

REIVINDICACIONES

1. Un ARN guía único (ARNsg) que comprende una modificación del extremo 5' y una o más modificaciones en una o ambas de:
 - a. la región del tallo superior;
 - b. la región de horquilla 1 y
 - c. que comprende además modificaciones 2'-O-Me en cada uno de los nucleótidos en la región de horquilla 2en donde la modificación del extremo 5' comprende al menos dos enlaces fosforotioato (PS) dentro de los primeros siete nucleótidos en el extremo 5' del extremo 5'.
2. El ARNsg de la reivindicación 1, en donde la una o más modificaciones comprende un nucleótido 2'-Ometil (2'-O-Me) modificado, un nucleótido 2-fluoro (2'-F) modificado, o un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos.
3. El ARNsg de la reivindicación 1 o 2, en donde
 - a. el ARNsg comprende una o más modificaciones en la región del tallo superior en US1 a US12;
 - b. el ARNsg comprende una modificación en H1-1;
 - c. el ARNsg comprende modificaciones en H1-1 a H1-12; o
 - d. combinaciones de (a) a (c).
4. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además una región del tallo inferior que comprende una modificación.
5. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además una región terminal 3' que comprende una modificación.
6. El ARNsg de la reivindicación 5, en donde dos, tres, o todos de los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del terminal 3' se modifican.
7. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, que comprende además enlaces fosforotioato (PS) entre uno, dos, tres, o todos de los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del terminal 3'.

8. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además (1) una región de protuberancia que comprende una modificación; (2) una región nexo que comprende una modificación; o combinación de (1) y (2).
9. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde al menos los tres primeros nucleótidos del extremo 5' del terminal 5', y los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del terminal 3' se modifican.
10. El ARNsg de la reivindicación 9, en donde los primeros cuatro nucleótidos del extremo 5' del terminal 5', y los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del terminal 3' están enlazados con enlaces fosforotioato (PS).
11. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde los primeros cuatro nucleótidos del extremo 5' del terminal 5' y los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del terminal 3' están enlazados con un enlace PS, y en donde los tres primeros nucleótidos en el extremo 5' del terminal 5' y los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del terminal 3' comprenden modificaciones 2'-O-Me.
12. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde los primeros cuatro nucleótidos en el terminal 5' y los últimos cuatro nucleótidos en el terminal 3' están enlazados con un enlace PS, y en donde los tres primeros nucleótidos en el terminal 5' y los últimos tres nucleótidos en el terminal 3' comprenden modificaciones 2'-OMe, 2'-F, 2'-O-moe, o combinaciones de los mismos.
13. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde (1) uno o más de LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 o LS12 se modifican con 2'-O-Me; (2) cada uno de los nucleótidos de la región de protuberancia se modifican con 2'-O-Me; (3) 50% a 100% de los nucleótidos de la región de protuberancia se modifican con 2'-O-Me, o combinaciones de (1)-(3).
14. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde cada uno de los nucleótidos en la región del tallo superior se modifican con 2'-O-Me.
15. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde N15, N16, N17, N18, o combinaciones del mismo, en la región nexo se modifican con 2'-O-Me o 2'-F.
16. El ARNsg de la reivindicación 15, en donde N16, N17 y N18 se enlazan con enlaces PS.
17. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde cada uno de los nucleótidos en la región de horquilla 1 se modifican con 2'-O-Me.
18. El ARNsg de la reivindicación 1, que comprende:
 - a. Nucleótidos 2'-O-Me modificados en los tres primeros nucleótidos en el extremo 5' de la terminal 5';

- b. Nucleótidos 2'-O-Me modificados en US1-US12;
- c. Nucleótidos 2'-O-Me modificados en H1-1 – H1-12;
- d. Nucleótidos 2'-O-Me modificados en H2-1 – H2-15; Y
- e. Nucleótidos 2'-O-Me modificados en los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del terminal 3'.

19. El ARNsg de la reivindicación 18 que comprende además tres enlaces fosforotioato (PS) que enlazan los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del terminal 5' y tres enlaces PS que enlazan los últimos cuatro nucleótidos del extremo 3' del terminal 3'.

20. El ARNsg de la reivindicación 18 que comprende además al menos un enlace fosforotioato (PS) dentro de los primeros siete nucleótidos del extremo 5' del terminal 5'.

21. El ARNsg que comprende GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 355), en donde los nucleótidos de SEQ ID NO:355 se modifican de acuerdo con el patrón de modificación del ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

22. El ARNsg de la reivindicación 1, que comprende GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID No: 242), en donde U* indica que el nucleótido está unido al siguiente nucleótido con un enlace PS y mA, mG, mC o mU indica que el nucleótido está modificado con 2'-O-Me, donde N es cualquier nucleótido.

23. El ARNsg de la reivindicación 1, que comprende mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 358), donde N* o U* denota que el nucleótido está unido al siguiente nucleótido con un enlace PS y mN, mA, mG, mC o mU indica que el nucleótido está modificado con 2'-O-Me, donde N es cualquier nucleótido.

24. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 22-23, que comprende además tres enlaces fosforotioato (PS) que enlazan los primeros cuatro nucleótidos en el terminal 5' y tres enlaces PS que enlazan los últimos cuatro nucleótidos en el terminal 3'.

25. El ARNsg de la reivindicación 1, en donde el ARNsg comprende modificaciones 2'-OMe en cada nucleótido en la región del tallo superior.

26. El ARNsg de la reivindicación 1, que comprende los nucleótidos 2'-O-Me modificados en:
- los tres primeros nucleótidos del extremo 5' del terminal 5';
 - cada nucleótido en la región del tallo superior;
 - cada nucleótido en la región de horquilla 1;
 - el nucleótido entre la horquilla 1 y la horquilla 2; y
 - los últimos cuatro nucleótidos del extremo 3' del terminal 3'.
27. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde el ARNsg forma un complejo de ribonucleoproteína con un *S. pyogenes* Cas9.
28. Una composición que comprende el ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-26, que comprende además una nucleasa o un ARNm que codifica la nucleasa.
29. La composición de la reivindicación 28, (1) en donde la nucleasa es una proteína Cas; (2) en donde la nucleasa es una nicasa; (3) en donde la nucleasa es modificada; (4) en donde la nucleasa modificada comprende una señal de localización nuclear (NLS), o combinación de (1)-(4).
30. La composición de la reivindicación 29, en donde la proteína Cas9 es una *S. pyogenes* Cas 9.
31. Una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende el ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 28-30.
32. Una formulación farmacéutica que comprende el ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-27, o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 28-30 y un portador farmacéuticamente aceptable.
33. Un método de modificación de un ADN objetivo que comprende entregar una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica una proteína Cas, y cualquiera de los siguientes a una célula:
- el ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-27;
 - la composición de cualquiera de las reivindicaciones 28-30; o
 - la nanopartícula lipídica de la reivindicación 31; o
 - la formulación farmacéutica de la reivindicación 32.
34. El método de la reivindicación 33, en donde el método resulta en una inserción, una eliminación, o ambas en un gen.

35. El método de la reivindicación 33 o 34, que comprende además entregar a la célula una plantilla, en donde una parte o la totalidad de la plantilla se incorpora en un ADN objetivo en o cerca de un sitio de ruptura de doble cadena inducido por la proteína Cas.