# ARN GUÍA MODIFICADOS QUE COMPRENDEN UN CONECTOR INTERNO PARA MODIFICACIÓN DEL GENOMA

[001] Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud provisional de EE. UU. n.° 63/209 273, presentada el 10 de junio de 2021, y a la solicitud provisional de EE. UU. n.° 63/275 427, presentada el 3 de noviembre de 2021, cuyo contenido se incorpora mediante esta referencia en su totalidad.

[002] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó de forma electrónica en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Dicha copia ASCII, creada el 8 de junio de 2022, lleva el nombre 2022-06-08_01155-0047-00PCT_ST25.txt y tiene un tamaño de 501 605 bytes.

[003] Esta divulgación se relaciona con el campo de la edición de genoma con sistemas CRISPR/Cas, una parte del sistema inmunológico procariota que reconoce y corta elementos genéticos exógenos.

[004] El sistema CRISPR/Cas procariota depende de nucleasas, que tienen actividad de unión a ARN y ADN, o una subunidad de unión a ADN de dicho complejo, en donde la actividad de unión a ADN es específica para una secuencia y depende de la secuencia del ARN. Dichos complejos, a los que a menudo se hace referencia como agentes de unión a ADN guiados por ARN, incluyen varios agentes de unión a ADN guiados por ARN que incluyen nickasas o escisiones de Cas. Las cleavasas Cas y nickasas Cas incluyen complejo de Csm o Cmr de un sistema CRISPR de tipo III, la subunidad Cas10, Csm1 o Cmr2 de este, un complejo de cascada de un sistema CRISPR de tipo I, la subunidad Cas3 de este y nucleasas Cas de clase 2. Los ejemplos de nucleasas monoméricas, como Cas9, denominada proteína 9 asociada a CRISPR (Cas9), inducen roturas específicas de sitio en el ADN. Los ARN guía se preparan habitualmente mediante síntesis de oligonucleótidos *in vitro*. Dada la naturaleza cíclica y el rendimiento imperfecto de la síntesis de oligonucleótidos, sería deseable sustituir un conector interno que no sea de ácido nucleico con porciones del ARNg, al tiempo que se mantiene o incluso se mejora su actividad, por ejemplo, de modo que el ARNg pueda obtenerse con mayor rendimiento (por ejemplo, debido a menos ciclos de adición de nucleótidos), o las composiciones que comprenden el ARNg tienen mayor homogeneidad o menos productos incompletos o erróneos. Además, se desean métodos y composiciones

mejorados para prevenir dicha degradación, mejorar la estabilidad de los ARNg y mejorar la eficiencia de la edición del genoma, especialmente para aplicaciones terapéuticas.

## COMPENDIO

[005] En algunas modalidades, se proporcionan herramientas de edición del genoma que comprenden ARN guía (ARNg) que comprende un conector interno como se describe en el presente documento. La presente solicitud surge de los hallazgos de que un conector que no es de ácido nucleico puede reemplazar ciertas porciones internas de los ARN guía que tienen contactos no esenciales con la nucleasa Cas. Las sustituciones descritas en el presente documento pueden facilitar la síntesis del ARNg con mayor rendimiento u homogeneidad; o pueden mejorar la estabilidad del ARNg y su nucleasa correspondiente, por ejemplo, el complejo ARNg/Cas y mejorar la actividad de un Cas9 (por ejemplo, SauCas9, SpyCas9, CdiCas9, St1Cas9, SthCas9, AceCas9, CjeCas9, RpaCas9, RruCas9, AnaCas9, NmeCas9), Cas12 (p. ej., AsCas12a, LbCpf1) o Cas13 (p. ej., EsCas13d) para modificar el ADN objetivo.

[006] En algunas modalidades, se proporciona un ARN guía único (ARNsg) con una o más sustituciones para incluir uno o más conectores internos como se describe en el presente documento.

[007] En algunas modalidades, se proporcionan ARNcrispr (ARNcr) o ARNtracr (ARNtr) con una o más sustituciones para incluir uno o más conectores internos como se describe en el presente documento. En algunas modalidades, el ARNcr modificado o ARNtr modificado comprende un ARN guía dual (ARNdg). En algunas modalidades, el ARNcr modificado o ARNtr modificado comprende un ARN guía único (ARNsg). Las sustituciones con uno o más conectores internos como se describe en el presente documento pueden facilitar la síntesis del ARNg con mayor rendimiento u homogeneidad; o pueden mejorar la estabilidad del ARNg y su nucleasa correspondiente, por ejemplo, el complejo ARNg/Cas, por ejemplo, el complejo ARNg/Cas9, y mejorar la actividad de la nucleasa, por ejemplo, una nucleasa Cas9 (por ejemplo, SauCas9, SpyCas9), por ejemplo, para escindir o mellar el ADN objetivo. En comparación con las guías compuestas por todos los nucleótidos, por ejemplo, ARNsg Spy Cas 9 de 100 unidades u otros ARN Spy Cas9 de guía corta, la síntesis de los ARN guía actualmente divulgados puede aumentar el rendimiento bruto de un ARN guía.De manera similar, se puede aumentar la pureza de la muestra de ARNg medida por la proporción de

producto completo, por ejemplo, la pureza del material bruto. El ARNg se puede obtener con mayor rendimiento, o las composiciones que comprenden el ARNg pueden tener una mayor homogeneidad o menos productos incompletos o erróneos. La pureza del ARN guía se puede evaluar utilizando cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa de pares iónicos (IP-RP-HPLC) y métodos de HPLC de intercambio iónico, por ejemplo, como en Kanavarioti et ál, *Sci Rep* **9**, 1019 (2019) (doi:10.1038/ s41598-018-37642-z). Usando espectroscopía UV a una longitud de onda de 260 nm, la pureza bruta y la pureza final se pueden determinar mediante la relación entre la absorbancia del pico principal y la absorbancia acumulada de todos los picos en el cromatograma. El rendimiento sintético se determina como la relación entre la absorbancia a 260 nm de la muestra final en comparación con la absorbancia teórica de los materiales de entrada.

[008] Se abarcan las siguientes modalidades.

[009] En algunas modalidades, se proporciona un ARN guía (ARNg) que comprende un conector interno. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 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 o 28 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 3 a 30, opcionalmente, de 12 a 21 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 18 átomos, opcionalmente, de 6 a 12 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye de 2 a 12 nucleótidos.

[0010] En algunas modalidades, el conector interno está en una región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 4 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye hasta 28 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[0011] En algunas modalidades, el conector interno está en una región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 2 nucleótidos de la región horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye hasta 22

nucleótidos de la región horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 pares de bases de la región horquilla del ARNg.

[0012] En algunas modalidades, el conector interno está en una región de nexo del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 1 o 2 nucleótidos de la región de nexo del ARNg.

[0013] En algunas modalidades, el conector interno está en una horquilla entre una primera porción del ARNg y una segunda porción del ARNg, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex. En algunas modalidades, el conector interno une una primera porción de un dúplex y una segunda porción de un dúplex, en donde el dúplex comprende de 2 a 10 pares de bases.

[0014] En algunas modalidades, el ARNg comprende dos conectores internos. En algunas modalidades, el ARNg comprende tres conectores internos.

[0015] En algunas modalidades, se proporciona un ARN guía único (ARNsg), y el ARNsg comprende una región guía y una porción conservada en 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región nexo, una región de horquilla 1 y una región de horquilla 2, y comprende al menos uno de:

1) un primer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de una región del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición;
2) un segundo conector interno que sustituye 1 o 2 nucleótidos de la región de nexo; y
3) un tercer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la horquilla 1.

[0016] En algunas modalidades, se proporciona un ARN guía único (ARNsg), y el ARNsg comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región horquilla 1 y una región horquilla 2, y comprende también al menos uno de:

1) un primer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de una región del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición del ARNsg;
2) un segundo conector interno que sustituye 1 o 2 nucleótidos de la horquilla 1 del ARNsg; o

3) un tercer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la horquilla 2 del ARNsg.

[0017] En algunas modalidades, se proporciona un ARN guía (ARNg), y el ARNg comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región de horquilla 1 y una región de horquilla 2, y comprende un primer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición y un segundo conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la región de horquilla 2.

[0018] En algunas modalidades, se proporciona un ARN guía (ARNg), y el ARNg comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición y una región horquilla, y comprende un conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición.

[0019] En algunas modalidades, se proporciona un ARN guía (ARNg), y el ARNg comprende una región de repetición y antirrepetición y un conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición.

[0020] En algunas modalidades, el conector interno comprende al menos dos subunidades de etilenglicol unidas covalentemente entre sí.

[0021] La siguiente es una lista no exhaustiva de las modalidades proporcionadas en el presente documento.

[0022] La modalidad 1 es un ARN guía (ARNg) que comprende un conector interno.

[0023] La modalidad 2 es el ARNg de la modalidad 1, en donde el conector interno sustituye al menos 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 o 28 nucleótidos del ARNg.

[0024] La modalidad 3 es el ARNg de la modalidad 1 o 2, en donde el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 3 a 30 átomos, opcionalmente, de 12 a 21 átomos, y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg.

[0025] La modalidad 4 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 3, en donde el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 18 átomos, opcionalmente, de 6 a 12 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg.

[0026] La modalidad 5 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 4, en donde el conector interno sustituye de 2 a 12 nucleótidos.

[0027] La modalidad 6 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 5, en donde el conector interno está en una región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[0028] La modalidad 7 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 6, en donde el conector interno sustituye al menos 4 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[0029] La modalidad 8 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 7, en donde el conector interno sustituye hasta 28 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[0030] La modalidad 9 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 8, en donde el conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[0031] La modalidad 10 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 9, en donde el conector interno está en una región de horquilla del ARNg.

[0032] La modalidad 11 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 10, en donde el conector interno sustituye al menos 2 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg.

[0033] La modalidad 12 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 11, en donde el conector interno sustituye hasta 22 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg.

[0034] La modalidad 13 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 12, en donde el conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg.

[0035] La modalidad 14 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde el conector interno sustituye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 pares de bases de la región de horquilla del ARNg.

[0036] La modalidad 15 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 14, en donde el conector interno está en una región nexo del ARNg.

[0037] La modalidad 16 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 15, en donde el conector interno sustituye 1 o 2 nucleótidos de la región nexo del ARNg.

