

REIVINDICACIONES

1. Un ARN de guía único (ARNsg) que comprende
 - (i) (a) modificaciones de 2'-O-metil (2'-O-Me) en cada nucleótido en la región del tallo superior,

(b) modificaciones 2'-O-Me en cada nucleótido en la región de la horquilla 2, o

tanto (a) como (b); y
 - (ii) una modificación en el extremo 5' que comprende al menos dos enlaces fosforotioato (PS) dentro de los primeros siete nucleótidos en el extremo 5' del término 5''
2. El ARNsg de la reivindicación 1, que comprende además una región del tallo inferior que comprende una modificación en donde la modificación comprende una modificación 2'-O-Me, una modificación 2'-fluoro (2'-F), un enlace PS entre nucleótidos o combinaciones de los mismos.
3. El ARNsg de la reivindicación 1 o 2, que comprende además una región terminal 3' que comprende una modificación en donde la modificación comprende una modificación 2'-O-Me, una modificación 2'-fluoro (2'-F), un enlace PS entre nucleótidos o combinaciones de los mismos.
4. El ARNsg de la reivindicación 3, en donde dos, tres, o todos de los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del terminal 3' se modifican
5. El ARNsg de las reivindicaciones 3 o 4, que comprende además enlaces fosforotioato (PS) entre uno, dos, tres, o todos de los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del terminal 3'.
6. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, 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) en donde la modificación comprende una modificación 2'-O-Me, una modificación 2'-fluoro (2'-F), un enlace PS entre nucleótidos o combinaciones de los mismos.
7. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 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 en donde la modificación comprende una modificación 2'-O-Me, una modificación 2'-fluoro (2'-F), un enlace PS entre nucleótidos o combinaciones de los mismos.
8. El ARNsg de la reivindicación 7, 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).

9. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde los primeros cuatro nucleótidos del extremo 5' del terminal 5' y los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del 3' terminal 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.
10. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, 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.
11. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, 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).
12. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde cada uno de los nucleótidos en la región del tallo superior se modifican con 2'-O-Me.
13. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el sgRNA comprende además una región nexo que comprende los nucleótidos N1 a N18 desde el extremo 5' hasta el extremo 3' del mismo, y N15, N16, N17, N18, o combinaciones de los mismos en la región nexo se modifican con 2'-O-Me o 2'-F.
14. El ARNsg de la reivindicación 13, en donde N16, N17 y N18 se enlazan con enlaces PS.
15. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde cada uno de los nucleótidos en la región de horquilla 1 se modifican con 2'-O-Me.
16. El ARNsg de la reivindicación 1 en donde la región de tallo superior comprende US1 a US12 desde el extremo 5' hasta el extremo 3' de la misma, la región de la horquilla 1 comprende H1-1 a H1-12 desde el extremo 5' hasta el extremo 3' de la misma y la región de la horquilla 2 comprende H2-1 a H2-15 desde el extremo 5' hasta el extremo 3' del mismo, y el sgARN 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'.

17. El ARNsg de la reivindicación 16 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'.
18. El ARNsg que comprende GUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (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 17.
19. El ARNsg de la reivindicación 1, que comprende GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*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.
20. El ARNsg de la reivindicación 1, que comprende mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*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.
21. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, 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'.
22. El ARNsg de la reivindicación 1, en donde el ARNsg comprende modificaciones 2'-OMe en cada nucleótido en la región del tallo superior.
23. 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'.

24. El ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde el ARNsg forma un complejo de ribonucleoproteína con un *S. pyogenes* Cas9.
25. Una composición que comprende el ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, que comprende además una nucleasa o un ARNm que codifica la nucleasa.
26. La composición de la reivindicación 25, (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).
27. La composición de la reivindicación 26, en donde la proteína Cas9 es una *S. pyogenes* Cas 9.
28. Una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende el ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-24 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 25-27.
29. Una formulación farmacéutica que comprende el ARNsg de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 25-27 y un portador farmacéuticamente aceptable.