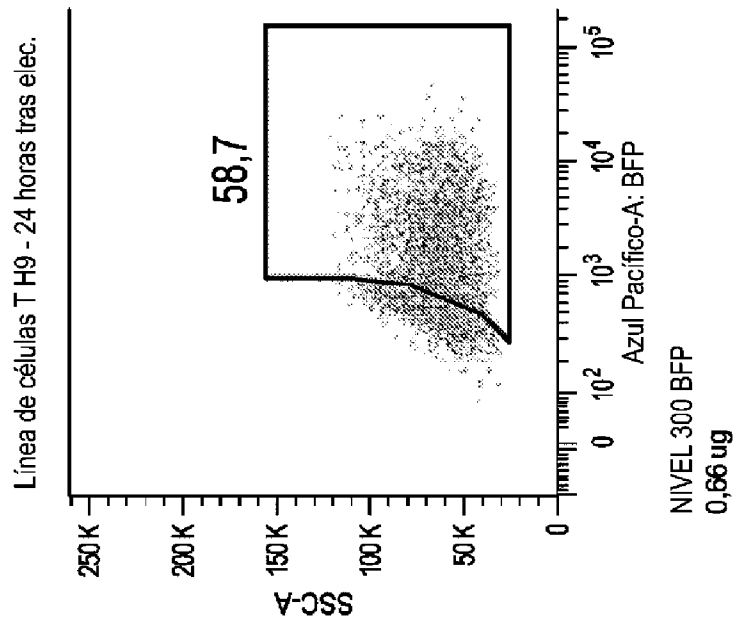


Figura 16

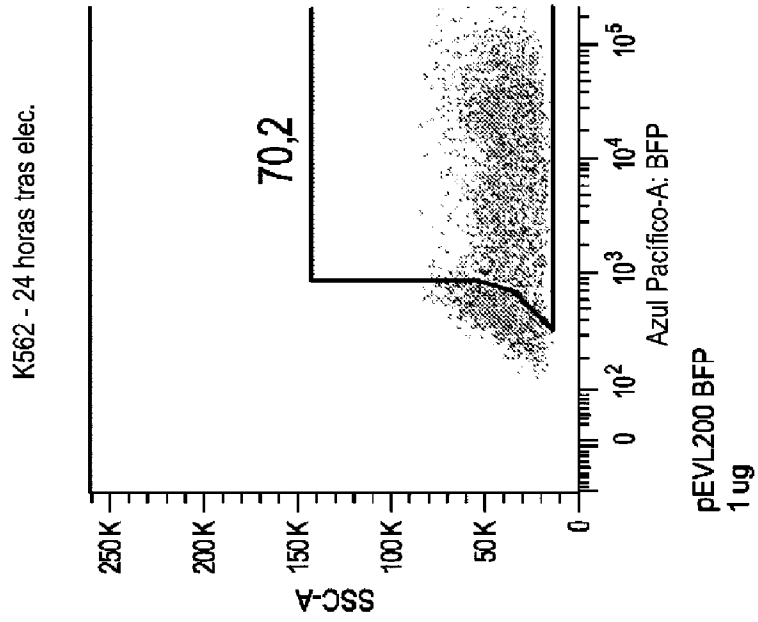