[0038] La modalidad 17 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 16, en donde el conector interno está en una región de horquilla entre una primera porción del ARNg y una

segunda porción del ARNg, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[0039] La modalidad 18 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 17, en donde el conector interno une una primera porción de un dúplex y una segunda porción de un dúplex, en donde el dúplex comprende de 2 a 10 pares de bases.

[0040] La modalidad 19 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 18, en donde el ARNg comprende dos conectores internos.

[0041] La modalidad 20 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 18, en donde el ARNg comprende tres conectores internos.

[0042] La modalidad 21 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 20, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición está en una horquilla entre una primera porción y una segunda porción de la región de repetición y antirrepetición, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[0043] La modalidad 22 es el ARNg de la modalidad 21, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye 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 o 28 nucleótidos de la horquilla.

[0044] La modalidad 23 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 22, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye al menos 4 nucleótidos de la horquilla.

[0045] La modalidad 24 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 23, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye hasta 28 nucleótidos de la horquilla.

[0046] La modalidad 25 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 24, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye de 4 a 20 nucleótidos de la horquilla.

[0047] La modalidad 26 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 25, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye 4 a 14 nucleótidos de la horquilla.

[0048] La modalidad 27 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 26, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye de 4 a 6 nucleótidos de la horquilla.

[0049] La modalidad 28 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 27, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla.

[0050] La modalidad 29 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 28, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla.

[0051] La modalidad 30 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 27, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla.

[0052] La modalidad 31 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 27, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y al menos 1 nucleótido del tallo de la horquilla.

[0053] La modalidad 32 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 31, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[0054] La modalidad 33 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 32, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y al menos 2 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[0055] La modalidad 34 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 32, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[0056] La modalidad 35 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 32, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 pares de bases del tallo de la horquilla.

[0057] La modalidad 36 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 32, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye todos los nucleótidos del bucle de la horquilla.

[0058] La modalidad 37 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 21 a 32, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo de la horquilla.

[0059] La modalidad 38 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 37, en donde el conector interno sustituye 1 o 2 nucleótidos de la región nexo del ARNg.

[0060] La modalidad 39 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 38, en donde el conector interno sustituye una horquilla del ARNg.

[0061] La modalidad 40 es el ARNg de la modalidad 39, en donde el conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de la horquilla.

[0062] La modalidad 41 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 40, en donde el conector interno sustituye de 2 a 22 nucleótidos de la horquilla.

[0063] La modalidad 42 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 41, en donde el conector interno sustituye de 2 a 12 nucleótidos de la horquilla.

[0064] La modalidad 43 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 42, en donde el conector interno sustituye de 2 a 6 nucleótidos de la horquilla.

[0065] La modalidad 44 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 43, en donde el conector interno sustituye de 2 a 4 nucleótidos de la horquilla.

[0066] La modalidad 45 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 44, en donde el conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla.

[0067] La modalidad 46 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 45, en donde el conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla.

[0068] La modalidad 47 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 46, en donde el conector interno sustituye 2, 3, 4 o 5 nucleótidos del bucle de la horquilla.

[0069] La modalidad 48 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 47, en donde el conector interno sustituye el bucle de la horquilla y al menos 1 nucleótido del tallo de la horquilla.

[0070] La modalidad 49 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 48, en donde el conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[0071] La modalidad 50 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 49, en donde el conector interno sustituye el bucle de la horquilla y al menos 2 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[0072] La modalidad 51 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 50, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y al menos 18 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[0073] La modalidad 52 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 51, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 pares de bases del tallo de la horquilla.

[0074] La modalidad 53 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 52, en donde el conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la horquilla.

[0075] La modalidad 54 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 53, en donde el conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo de la horquilla.

[0076] La modalidad 55 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 54, en donde la horquilla es una horquilla 1.

[0077] La modalidad 56 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 54, en donde la horquilla es una horquilla 2.

[0078] La modalidad 57 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 39 a 54, en donde la horquilla es una horquilla 1 y el conector interno sustituye la horquilla 1.

[0079] La modalidad 58 es el ARNg de la modalidad 57, en donde el ARNg comprende además una horquilla 2 en 3' con respecto a la horquilla 1.

[0080] La modalidad 59 es el ARNg de la modalidad 58, en donde el conector interno sustituye al menos 2 nucleótidos de un bucle de la horquilla 2.

[0081] La modalidad 60 es el ARNg de la modalidad 58 o 59, en donde el conector interno no sustituye la horquilla 2.

[0082] La modalidad 61 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 60, que comprende además una región guía.

[0083] La modalidad 62 es el ARNg de la modalidad 61, en donde la región guía tiene 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud.

[0084] La modalidad 63 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 62, en donde el ARNg es un ARN guía único (ARNsg).

[0085] La modalidad 64 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 62, en donde el ARNg comprende un ARNtracr (ARNtr).

[0086] La modalidad 65 es un ARN guía (ARNg), en donde el ARNg es un ARN guía único (ARNsg) que comprende una región guía y una porción conservada en 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región nexo, una región horquilla 1 y una región horquilla 2, y comprende al menos uno de:

1) un primer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de una región del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición;

2) un segundo conector interno que sustituye 1 o 2 nucleótidos de la región de nexo; y

3) un tercer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la horquilla 1.

[0087] La modalidad 66 es el ARNg de la modalidad 65, en donde el ARNsg comprende el primer conector interno y el segundo conector interno.

[0088] La modalidad 67 es el ARNg de la modalidad 65, en donde el ARNsg comprende el primer conector interno y el tercer conector interno.

[0089] La modalidad 68 es el ARNg de la modalidad 65, en donde el ARNsg comprende el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[0090] La modalidad 69 es el ARNg de la modalidad 65, en donde el ARNsg comprende el primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[0091] La modalidad 70 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 69, en donde el primer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente, de aproximadamente 15 a 21 átomos.

[0092] La modalidad 71 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 70, en donde el primer conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de tallo superior.

[0093] La modalidad 72 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 71, en donde el primer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la región de tallo superior.

[0094] La modalidad 73 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 72, en donde el primer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la región de tallo superior.

[0095] La modalidad 74 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 73, en donde el primer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la región de tallo superior.

[0096] La modalidad 75 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 74, en donde el primer conector interno sustituye el bucle de la región de tallo superior y al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos del tallo de la región de tallo superior.

[0097] La modalidad 76 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 75, en donde el primer conector interno sustituye el bucle de la región de tallo superior y 1, 2, 3 o 4 pares de bases del tallo de la región de tallo superior.

[0098] La modalidad 77 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 76, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la región de tallo superior.

[0099] La modalidad 78 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 77, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo de la región de tallo superior.

[00100] La modalidad 79 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 78, en donde el segundo conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 18 átomos, opcionalmente, aproximadamente de 6 a 12 átomos.

[00101] La modalidad 80 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 79, en donde el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de la región nexo del ARNsg.

[00102] La modalidad 81 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 80, en donde el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de un bucle de la región nexo del ARNsg.

[00103] La modalidad 82 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 81, en donde el tercer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30, opcionalmente, de aproximadamente 12 a 21 átomos.

[00104] La modalidad 83 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 82, en donde el tercer conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la horquilla 1 del ARNg.

[00105] La modalidad 84 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 83, en donde el tercer conector sustituye 1, 2, 3, 4 o 5 pares de bases de la horquilla 1 del ARNg.

[00106] La modalidad 85 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 84, en donde el tercer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla 1.

[00107] La modalidad 86 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 85, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla 1.

[00108] La modalidad 87 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 86, en donde el tercer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla 1.

[00109] La modalidad 88 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 87, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y al menos 1 nucleótido del tallo de la horquilla 1.

[00110] La modalidad 89 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 88, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 2, 4 o 6 nucleótidos del tallo de la horquilla 1.

[00111] La modalidad 90 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 89, en donde el tercer conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2 o 3 pares de bases del tallo de la horquilla 1.

[00112] La modalidad 91 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 90, en donde el tercer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la horquilla 1.

[00113] La modalidad 92 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 91, en donde el tercer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo de la horquilla 1.

[00114] La modalidad 93 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 92, en donde la región de horquilla 2 del ARNsg no contiene ningún conector interno.

[00115] La modalidad 94 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 93, en donde el ARNsg es un ARNsg de Cas9 de *S. pyogenes*.

[00116] La modalidad 95 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 94, en donde el ARNsg comprende una porción conservada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 400.

[00117] La modalidad 96 es el ARNg de la modalidad 95, en donde 2, 3 o 4 de los nucleótidos 13 a 16 (US5-US8 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00118] La modalidad 97 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 95 a 96, en donde los nucleótidos 12 a 17 (US4-US9 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00119] La modalidad 98 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 95 a 97, en donde d nucleótidos de 11 a 18 (US3-US10 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00120] La modalidad 99 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 95 a 98, en donde los nucleótidos 10 a 19 (US2-US11 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00121] La modalidad 100 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 95 a 99, en donde los nucleótidos 9 a 20 (US1-US12 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00122] La modalidad 101 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 95 a 100, en donde los nucleótidos 36 a 37 (N6-N7 de la región nexo) sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00123] La modalidad 102 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 95 a 101, en donde 2, 3 o 4 de los nucleótidos 53 a 56 (H1-5-H1-8 de la horquilla 1) sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00124] La modalidad 103 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 95 a 102, en donde los nucleótidos 52 a 57 (H1-4-H1-9 de la horquilla 1) sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00125] La modalidad 104 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 95 a 103, en donde los nucleótidos 51 a 58 (H1-3-H1-10 de la horquilla 1) sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00126] La modalidad 105 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 95 a 104, en donde los nucleótidos 50 a 59 (H1-1-H1-12 de la horquilla 1) sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00127] La modalidad 106 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 95 a 105, en donde se eliminan los nucleótidos 77 a 80 con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00128] La modalidad 107 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 65 a 94, en donde el ARNsg comprende una porción secuencia de la SEQ ID NO: 201.

[00129] La modalidad 108 es el ARNg de la modalidad 107, en donde 2, 3 o 4 de los nucleótidos 33 a 36 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[00130] La modalidad 109 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 107 a 108, en donde los nucleótidos 32 a 37 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[00131] La modalidad 110 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 107 a 109, en donde los nucleótidos 31 a 38 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[00132] La modalidad 111 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 107 a 110, en donde los nucleótidos 30 a 39 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[00133] La modalidad 112 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 107 a 111, en donde los nucleótidos 29 a 40 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[00134] La modalidad 113 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 107 a 112, en donde los nucleótidos 55 y 56 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[00135] La modalidad 114 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 107 a 113, en donde 2, 3 o 4 de los nucleótidos 50 a 53 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[00136] La modalidad 115 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 107 a 114, en donde los nucleótidos 49 a 54 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[00137] La modalidad 116 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 107 a 115, en donde se eliminan los nucleótidos 77 a 80 con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[00138] La modalidad 117 es un ARN guía (ARNg), en done el ARNg es un ARN guía único (ARNsg) que comprende una región guía y una porción conservada en 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región horquilla 1 y una región horquilla 2, y también comprende al menos uno de:

1) un primer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de una región del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición del ARNsg;

2) un segundo conector interno que sustituye 1 o 2 nucleótidos de la horquilla 1 del ARNsg; o

3) un tercer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la horquilla 2 del ARNsg.

[00139] La modalidad 118 es el ARNg de la modalidad 117, en donde el ARNsg comprende el primer conector interno y el segundo conector interno.

[00140] La modalidad 119 es el ARNg de la modalidad 117, en donde el ARNsg comprende el primer conector interno y el tercer conector interno.

[00141] La modalidad 120 es el ARNg de la modalidad 117, en donde el ARNsg comprende el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[00142] La modalidad 121 es el ARNg de la modalidad 117, en donde el ARNsg comprende el primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[00143] La modalidad 122 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 121, en donde el primer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente, de aproximadamente 15 a 21 átomos.

[00144] La modalidad 123 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 122, en donde el primer conector interno está en una horquilla entre una primera porción del ARNsg y una segunda porción del ARNsg, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00145] La modalidad 124 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 123, en donde el primer conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de tallo superior.

[00146] La modalidad 125 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 124, en donde el primer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la región de tallo superior.

[00147] La modalidad 126 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 125, en donde el primer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la región de tallo superior.

[00148] La modalidad 127 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 126, en donde el primer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la región de tallo superior.

[00149] La modalidad 128 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 127, en donde el primer conector interno sustituye el bucle de la región de tallo superior y al menos 2, 4, 6 u 8 nucleótidos del tallo de la región de tallo superior.

[00150] La modalidad 129 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 128, en donde el primer conector interno sustituye el bucle de la región de tallo superior y 1, 2, 3 o 4 pares de bases del tallo de la región de tallo superior.

[00151] La modalidad 130 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 129, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la región de tallo superior.

[00152] La modalidad 131 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 130, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo de la región de tallo superior.

[00153] La modalidad 132 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 131, en donde el segundo conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 18 átomos, opcionalmente, aproximadamente de 6 a 12 átomos.

[00154] La modalidad 133 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 132, en donde el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de la horquilla 1 del ARNsg.

[00155] La modalidad 134 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 133, en donde el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de una región de tallo de la región nexo del ARNsg.

[00156] La modalidad 135 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 134, en donde el tercer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30, opcionalmente, de aproximadamente 12 a 21 átomos.

[00157] La modalidad 136 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 135, en donde el tercer conector interno sustituye 4, 6, 8, 10 o 12 nucleótidos de la horquilla 2 del ARNg.

[00158] La modalidad 137 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 136, en donde el tercer conector sustituye 1, 2, 3, 4 o 5 pares de bases de la horquilla 2 del ARNg.

[00159] La modalidad 138 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 137, en donde el tercer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla 2.

[00160] La modalidad 139 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 138, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla 2.

[00161] La modalidad 140 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 139, en donde el tercer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla 2.

[00162] La modalidad 141 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 140, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y al menos 1 nucleótido del tallo de la horquilla 2.

[00163] La modalidad 142 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 141, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 2, 4 o 6 nucleótidos del tallo de la horquilla 2.

[00164] La modalidad 143 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 142, en donde el tercer conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2 o 3 pares de bases del tallo de la horquilla 2.

[00165] La modalidad 144 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 143, en donde el tercer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la horquilla 2.

[00166] La modalidad 145 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 144, en donde el tercer conector interno está en una horquilla entre una primera porción del ARNsg y una segunda porción del ARNsg, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00167] La modalidad 146 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 145, en el que el ARNg es un ARN guía Cas9 (SauCas9) de *S. aureus* y no incluye el tercer conector interno.

[00168] La modalidad 147 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 146, en la que el ARNg es un ARN guía Cas9 (CdiCas9) de C. diphtheriae, un ARN guía Cas9 (St1Cas9) de S. thermophilus o un ARN guía Cas9 (AceCas9) de *Acidothermus cellulolyticus*.

[00169] La modalidad 148 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 147, en donde el ARNsg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 202.

[00170] La modalidad 149 es el ARNg de la modalidad 148, en donde 22, 3 o 4 de los nucleótidos 35 a 38 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[00171] La modalidad 150 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 148 a 149, en donde los nucleótidos 34 a 39 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[00172] La modalidad 151 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 148 a 150, en donde los nucleótidos 33 a 40 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[00173] La modalidad 152 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 148 a 151, en donde los nucleótidos 32 a 41 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[00174] La modalidad 153 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 148 a 152, en donde los nucleótidos 31 a 42 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[00175] La modalidad 154 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 148 a 153, en donde los nucleótidos 61 y 62 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[00176] La modalidad 155 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 148 a 154, en donde 2, 3 o 4 de los nucleótidos 84 a 87 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[00177] La modalidad 156 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 148 a 155, en donde los nucleótidos 83 a 88 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[00178] La modalidad 157 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 148 a 156, en donde los nucleótidos 82 a 89 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[00179] La modalidad 158 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 148 a 157, en donde los nucleótidos 81 a 90 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[00180] La modalidad 159 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 148 a 158, en donde se eliminan los nucleótidos 97 a 100 en relación con la SEQ ID NO: 202.

[00181] La modalidad 160 es un ARN guía (ARNg) que comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región horquilla 1 y una región horquilla 2, y comprnede un primer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición y un segundo conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la horquilla 2.

[00182] La modalidad 161 es el ARNg de la modalidad 160, en donde el primer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente, de aproximadamente 15 a 21 átomos.

[00183] La modalidad 162 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 161, en donde el primer conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[00184] La modalidad 163 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 162, en donde el primer conector interno está en una región horquilla entre una primera porción del ARNsg y una segunda porción de la región de repetición y antirrepetición, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00185] La modalidad 164 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 163, en donde el primer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[00186] La modalidad 165 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 164, en donde el primer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[00187] La modalidad 166 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 165, en donde el primer conector interno sustituye 1, 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[00188] La modalidad 167 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 166, en donde el primer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos del tallo superior de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[00189] La modalidad 168 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 167, en donde el primer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 pares de bases del tallo superior de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[00190] La modalidad 169 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 168, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos constituyen el bucle de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[00191] La modalidad 170 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 169, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo superior de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[00192] La modalidad 171 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 169, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la región de repetición y antirrepetición, y el tallo superior de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición comprende al menos un par de bases o no más de uno, dos o tres pares de bases.

[00193] La modalidad 172 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 171, en donde el segundo conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30, opcionalmente, de aproximadamente 12 a 21 átomos.

[00194] La modalidad 173 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 172, en donde el segundo conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de la horquilla 2 del ARNg.

[00195] La modalidad 174 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 173, en donde el segundo conector interno sustituye una región de bucle de la horquilla 2.

[00196] La modalidad 175 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 174, en donde el segundo conector interno sustituye una región de bucle y parte de una región de tallo de la horquilla 2.

[00197] La modalidad 176 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 175, en donde el segundo conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla 2.

[00198] La modalidad 177 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 176, en donde el segundo conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla 2.

[00199] La modalidad 178 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 177, en donde el segundo conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla 2.

[00200] La modalidad 179 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 178, en donde el segundo conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la horquilla 2.

[00201] La modalidad 180 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 179, en donde el segundo conector interno sustituye el bucle de la horquilla 2 y al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos del tallo de la horquilla 2.

[00202] La modalidad 181 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 180, en donde el segundo conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2 o 3 pares de bases del tallo de la horquilla 2

[00203] La modalidad 182 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 181, en donde el ARNg es un ARN guía St1Cas9.

[00204] La modalidad 183 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 182, en donde el ARNsg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 204.

[00205] La modalidad 184 es el ARNg de la modalidad 183, en donde los nucleótidos 41 a 44 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[00206] La modalidad 185 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 183 a 184, en donde los nucleótidos 101 a 103 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[00207] La modalidad 186 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 183 a 185, en donde los nucleótidos 100 a 104 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[00208] La modalidad 187 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 183 a 186, en donde los nucleótidos 99 a 105 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[00209] La modalidad 188 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 183 a 187, en donde los nucleótidos 98 a 106 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[00210] La modalidad 189 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 183 a 188, en donde se sustituyen 2 a 18 de los nucleótidos entre los nucleótidos 94 a 111 con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[00211] La modalidad 190 es un ARN guía (ARNg) que comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición y una región horquilla, y comprende un conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición.

[00212] La modalidad 191 es el ARNg de la modalidad 190, en donde el primer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente, de aproximadamente 12 a 21 átomos.

[00213] La modalidad 192 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 190 a 191, en donde el primer conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[00214] La modalidad 193 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 190 a 192, en donde el primer conector interno está en una región horquilla entre una primera porción del ARNsg y una segunda porción de la región de repetición y antirrepetición, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00215] La modalidad 194 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 190 a 193, en donde el ARNg es un ARN guía de Cas9 de C. jejuni (CjeCas9).

[00216] La modalidad 195 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 190 a 194, en donde el ARNg es un ARN guía de CjeCas9 y el conector interno está presente solo en la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[00217] La modalidad 196 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 190 a 195, en donde el ARNsg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 207.

[00218] La modalidad 197 es el ARNg de la modalidad 196, en donde los nucleótidos 33 a 36 sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 207.

[00219] La modalidad 198 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 196 a 197, en donde 1, 2, 3, 4, 5 o 6 pares de bases de los nucleótidos 27 a 32 y 37 a 42 sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 207.

[00220] La modalidad 199 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 190 a 193, en donde el ARNg es un ARN guía de Cas9 de *Francisella novicida* (FnoCas9).