Figura 17

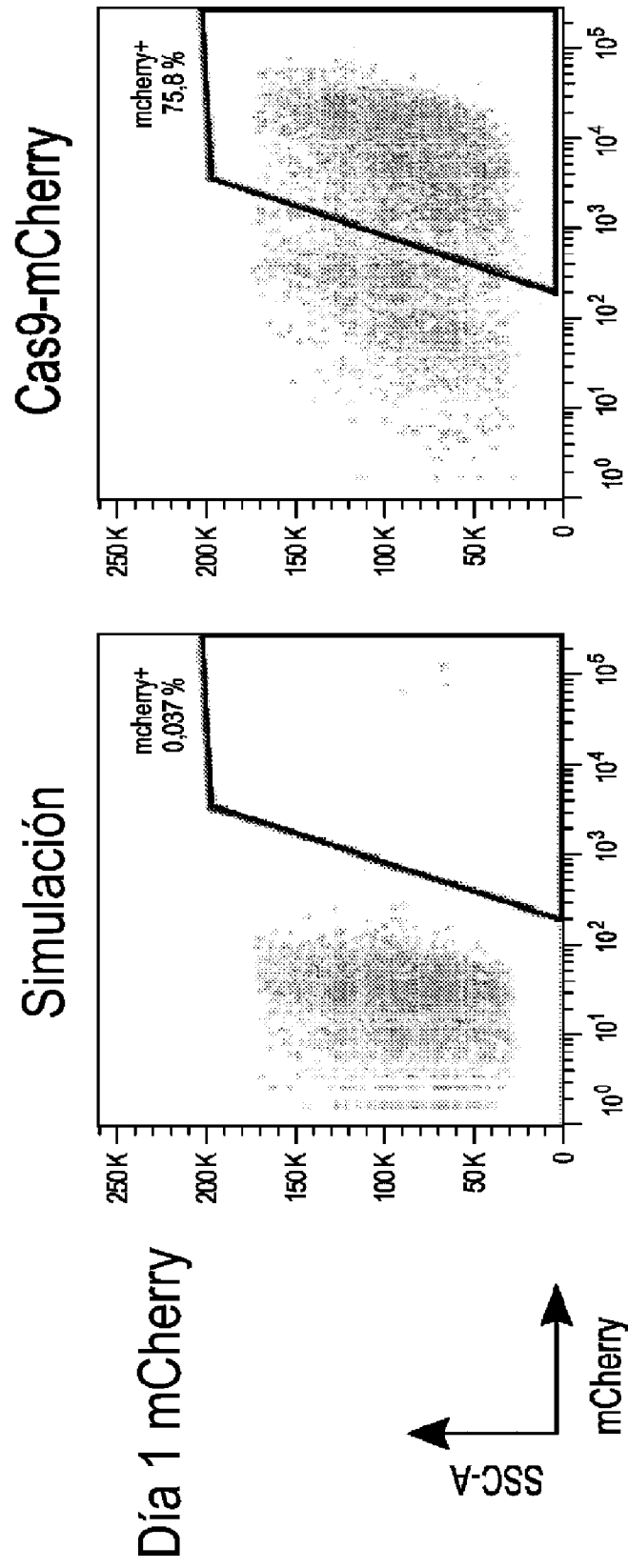


Figura 18

ARNm pEVL300 BFP en células HepG2