[00221] La modalidad 200 es el ARNg de la modalidad 199, en donde el ARNsg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 208.

[00222] La modalidad 201 es el ARNg de la modalidad 200, en donde 2, 3 o 4 de los nucleótidos 40 a 43 sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 208.

[00223] La modalidad 202 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 200 a 201, en donde los nucleótidos 39 a 44 sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 208.

[00224] La modalidad 203 es un ARN guía (ARNg) que comprende una región de repetición y antirrepetición, y un conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición.

[00225] La modalidad 204 es el ARNg de la modalidad 203, en donde el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente, de aproximadamente 15 a 21 átomos.

[00226] La modalidad 205 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 203 a 204, en donde el conector interno sustituye 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[00227] La modalidad 206 es la composición de cualquiera de las modalidades 203 a 205, en donde el ARNg es un ARN guía de Cpf1.

[00228] La modalidad 207 es la composición de la modalidad 206, en donde el ARN guía de Cpf1 es un ARN guía de Cpf1 (LbCpf1) de la bacteria *Lachnospiraceae*, o un ARN guía de Cpf1 de *Acidaminococcus sp.* (AsCpf1).

[00229] La modalidad 208 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 203 a 207, en donde el ARNsg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 209 y los nucleótidos 11 a 14, o

12 a 15, u opcionalmente 12 a 14, sustituyen el conector interno relativo de la SEQ ID NO: 209.

[00230] La modalidad 209 es la composición de cualquiera de las modalidades 203 a 205, en donde el ARN guía es un ARN guía de *Eubacterium siraeum* (EsCas13d).

[00231] La modalidad 210 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 203 a 205 y 209, en donde el ARNsg comprende una secuencia de SEQ ID NO: 210 y los nucleótidos 9 a 16, u opcionalmente 10 a 15, o al menos 2 nucleótidos de estas, sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 210.

[00232] La modalidad 211 es el ARNg de la modalidad 1, en donde el conector interno es un primer conector interno, un segundo conector interno o un tercer conector interno, y el ARNg comprende una región guía y una región conservada que comprende uno o más de:

(a) una región de repetición y antirrepetición acortada, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 2 a 24 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 37 a 64 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 36 se enlaza con el nucleótido 65 mediante (i) un primer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos; o

(b) una región de horquilla 1 acortada, en donde la horquilla 1 acortada carece de 2 a 10, opcionalmente, 2 a 8 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 82 a 95 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 81 se enlaza con el nucleótido 96 mediante (i) un segundo conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos; o

(c) una región de horquilla 2 acortada, en donde la horquilla 2 acortada carece de 2 a 18, opcionalmente, 2 a 16 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 113 a 134 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 112 se enlaza con el nucleótido 135 mediante (i) un tercer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos;

en donde se eliminan uno de los nucleótidos 144 a 145 o ambos opcionalmente en comparación con la SEQ ID NO: 500.

[00233] La modalidad 212 es un ARN guía (ARNg) que comprende una región guía y una región conservada que comprende uno o más de:

(a) una región de repetición y antirrepetición acortada, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 2 a 24 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 37 a 64 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 36 se enlaza con el nucleótido 65 mediante (i) un primer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos; o

(b) una región de horquilla 1 acortada, en donde la horquilla 1 acortada carece de 2 a 10, opcionalmente, 2 a 8 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 82 a 95 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 81 se enlaza con el nucleótido 96 mediante (i) un segundo conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos; o

(c) una región de horquilla 2 acortada, en donde la horquilla 2 acortada carece de 2 a 18, opcionalmente, 2 a 16 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 113 a 134 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 112 se enlaza con el nucleótido 135 mediante (i) un tercer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos;

en donde se eliminan uno de los nucleótidos 144 a 145 o ambos opcionalmente en comparación con la SEQ ID NO: 500;

en donde el ARNg comprende al menos uno del primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[00234] La modalidad 213 es el ARNg de la modalidad 211 o 212, en donde el ARNg comprende al menos dos del primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[00235] La modalidad 214 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 213, en donde el ARNg comprende el primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[00236] La modalidad 215 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 214, en donde al menos 10 nucleótidos son nucleótidos modificados.

[00237] La modalidad 216 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 215, en donde la región guía tiene (i) una inserción de un nucleótido o una eliminación de 1 a 4 nucleótidos entre las posiciones 1 a 24 con respecto a la SEQ ID NO: 500, o (ii) una longitud de 24 nucleótidos.

[00238] La modalidad 217 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 216, en donde la región guía tiene una longitud de 25, 24, 23, 22, 21 o 20 nucleótidos, opcionalmente en donde la región guía tiene una longitud de 25, 24, 23 o 22 nucleótidos en las posiciones 1 a 24 de la SEQ ID NO: 500.

[00239] La modalidad 218 es el ARNg de la modalidad 217, en donde la región guía tiene una longitud de 23 o 24 nucleótidos en las posiciones 1 a 24 de la SEQ ID NO: 500.

[00240] La modalidad 219 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 218, en donde el ARNg comprende también una cola 3'.

[00241] La modalidad 220 es el ARNg de la modalidad 219, en donde la cola 3' comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos.

[00242] La modalidad 221 es el ARNg de la modalidad 220, en donde la cola 3' comprende 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos.

[00243] La modalidad 222 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 219 a 221, en donde la cola 3' termina con un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado.

[00244] La modalidad 223 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 219 a 222, en donde la cola 3' tiene 1 nucleótido de longitud.

[00245] La modalidad 224 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 219 a 223, en donde la cola 3' consiste en un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado.

[00246] La modalidad 225 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 219 a 224, en donde la cola 3' comprende una modificación de cualesquiera uno o más de los nucleótidos presentes en la cola 3'.

[00247] La modalidad 226 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 219 a 225, en donde la modificación de la cola 3' es uno o más de nucleótidos modificados con 2'-O-metilo (2'-OMe) y un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

[00248] La modalidad 227 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores 219 a 226, en donde la cola 3' está completamente modificada.

[00249] La modalidad 228 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 227, en donde el nucleótido 3' del ARNg es un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado.

[00250] La modalidad 229 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 228, en donde se eliminan uno o más de los nucleótidos 144 y 145 con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[00251] La modalidad 230 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 229, en donde se eliminan ambos nucleótidos 144 y 145 con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[00252] La modalidad 231 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 218, en donde el ARNg no comprende una cola 3'.

[00253] La modalidad 232 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 231, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 2 a 28 nucleótidos.

[00254] La modalidad 233 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 232, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de 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 o 50 nucleótidos.

[00255] La modalidad 234 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 233, en donde la región de repetición y antirrepetición carece de 12 a 28, opcionalmente, 18 a 24, nucleótidos.

[00256] La modalidad 235 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 234, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos.

[00257] La modalidad 236 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 235, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 nucleótidos.

[00258] La modalidad 237 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 236, en donde los nucleótidos 37 a 64 de la SEQ ID NO: 500 forman el tallo superior, y se eliminan uno o más pares de bases del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición acortada.

[00259] La modalidad 238 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 237, en donde el tallo superior de la región de repetición y antirrepetición acortada comprende no más de uno, dos, tres o cuatro pares de bases.

[00260] La modalidad 239 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 238, en donde se eliminan todas las posiciones 39 a 48 y todas las posiciones 53 a 62 del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición acortada y, opcionalmente, se sustituye el nucleótido 38 o 63.

[00261] La modalidad 240 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 239, en donde se eliminan todas las posiciones 38 a 63 del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición y, opcionalmente, se sustituye el nucleótido 37 o 64.

[00262] La modalidad 241 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 240, en donde se eliminan todos los nucleótidos 37 a 64 del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición y, opcionalmente, se sustituye el nucleótido 36 o 65.

[00263] La modalidad 242 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 241, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una porción dúplex de 11 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.

[00264] La modalidad 243 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 242, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una única porción dúplex.

[00265] La modalidad 244 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 243, en donde el tallo superior de la región de repetición y antirrepetición acortada incluye una o más sustituciones con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[00266] La modalidad 245 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 244, en donde el primer conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 49 a 52.

[00267] La modalidad 246 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 245, en donde se eliminan los nucleótidos 37 a 64 y el primer conector interno enlaza directamente el nucleótido 36 con el nucleótido 65.

[00268] La modalidad 247 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 245, en donde se eliminan los nucleótidos 38 a 63 y el primer conector interno enlaza directamente el nucleótido 37 al nucleótido 64.

[00269] La modalidad 248 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 245, en donde se eliminan los nucleótidos 39 a 62 y el primer conector interno enlaza directamente el nucleótido 38 con el nucleótido 63.

[00270] La modalidad 249 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 248, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene de 8 a 22 nucleótidos modificados.

[00271] La modalidad 250 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 249, en donde la región de horquilla 1 acortada carece de 2 a 10, opcionalmente 2 a 8 o 2 a 4, nucleótidos.

[00272] La modalidad 251 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 250, en donde la región de horquilla 1 acortada tiene una longitud de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 nucleótidos.

[00273] La modalidad 252 es el ARNg de cualquiera de las modalidad 211 a 251, en donde la región de horquilla 1 acortada tiene una porción dúplex de 4 a 8, opcionalmente, de 7 a 8, nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.

[00274] La modalidad 253 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 252, en donde la región de horquilla 1 acortada tiene una única porción dúplex.

[00275] La modalidad 254 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 253, en donde se eliminan uno o dos pares de bases de la región de horquilla 1 acortada.

[00276] La modalidad 255 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 254, en donde el tallo de la región de horquilla 1 acortada tiene una longitud de siete u ocho nucleótidos con emparejamiento de bases.

[00277] La modalidad 256 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 255, en donde se eliminan una o más posiciones 85 a 86 y uno o más de los nucleótidos 91 a 92 de la región de horquilla 1 acortada.

[00278] La modalidad 257 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 256, en donde se eliminan los nucleótidos 86 y 91 de la región de horquilla 1 acortada.

[00279] La modalidad 258 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 257, en donde se sustituye uno o más de los nucleótidos 82 a 95 de la región de horquilla 1 acortada con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[00280] La modalidad 259 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 258, en donde el segundo conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 87 a 90.

[00281] La modalidad 260 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 259, en donde el segundo conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 81 a 95.

[00282] La modalidad 261 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 260, en donde la región de horquilla 1 acortada tiene de 2 a 15 nucleótidos modificados.

[00283] La modalidad 262 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 261, en donde la región de horquilla 2 acortada carece de 2 a 18, opcionalmente, 2 a 16, nucleótidos.

[00284] La modalidad 263 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 262, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos.

[00285] La modalidad 264 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 263, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 nucleótidos.

[00286] La modalidad 265 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 264, en donde se eliminan una o más posiciones 113 a 121 y uno o más de los nucleótidos 126 a 134 de la región de horquilla 2 acortada.

[00287] La modalidad 266 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 265, en donde la región de horquilla 2 acortada comprende una región no apareada.

[00288] La modalidad 267 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 266, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene dos porciones dúplex.

[00289] La modalidad 268 es el ARNg de la modalidad 267, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una porción dúplex de 4 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.

[00290] La modalidad 269 es el ARNg de las modalidades 267 a 268, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una porción dúplex de 4 a 8 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.

[00291] La modalidad 270 es el ARNg de las modalidades 267 a 269, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una porción dúplex de 4 a 6 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.

[00292] La modalidad 271 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 270, en donde el tallo superior de la región de horquilla 2 acortada comprende uno, dos, tres o cuatro pares de bases.

[00293] La modalidad 272 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 271, en donde se elimina al menos un par de nucleótidos 113 y 134, nucleótidos 114 y 133, nucleótidos 115 y 132, nucleótidos 116 y 131, nucleótidos 117 y 130, nucleótidos 118 y 129, los nucleótidos 119 y 128, los nucleótidos 120 y 127 y los nucleótidos 121 y 126.

[00294] La modalidad 273 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 272, en donde se eliminan todas las posiciones 113 a 121 y 126 a 134 de la región de horquilla 2 acortada.

[00295] La modalidad 274 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 273, en donde uno o más de los nucleótidos 113 a 134 de la región de horquilla 2 acortada se sustituye con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[00296] La modalidad 275 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 274, en donde el tercer conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 122 a 125.

[00297] La modalidad 276 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 275, en donde el tercer conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 112 a 135.

[00298] La modalidad 277 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 276, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene de 2 a 15 nucleótidos modificados.

[00299] La modalidad 278 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 277, en donde la región guía del ARNg comprende al menos dos nucleótidos modificados, opcionalmente, al menos cuatro nucleótidos modificados.

[00300] La modalidad 279 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 277, en donde la región guía del ARNg comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos modificados, opcionalmente, 1, 2 o 3 nucleótidos modificados.

[00301] La modalidad 280 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 279, en donde la región guía del ARNg comprende 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos modificados.

[00302] La modalidad 281 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 280, en donde la región guía del ARNg comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos modificados.

[00303] La modalidad 282 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 281, en donde el ARNg comprende una modificación de extremo 5'.

[00304] La modalidad 283 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 282, en donde el ARNg comprende una modificación de extremo 5' y una modificación de extremo 3'.

[00305] La modalidad 284 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 283, en donde la región guía no comprende un nucleótido modificado en 3' de los primeros tres nucleótidos de la región guía.

[00306] La modalidad 285 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 211 a 277, en donde la región guía no comprende un nucleótido modificado.

[00307] La modalidad 286 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 285, en donde el ARNg comprende una modificación de extremo 3'.

[00308] La modalidad 287 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 286, que comprende una modificación en la región del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición.

[00309] La modalidad 288 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 287, el que comprende una modificación de extremo 5' y una modificación en la región de horquilla 1.

[00310] La modalidad 289 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 288, el que comprende una modificación de extremo 5' y una modificación en la región de horquilla 2.

[00311] La modalidad 290 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 289, el que comprende una modificación de extremo 3' y comprende una modificación en la región de tallo superior de la región de repetición y antirrepetición.

[00312] La modalidad 291 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 290, el que comprende una modificación de extremo 3' y una modificación en la región de horquilla 1.

[00313] La modalidad 292 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 291, el que comprende una modificación de extremo 3' y una modificación en la región de horquilla 2.

[00314] La modalidad 293 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 292, el que comprende una modificación de extremo 5' y comprende una modificación en la región de tallo superior de la región de repetición y antirrepetición.

[00315] La modalidad 294 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 293, el que comprende una modificación de extremo 5' y una modificación en la región de horquilla 1.

[00316] La modalidad 295 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 294, el que comprende una modificación de extremo 5' y una modificación en la región de horquilla 2.

[00317] La modalidad 296 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 295, el que comprende una modificación de extremo 5', una modificación en la región de tallo superior de la región de repetición y antirrepetición y una modificación de extremo 3'.

[00318] La modalidad 297 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 296, el que comprende una modificación de extremo 5', una modificación en la región de horquilla 1 y una modificación de extremo 3'.

[00319] La modalidad 298 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 297, el que comprende una modificación de extremo 5', una modificación en la región de horquilla 1, una modificación en la región de horquilla 2 y una modificación de extremo 3'.

[00320] La modalidad 299 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 298, el que comprende una modificación de extremo 5', una modificación en la región de repetición y antirrepetición, una modificación en la región de horquilla 1, una modificación en la región de horquilla 2 y una modificación de extremo 3'.

[00321] La modalidad 300 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 282 a 299, en donde la modificación de extremo 5' comprende un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-OMe), un nucleótido modificado con 2’-O-(2-metoxietilo) (2’-O-moe), un nucleótido modificado con 2’-fluoro (2’-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado abásico invertido o combinaciones de estos.

[00322] La modalidad 301 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 283 a 300, en donde la modificación de extremo 3' comprende un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-OMe), un nucleótido modificado con 2’-O-(2-metoxietilo) (2’-O-moe), un nucleótido modificado con 2’-fluoro (2’-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado abásico invertido o combinaciones de estos.

[00323] La modalidad 302 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 282 a 301, en donde la modificación de extremo 5' comprende cualquiera de:

i. una modificación de cualesquiera uno o más de los primeros 1, 2, 3 o 4 nucleótidos;

ii. un nucleótido modificado;

iii. dos nucleótidos modificados;

iv. tres nucleótidos modificados; y

v. cuatro nucleótidos modificados.

[00324] La modalidad 303 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 282 a 302, en donde la modificación de extremo 5' comprende uno o más de:

i. un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos;

ii. un nucleótido modificado con 2'-OMe;

iii. un nucleótido modificado con 2’-O-moe;

iv. un nucleótido modificado con 2’-F; y

v. un nucleótido modificado abásico invertido.

[00325] La modalidad 304 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 283 a 303, en donde la modificación de extremo 3' comprende cualquiera de:

i. una modificación de uno o más de los últimos 4, 3, 2 o 1 nucleótidos;

ii. un nucleótido modificado;

iii. dos nucleótidos modificados;

iv. tres nucleótidos modificados; y

v. cuatro nucleótidos modificados.

[00326] La modalidad 305 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 283 a 304, en donde la modificación de extremo 3' comprende uno o más de:

i. un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos;

ii. un nucleótido modificado con 2'-OMe;

iii. un nucleótido modificado con 2’-O-moe;

iv. un nucleótido modificado con 2’-F; y

v. un nucleótido modificado abásico invertido.

[00327] La modalidad 306 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 282 a 305, en donde la modificación de extremo 5' comprende al menos un enlace PS y en donde uno o más de:

i. hay un enlace PS y el enlace es entre el primer y el segundo nucleótidos;

ii. hay dos enlaces PS entre los primeros tres nucleótidos;

iii. hay enlaces PS entre cualesquiera uno o más de los primeros cuatro nucleótidos; y

iv hay enlaces PS entre cualesquiera uno o más de los últimos cinco nucleótidos.

[00328] La modalidad 307 es el ARNg de la modalidad 306, en donde la modificación de extremo 5’ también comprende al menos un nucleótido modificado con 2’-OMe, 2’-O-moe, 2’-F o abásico invertido.

[00329] La modalidad 308 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 282 a 307, en donde la modificación de extremo 5' comprende:

i. una modificación de uno o más de los primeros 1 a 4 nucleótidos, en donde la modificación es un enlace PS, un nucleótido abásico invertido, 2’-OMe, 2’-O-moe, 2’-F o combinaciones de estas;

ii. una modificación del primer nucleótido con 2’-OMe, 2’-O-moe, 2’-F o combinaciones de estas, y uno o dos enlaces PS opcionales al nucleótido siguiente o el primer nucleótido de la cola 3’;

iii. una modificación del primer o segundo nucleótido con 2’-OMe, 2’-O-moe, 2’-F o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o más enlaces PS;

iv. una modificación del primer, segundo o tercer nucleótido con 2’-OMe, 2’-O-moe, 2’-F o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o más enlaces PS; o

v. una modificación del primer, segundo, tercer o cuarto nucleótido con 2’-OMe, 2’-O-moe, 2’-F o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o más enlaces PS.

[00330] La modalidad 309 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 283 a 307, en donde la modificación de extremo 3' comprende al menos un enlace PS y en donde uno o más de:

i. hay un enlace PS y el enlace es entre el último y el penúltimo nucleótidos;

ii. hay dos enlaces PS entre los últimos tres nucleótidos y

iii. hay enlaces PS entre cualesquiera uno o más de los últimos cuatro nucleótidos.

[00331] La modalidad 310 es el ARNg de la modalidad 309, en donde la modificación de extremo 3’ también comprende al menos un nucleótido modificado con 2’-OMe, 2’-O-moe, 2’-F o abásico invertido.

[00332] La modalidad 311 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 283 a 310, en donde la modificación de extremo 3' comprende:

una modificación de uno o más de los últimos 1 a 4 nucleótidos, en donde la modificación es un enlace PS, un nucleótido abásico invertido, 2’-OMe, 2’-O-moe, 2’-F o combinaciones de estas;

una modificación del último nucleótido con 2’-OMe, 2’-O-moe, 2’-F o combinaciones de estas, y uno o dos enlaces PS opcionales al nucleótido siguiente o el primer nucleótido de la cola 3’;

una modificación del último o penúltimo nucleótido con 2’-OMe, 2’-O-moe, 2’-F o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o más enlaces PS;

una modificación del último, penúltimo o antepenúltimo nucleótido con 2’-OMe, 2’-O-moe, 2’-F o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o más enlaces PS; o

una modificación del último, penúltimo, antepenúltimo o anterior al antepenúltimo nucleótido con 2’-OMe, 2’-O-moe, 2’-F o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o más enlaces PS.