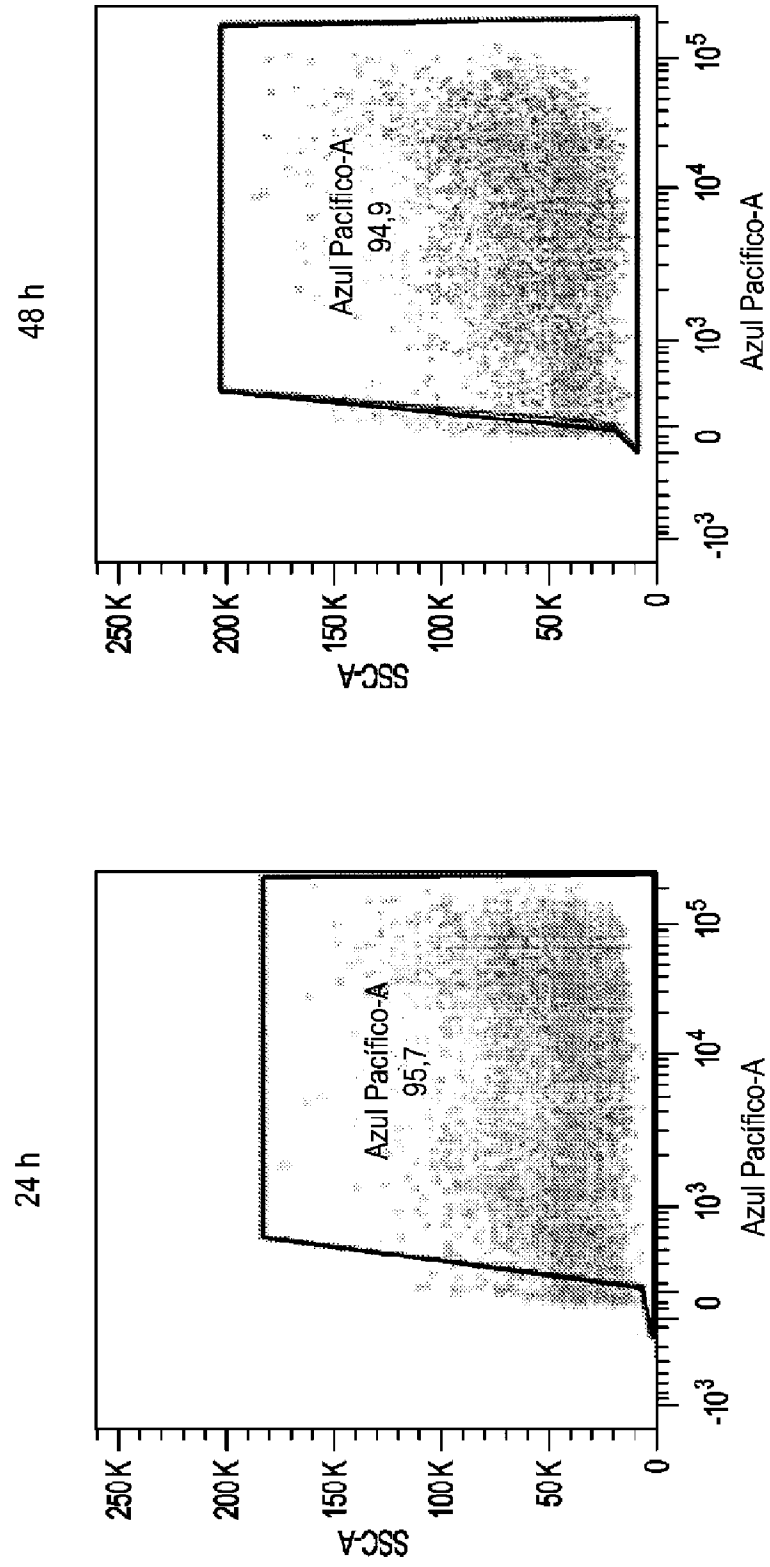


Figura 19

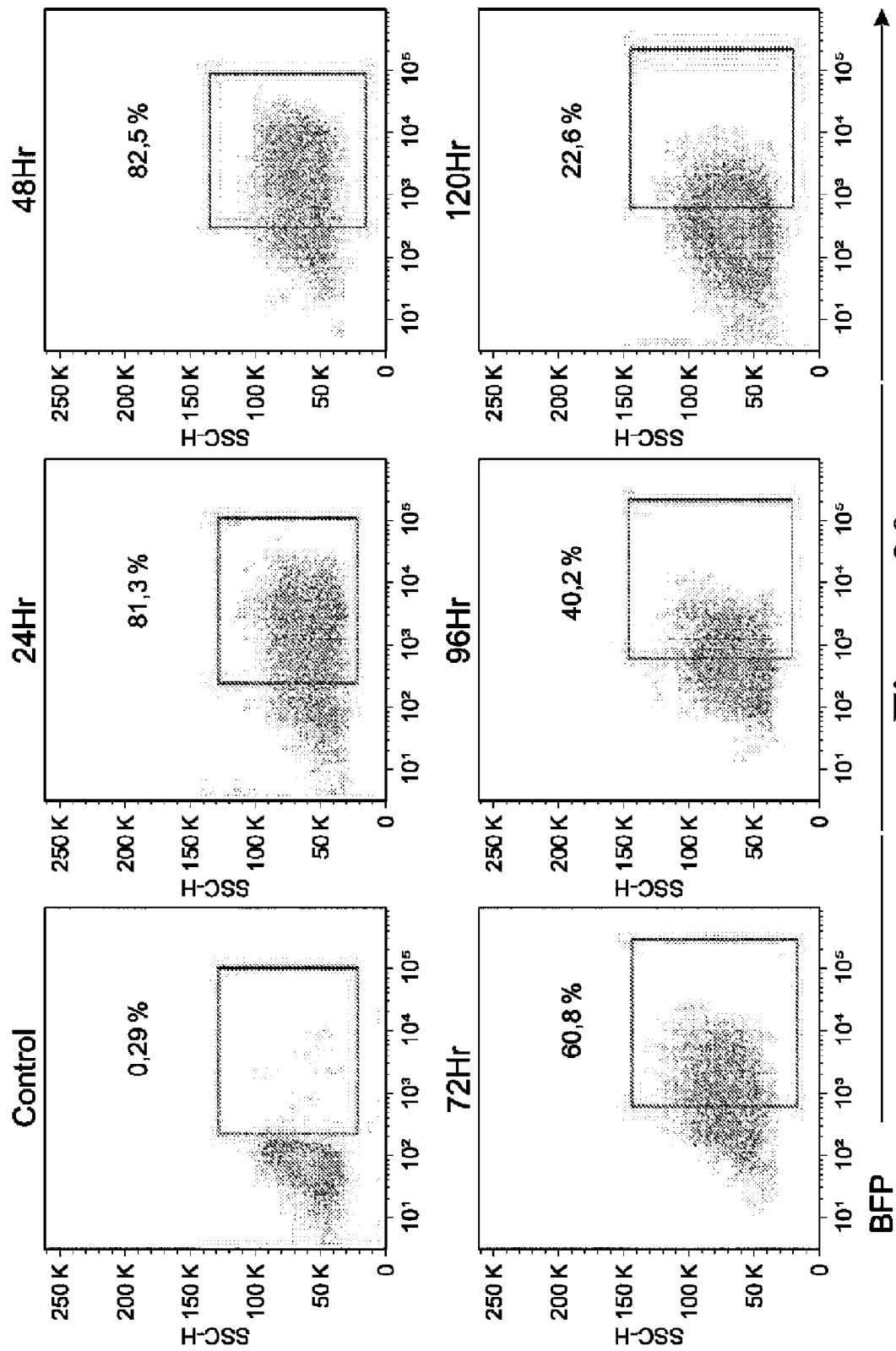


Figura 20