[00333] La modalidad 312 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 287 a 311, en donde la modificación en la región de repetición y antirrepetición, la región de horquilla 1 o la región de horquilla 2 comprende un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con 2’-O-metilo (2’-OMe), un nucleótido modificado con 2'-O-(2-metoxietil) (2'-O-moe), un nucleótido modificado con 2’-fluoro (2’-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos o combinaciones de estas.

[00334] La modalidad 313 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 287 a 312, en donde la modificación en la región de repetición y antirrepetición, la región de horquilla 1 o la región de horquilla 2 comprende un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con 2’-O-metilo (2’-OMe), un nucleótido modificado con 2’-fluoro (2’-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos o combinaciones de estas.

[00335] La modalidad 314 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 287 a 313, en donde la modificación en la región de repetición y antirrepetición, la región de horquilla 1 o la

región de horquilla 2 comprende un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-OMe) y un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, o combinaciones de estas.

[00336] La modalidad 315 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 314, en donde los nucleótidos 1 a 3 de la región guía están modificados y los nucleótidos en la región guía distintos de los nucleótidos 1 a 3 no están modificados.

[00337] La modalidad 316 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 315, en donde una cola 3' del nucleótido 144 está presente en el ARNg y comprende nucleótidos modificados con 2'-O-Me en los nucleótidos 141 a 144 y dos enlaces PS entre los nucleótidos 141 a 142 y 142 a 143, respectivamente.

[00338] La modalidad 317 es un ARN guía único (ARNsg) que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1001 a 1012 o cualquier otra secuencia como se muestra en la Tabla 4A.

[00339] La modalidad 318 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 317, la que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 o 70 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1001 a 1012 o cualesquiera otras secuencias como se muestra en la Tabla 4A.

[00340] La modalidad 319 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 317, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 o 70 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1001 a 1002 y 710 a 759 como se muestra en las Tablas 4A-4B, en donde la modificación en cada nucleótido del ARNg que corresponde a un nucleótido del identificador de la secuencia de referencia de la Tabla 4A es idéntico o equivalente a la modificación mostrada en el identificador de secuencia de referencia de la Tabla 4B.

[00341] La modalidad 320 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 319, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91 o 90 % de identidad con la secuencia de X al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1001 a 1002 y 710 a 759 como se muestra en las Tablas 4A-4B, donde X es el primer nucleótido de la región conservada.

[00342] La modalidad 321 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 230 y 232 a 320, que comprende también una cola 3' que comprende un nucleótido modificado con 2'-O-Me.

[00343] La modalidad 322 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 321, en donde el ARNg dirige una nucleasa a una secuencia objetivo para su unión.

[00344] La modalidad 323 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 322, en donde el ARNg dirige una nucleasa a una secuencia objetivo para inducir una ruptura bicatenaria dentro de la secuencia objetivo.

[00345] La modalidad 324 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 323, en donde el ARNg dirige una nucleasa a una secuencia diana para inducir un corte monocatenario en la secuencia diana.

[00346] La modalidad 325 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 322 a 324, en donde la nucleasa es una NmeCas9.

[00347] La modalidad 326 es la composición de la modalidad 325, en donde la Nme Cas9 es una Nme1 Cas9, una Nme2 Cas9 o una Nme3 Cas9.

[00348] La modalidad 327 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el ARNg comprende una sustitución conservadora, por ejemplo, para preservar el emparejamiento de bases.

[00349] La modalidad 328 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 327, en donde el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 Angstrom a 37 Angstrom.

[00350] La modalidad 329 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 328, en donde el conector interno comprende de 1 a 10 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

[00351] La modalidad 330 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 329, en donde el conector interno comprende al menos dos subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

[00352] La modalidad 331 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 330, en donde el conector interno comprende de 3 a 10 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

[00353] La modalidad 332 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 331, en donde el conector interno comprende de 3 a 6 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

[00354] La modalidad 333 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 332, en donde el conector interno comprende 3 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

[00355] La modalidad 334 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 333, en donde el conector interno comprende 6 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

[00356] La modalidad 335 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 334, en donde el conector interno comprende una estructura de fórmula (I):

~-L0-L1-L2-#

(I)

en donde:

~ indica un enlace a un sustituyente 3' del nucleótido anterior;

# indica un enlace a un sustituyente 5' del siguiente nucleótido;

L0 es nulo o alifático C1-3;

L1 es –[E1-(R1)]m-, donde

cada R1 es independientemente un grupo alifático C1-5, opcionalmente sustituido con 1 o 2 E2,

cada E1 y E2 son aceptores independientes de enlaces de hidrógeno, o se eligen independientemente de hidrocarburos cíclicos e hidrocarburos heterocíclicos, y

cada m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y

L2 es nulo, alifático C1-3 o es un aceptor del enlace de hidrógeno.

[00357] La modalidad 336 es el ARNg de la modalidad 335, en donde m es 6, 7, 8, 9 o 10.

[00358] La modalidad 337 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 336, en donde m es 1, 2, 3, 4 o 5.

[00359] La modalidad 338 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 337, en donde m es 1, 2 o 3.

[00360] La modalidad 339 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 338, en donde L0 es nulo.

[00361] La modalidad 340 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 338, en donde L0 es -CH2- o -CH2CH2-.

[00362] La modalidad 341 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 340, en donde L2 es cero.

[00363] La modalidad 342 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 340, en donde L2 es -O-, -S-, -CH2- o -CH2CH2-.

[00364] La modalidad 343 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 342, en donde el número de átomos en la cadena más corta de átomos en la vía de ~ a # en la estructura de Fórmula (I) es 30 o menos, 27 o menos, 24 o menos, 21 o menos, o tiene 18 o menos, o tiene 15 o menos, o tiene 12 o menos, o tiene 10 o menos.

[00365] La modalidad 344 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 343, en donde el número de átomos en la cadena más corta de átomos en la vía de ~ a # en la estructura de Fórmula (I) es de 6 a 30, opcionalmente de 9 a 30, opcionalmente de 9 a 21.

[00366] La modalidad 345 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 344, en donde la cantidad de átomos en la cadena más corta de átomos en la vía de ~ a # en la estructura de la Fórmula (I) es 9.

[00367] La modalidad 346 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 344, en donde la cantidad de átomos en la cadena más corta de átomos en la vía de ~ a # en la estructura de la Fórmula (I) es 18.

[00368] La modalidad 347 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 346, en donde cada grupo alifático C1-3 y grupo alifático C1-5 está saturado.

[00369] La modalidad 348 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 346, en donde al menos un grupo alifático C1-5 es un alquileno C1-4, o en donde al menos dos grupos alifáticos C1-5 son alquileno C1-4, o en donde al menos tres grupos alifáticos C1-5 son un alquileno C1-4.

[00370] La modalidad 349 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 348, en donde al menos un R1 se selecciona de -CH2-, -CH2CH2-, -CH2CH2CH2- o -CH2CH2CH2CH2-.

[00371] La modalidad 350 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 348, en donde cada R1 se selecciona independientemente de -CH2-, -CH2CH2-, -CH2CH2CH2- o -CH2CH2CH2CH2-.

[00372] La modalidad 351 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 350, en donde cada R1 es -CH2CH2-.

[00373] La modalidad 352 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 351, en donde al menos un grupo alifático C1-5 es un alquileno C1-4, o en donde al menos dos grupos alifáticos C1-5 son alquenileno C1-4, o en donde al menos tres grupos alifáticos C1-5 son un alquenileno C1-4.

[00374] La modalidad 353 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 352, en donde al menos un R1 se selecciona de -CHCH-, -CHCHCH2- o -CH2CHCHCH2-.

[00375] La modalidad 354 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 353, en donde cada E1 se elige independientemente de -O-, -S-, -NH-, -NR-, -C(O)-O-, -OC(O)O-, -C(O)-NR-, -OC(O)-NR-, -NC(O)-NR-, -P(O)2O-, -OP(O)2O-, -OP( R)(O)O-, -OP(O)(S)O-, -S(O)2-, hidrocarburos cíclicos e hidrocarburos heterocíclicos.

[00376] La modalidad 355 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 354, en donde cada E1 se elige independientemente de -O-, -S-, -NH-, -NR-, -C(O)-O-, -OC(O)O-, -P(O)2O-, -OP(O)2O- y -OP(R)(O)O.

[00377] La modalidad 356 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 355, en donde cada E1 es -O-.

[00378] La modalidad 357 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 355, en donde cada E1 es-S-

[00379] La modalidad 358 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 357, en donde al menos un grupo alifático C1-5 en R1 está opcionalmente sustituido con un E2.

[00380] La modalidad 359 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 358, en donde cada E2 se elige independientemente de -OH, -OR, -ROR, -SH, -SR, -C(O)-R, -C(O)-OR, -OC(O)-OR, -C(O)-H, -C(O)-OH, -OPO3, -PO3, -RPO3, -S(O)2-R, -S(O)2 -OR, -RS(O)2-R, -RS(O)2-OR, -SO3, hidrocarburos cíclicos e hidrocarburos heterocíclicos.

[00381] La modalidad 360 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 359, en donde cada E2 se elige independientemente de -OH, -OR, -SH, -SR, -C(O)-R, -C(O)-OR, -OC(O)-OR, -OPO3, -PO3, -RPO3 y -SO3.

[00382] La modalidad 361 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 360, en donde cada E2 es -OH u -OR.

[00383] La modalidad 362 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 360, en donde cada E2 es- SH o -SR.

[00384] La modalidad 363 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 362, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol.

[00385] La modalidad 364 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 363, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol que tiene de 1 a 10 unidades de etilenglicol.

[00386] La modalidad 365 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 364, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol tiene de 3 a 6 unidades de etilenglicol.

[00387] La modalidad 366 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 365, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol con 3 unidades de etilenglicol.

[00388] La modalidad 367 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 335 a 365, en donde el conector interno comprende un enlazador de polietilenglicol con 6 unidades de etilenglicol.

[00389] La modalidad 368 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 367, en donde el ARNg es un ARN guía corto que comprende una porción conservada acortada, y el conector interno sustituye al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos.

[00390] La modalidad 369 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 210 o 278 a 368, en donde el ARNg es un ARN guía corto único (ARNsg-corto) que comprende una porción conservada de un ARNsg que comprende una región de horquilla, en donde la región de horquilla carece de al menos 5 a 10 nucleótidos.

[00391] La modalidad 370 es el ARNg de la modalidad 369, en donde al menos 5 a 10 nucleótidos que faltan son consecutivos.

[00392] La modalidad 371 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 369 a 370, en donde los al menos 5 a 10 nucleótidos que faltan

i. están dentro de la horquilla 1;

ii. están dentro de la horquilla 1 y la N entre la horquilla 1 y la horquilla 2 con respecto a SEQ ID NO: 400;

iii. están dentro de la horquilla 1 y los dos nucleótidos inmediatamente 3' de la horquilla 1;

iv. incluyen al menos una parte de la horquilla 1;

v. están dentro de la horquilla 2;

vi. incluyen al menos una parte de la horquilla 2;

vii. están dentro de la horquilla 1 y la horquilla 2;

viii. incluyen al menos una parte de la horquilla 1 e incluyen la N entre la horquilla 1 y la horquilla 2 con respecto a la SEQ ID NO: 400;

ix incluyen al menos una parte de la horquilla 2 y la N entre la horquilla 1 y la horquilla 2 con respecto a la SEQ ID NO: 400;

x. incluyen al menos una parte de la horquilla 1, incluyen la N entre la horquilla 1 y la horquilla 2 con respecto a la SEQ ID NO: 400, e incluyen al menos una parte de la horquilla 2;

xi. están dentro de la horquilla 1 o la horquilla 2, lo que incluye opcionalmente la N entre la horquilla 1 y la horquilla 2 con respecto a SEQ ID NO: 400;

xii. son consecutivos;

xiii. son consecutivos e incluyen la N entre la horquilla 1 y la horquilla 2 con respecto a la SEQ ID NO: 400;

xiv. son consecutivos y abarcan al menos una parte de la horquilla 1 y una parte de la horquilla 2;

xv. son consecutivos y abarcan al menos una parte de la horquilla 1 y la N entre la horquilla 1 y la horquilla 2 con respecto a la SEQ ID NO: 400; o

xvi. son consecutivos y abarcan al menos una parte de la horquilla 1 y dos nucleótidos inmediatamente 3' de la horquilla 1.

[00393] La modalidad 372 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 210 o 278 a 371, en donde el ARNg es un ARN guía corto único (ARNsg-corto) que comprende una porción conservada de un ARNsg que comprende una región de horquilla, en donde la región de horquilla carece de al menos 5 a 10 nucleótidos y en donde el ARNg corto comprende una modificación del extremo 5' o una modificación del extremo 3'.

[00394] La modalidad 373 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 210 o 278 a 372, en donde los al menos 5 a 10 nucleótidos comprenden los nucleótidos 54 a 61 de la SEQ ID NO:400, los nucleótidos 53 a 60 de la SEQ ID NO:400; o los nucleótidos 54 a 58 de la SEQ ID NO:400, opcionalmente, en donde el ARNsg corto comprende modificaciones de al menos H1-1 a H1-5 y H2-1 a H2-12.

[00395] La modalidad 374 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 210 o 278 a 373, que comprende una región de horquilla 1 acortada o una región de horquilla 1 sustituida y opcionalmente acortada, en donde

(i) al menos uno de los siguientes pares de nucleótidos está sustituido en la horquilla 1 sustituida y opcionalmente acortada con nucleótidos de emparejamiento Watson-Crick: H1-1 y H1-12, H1-2 y H1-11, H1 -3 y H1-10, o H1-4 y H1-9, y la región de horquilla 1 opcionalmente carece de

(aa) uno o dos cualesquiera de H1-5 a H1-8,

(bb) uno, dos o tres de los siguientes pares de nucleótidos: H1-1 y H1-12, H1-2 y H1-11, H1-3 y H1-10 o H1-4 y H1-9, o

(cc) 1 a 8 nucleótidos de la región de horquilla 1; o

(ii) la región de horquilla 1 acortada carece de 6 a 8 nucleótidos, preferiblemente 6 nucleótidos; y

(aa) una o más de las posiciones H1-1, H1-2 o H1-3 se eliminan o se sustituyen con respecto a SEQ ID NO: 400 o

(bb) una o más de las posiciones H1-6 a H1-10 están sustituidas con respecto a la SEQ ID NO: 400; o

(iii) la región de horquilla 1 acortada carece de 5 a 10 nucleótidos, preferiblemente 5 a 6 nucleótidos, y una o más de las posiciones N18, H1-12 o n están sustituidas con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00396] La modalidad 375 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 210 o 278 a 374, que comprende una región del tallo superior acortada, en donde la región del tallo superior acortada carece de 1 a 6 nucleótidos y en donde los 6, 7, 8, 9, 10 u 11 nucleótidos de la región del tallo superior acortada incluyen hasta 4 sustituciones con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[00397] La modalidad 376 es el ARNg de cualquiera de las modaldiades 1 a 210 o 287 a 375, el que comprende una sustitución relativa a la SEQ ID NO: 400 en una o más de LS6, LS7, US3, US10, B3, N7, N15, N17, H2-2 y H2-14, en donde el nucleótido sustituyente no es una pirimidina seguida de una adenina, ni una adenina precedida por una pirimidina.

[00398] La modalidad 377 es el ARNg de la modalidad 374, en donde la horquilla 1 acortada y sustituida carece de 1 a 4 nucleótidos y los nucleótidos H1-4 a H1-9 están sustituidos por un conector interno.

[00399] La modalidad 378 es el ARNg de la modalidad 374, en donde la horquilla 1 acortada y sustituida carece de uno o dos de los siguientes pares de nucleótidos: H1-1 y H1-12, H1-2 y H1-11, o H1-3 y H1- 10; y los nucleótidos H1-4 a H1-9 están sustituidos por un conector interno.

[00400] La modalidad 379 es el ARNg de las reivindicaciones 1 a 210 o 278 a 378, el que comprende una región de tallo superior, en donde la modificación del tallo superior comprende una modificación de cualesquiera uno o más de US1-US12 en la región de tallo superior.

[00401] La modalidad 380 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 210 o 278 a 379, que comprende una región del tallo superior acortada, en donde la región del tallo superior acortada carece de 1 a 6 nucleótidos.

[00402] La modalidad 381 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 210 o 278 a 379, que comprende una región del tallo superior acortada, en donde la región del tallo superior acortada carece de 7 a 10 nucleótidos y 2 nucleótidos están sustituidos por un conector interno.

[00403] La modalidad 382 es el ARNg de la modalidad 381, en donde el tallo no comprende una porción dúplex de tallo superior.

[00404] La modalidad 383 es el ARNg de la modalidad 381 o 382 en donde el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 3 a 30 átomos, opcionalmente, 12 a 21 átomos, 6 a 18 átomos o 6 a 12 átomos.

[00405] La modalidad 384 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el ARNg comprende una modificación.

[00406] La modalidad 385 es el ARN guía de la modalidad 384, en donde la modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-O-Me), un nucleótido modificado con 2'-F, un nucleótido (ADN) modificado con 2'-H, un nucleótido modificado con 2′-O,4′-C-etileno (ENA), un nucleótido bloqueado (LNA) o un nucleótido desbloqueado (UNA).

[00407] La modalidad 386 es el ARN guía de la modalidad 384 o 385, en donde la modificación comprende un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

[00408] La modalidad 387 es el ARN guía de cualquiera de las modalidades 384 a 386, en donde el ARN guía es un ARNsg y la modificación comprende una modificación en uno o más de los cinco nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

[00409] La modalidad 388 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 384 a 387, en donde el ARN guía es un ARNsg y la modificación comprende una modificación en uno o más de los cinco nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

[00410] La modalidad 389 es el ARN guía de cualquiera de las modalidades 384 a 388, en donde el ARN guía es un ARNsg y la modificación comprende un enlace PS entre cada uno de los cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

[00411] La modalidad 390 es el ARN guía de cualquiera de las modalidades 384 a 389, en donde el ARN guía es un ARNsg y la modificación comprende un enlace PS entre cada uno de los cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

[00412] La modalidad 391 es el ARN guía de cualquiera de las modalidades 384 a 389, en donde el ARN guía es un ARNsg y la modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-Me en cada uno de los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

[00413] La modalidad 392 es el ARN guía de cualquiera de las modalidades 384 a 390, en donde el ARN guía es un ARNsg y la modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-Me en cada uno de los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

[00414] La modalidad 393 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el nucleótido 3' del ARNg es un nucleótido con una base uracilo.

[00415] La modalidad 394 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el ARNg comprende una cola 3'.

[00416] La modalidad 395 es el ARNg de la modalidad 394, en donde la cola 3' comprende al menos 1 a 10 nucleótidos.

[00417] La modalidad 396 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 394 a 395, en donde la cola 3' termina con un nucleótido con una base uracilo.

[00418] La modalidad 397 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 394 a 396, en donde la cola 3' tiene 1 nucleótido de longitud y es un nucleótido con una base uracilo.

[00419] La modalidad 398 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 394 a 397, en donde la cola 3' comprende una modificación de cualesquiera uno o más de los nucleótidos presentes en la cola 3'.

[00420] La modalidad 399 es el ARNg de las modalidades 393 a 398, en donde la cola 3' está completamente modificada.

[00421] La modalidad 400 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 393, en donde el ARNg no comprende una cola 3'.

[00422] La modalidad 401 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el ARNg comprende una modificación del extremo 3' o una modificación del extremo 5'.

[00423] La modalidad 402 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, en donde el ARNg comprende una modificación de extremo 5' y una modificación de extremo 3'.

[00424] La modalidad 403 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 401 a 402, en donde la modificación de extremo 3' o 5' comprende una modificación de extremo protegido, opcionalmente, un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con a 2'-O-metilo (2'-OMe), un nucleótido modificado con a 2'-O-(2-metoxietilo) (2'-O-moe), un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado abásico invertido o una combinación de estos.

[00425] La modalidad 404 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 401 a 403, en donde la modificación de extremo 3' o 5' comprende o también comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-Ome).

[00426] La modalidad 405 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 401 a 404, en donde la modificación de extremo 3' o 5' comprende o también comprende un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F).

[00427] La modalidad 406 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 401 a 405, en donde la modificación del extremo 3' o 5' comprende o comprende también un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

[00428] La modalidad 407 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 401 a 406, en donde la modificación de extremo 3' o 5' comprende o también comprende un nucleótido modificado abásico invertido.

[00429] La modalidad 408 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende una modificación en la región de horquilla.

[00430] La modalidad 409 es el ARNg de la modalidad 408, que comprende una modificación en la región de horquilla, en donde la modificación en la región de horquilla comprende un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con 2'-O-

metilo (2'-Ome), un nucleótido 2'- nucleótido modificado con fluoro (2'-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, o una combinación de estos.

[00431] La modalidad 410 es el ARNg de la modalidad 408 o 409, que comprende además una modificación del extremo 3'.

[00432] La modalidad 411 es el ARNg de la modalidad 408 o 409, que también comprende una modificación de extremo 3' y una modificación de extremo 5'.

[00433] La modalidad 412 es el ARNg de la modalidad 408 o 409, que también comprende una modificación de extremo 5'.

[00434] La modalidad 413 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 408 a 412, en donde la modificación en la región de horquilla comprende o también comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-Ome).

[00435] La modalidad 414 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 408 a 413, en donde la modificación en la región de horquilla comprende o también comprende un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F).

[00436] La modalidad 415 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, el que comprende una modificación en la región de tallo superior.

[00437] La modalidad 416 es el ARNg de la modalidad 415, en donde la modificación del tallo superior comprende cualesquiera uno o más de:

i. una modificación de cualesquiera uno o más de US1-US12 en la región del tallo superior (correspondiente a los nucleótidos 9 a 20 de la SEQ ID NO: 400); y

ii. una modificación de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o los 12 nucleótidos en la región superior del tallo.

[00438] La modalidad 417 es el ARNg de la modalidad 415 o 416, en donde la modificación de tallo superior comprende uno o más de:

i. un nucleótido modificado con 2’-OMe;

ii. un nucleótido modificado con 2’-O-moe;

iii. un nucleótido modificado con 2’-F;

iv. un nucleótido modificado con 2'-H (ADN);

v. nucleótidos modificados con 2′-O,4′-C-etileno (ENA);

vi. un nucleótido bloqueado (LNA);

vii. nucleótido desbloqueado (UNA); y

viii. combinaciones de uno o más de (i.) – (vii.).

[00439] La modalidad 418 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la modificación comprende una modificación YA.

[00440] La modalidad 419 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende una modificación YA de uno o más sitios YA de la región guía.

[00441] La modalidad 420 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 418 a 419, en donde la modificación YA comprende una sustitución de la pirimidina de un sitio YA con una no pirimidina.

[00442] La modalidad 421 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 418 a 419, en donde la modificación YA comprende una sustitución de la adenina de un sitio YA con una no adenina.

[00443] La modalidad 422 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 418 a 421, que comprende una modificación YA en donde la modificación comprende modificación con 2'-fluoro, 2'-H, 2'-OMe, ENA, UNA, inosina o PS.

[00444] La modalidad 423 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende una modificación YA de uno o más sitios YA de región conservada.

[00445] La modalidad 424 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la modificación YA comprende

(i) una modificación con 2'-OMe, opcionalmente de la pirimidina del sitio YA;

(ii) una modificación con 2'-fluoro, opcionalmente de la pirimidina del sitio YA; o

(iii) una modificación PS, opcionalmente de la pirimidina del sitio YA.

[00446] La modalidad 425 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 61 a 210 o 278 a 424, la que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 o 70 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-8, 20-75, 77-84, 101-108, 120-175 y 177-184.

[00447] La modalidad 426 es el ARNg de cualquiera de las modalidades 61 a 210 o 278 a 425, la que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 o 70 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 8, 20 a 75, 77 a 92, 101 a 108 y 120 a 175, y 177 a 184, en donde la modificación en cada nucleótido del ARNg que corresponde a un nucleótido del

identificador de la secuencia de referencia en la Tabla 2A es idéntica o equivalente a la modificación que se muestra en el identificador de la secuencia de referencia en la Tabla 2B.

[00448] La modalidad 427 es un ARN guía (ARNg) que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 8, 20 a 75 y 77 a 84.

[00449] La modalidad 428 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, incluidas las modificaciones establecidas para un ARN guía en la Tabla 2A o la Tabla 2B.

[00450] La modalidad 429 es un ARN guía (ARNg) que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 101 a 108, 120 a 175 y 177 a 184, incluidas las modificaciones de la Tabla 2A o la Tabla 2B.

[00451] La modalidad 430 es un ARN guía único (ARNsg) que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 211 a 230 o cualquier otra secuencia como se muestra en las Tablas 2A a 2C.

[00452] La modalidad 431 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, la que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 o 70 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 211 a 230 o cualesquiera de las secuencias que se muestran en las Tablas 2A a 2C.

[00453] La modalidad 432 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, la que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 o 70 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 101 a 108, 120 a 175, 177 a 184, 211 a 230 tal como se muestran en las Tablas 2A a 2C, en donde la modificación en cada nucleótido del ARNg que corresponde a un nucleótido del identificador de la secuencia de referencia en la Tabla 2C es idéntica o equivalente a la modificación que se muestra en el identificador de la secuencia de referencia en la Tabla 2A o 2B.

[00454] La modalidad 433 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, el que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91 o 90 % de identidad con la secuencia de X al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 101 a 108, 120 a 175, 177 a 184 y 211 a 230 tal como se muestran en las Tablas 2A a 2C, donde X es el primer nucleótido de la región conservada.

[00455] La modalidad 434 es el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el ARNg está asociado con una nanopartícula lipídica (LNP).

[00456] La modalidad 435 es una composición que comprende el ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores.

[00457] La modalidad 436 es una composición que comprende un ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 434 asociado con una nanopartícula lipídica (LNP).

[00458] La modalidad 437 es una composición que comprende el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 434, o la composición de cualquiera de las modalidades 435 o 436, que comprende además una nucleasa o un ARNm que codifica la nucleasa.

[00459] La modalidad 438 es una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 434.

[00460] La modalidad 439 es una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de las modalidades 63 a 116 y 278 a 433 y un ARNm que codifica SpyCas9.

[00461] La modalidad 440 es una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de las modalidades 117 a 159 y 278 a 433 y un ARNm que codifica SauCas9.

[00462] La modalidad 441 es una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de las modalidades 160 a 189 y 278 a 433 y un ARNm que codifica St1Cas9.

[00463] La modalidad 442 es una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de las modalidades 190 a 202 y 278 a 433 y un ARNm que codifica CjeCas9 o FnoCas9.

[00464] La modalidad 443 es una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de las modalidades 203 a 210 y 278 a 433 y un ARNm que codifica AsCpf1, LbCpf1 o EsCas13d.

[00465] La modalidad 444 es la composición de LNP de cualquiera de las modalidades 438 a 443, en donde la LNP comprende octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo, también llamado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo.

[00466] La modalidad 445 es la composición de cualquiera de las modalidades 438 a 444, en donde la LNP comprende una relación molar de una amina lipídica catiónica a fosfato de ARN (N:P) de alrededor de 4,5 a 6,5, opcionalmente, N:P de alrededor de 6,0.

[00467] La modalidad 446 es la composición de la modalidad 438 a 445, en donde la nucleasa comprende una proteína o un ácido nucleico que codifica la nucleasa.

[00468] La modalidad 447 es la composición de la modalidad 446, en donde la nucleasa es una nucleasa Cas.

[00469] La modalidad 448 es la composición de la modalidad 447, en donde la nucleasa Cas es una Cas9.

[00470] La modalidad 449 es la composición de la modalidad 448, en donde Cas9 es Cas9 de *S. pyogenes* (SpyCas9).

[00471] La modalidad 450 es la composición de la modalidad 448, en donde Cas9 es Cas9 de *S. aureus* (SauCas9).

[00472] La modalidad 451 es la composición de la modalidad 448, en donde Cas9 es Cas9 de *C. diphtheriae* (CdiCas9).

[00473] La modalidad 452 es la composición de la modalidad 448, en donde Cas9 es Cas9 de *Streptococcus thermophilus* (St1Cas9).

[00474] La modalidad 453 es la composición de la modalidad 448, en donde Cas9 es Cas9 de *A.cellulolyticus* (AceCas9).

[00475] La modalidad 454 es la composición de la modalidad 448, en donde Cas9 es Cas9 de *C. jejuni* (CjeCas9).

[00476] La modalidad 455 es la composición de la modalidad 448, en la que Cas9 es Cas9 de *R. palustris* (RpaCas9).

[00477] La modalidad 456 es la composición de la modalidad 448, en la que Cas9 es Cas9 de *R. rubrum* (RruCas9) .

[00478] La modalidad 457 es la composición de la modalidad 448, en la que Cas9 es Cas9 de *A. naeslundii* (AnaCas9).

[00479] La modalidad 458 es la composición de la modalidad 448, en donde Cas9 es Cas9 de *Francisella novicida* (FnoCas9).

[00480] La modalidad 459 es la composición de la modalidad 448, en donde la nucleasa Cas es una Cpf1.

[00481] La modalidad 460 es la composición de la modalidad 459, en donde Cpf1 es Cpf1 de *Lachnospiraceae bacterium* (LbCpf1) o Cpf1 es Cpf1 de *Acidaminococcus sp.* (AsCpf1).

[00482] La modalidad 461 es la composición de la modalidad 448, en donde la proteína Cas es una Cas13d de *Eubacterium siraeum* (EsCas13d).

[00483] La modalidad 462 es la composición de la modalidad 448, en donde Cas9 es una Nme Cas9.

[00484] La modalidad 463 es la composición de la modalidad 462, en donde la Cas9 es una Nme1 Cas9, una Nme2 Cas9 o una Nme3 Cas9.

[00485] La modalidad 464 es la composición de cualquiera de las modalidades 439 a 463, en donde la nucleasa es una cleavasa, una nickasa o una nucleasa catalíticamente inactiva, o es una proteína de fusión que comprende una desaminasa.

[00486] La modalidad 465 es la composición de cualquiera de las modalidades 439 a 464, en donde la nucleasa está modificada.

[00487] La modalidad 466 es la composición de la modalidad inmediatamente anterior, en donde la nucleasa modificada comprende una señal de localización nuclear (NLS).

[00488] La modalidad 467 es la composición de la modalidad 439 a 466, en donde el ácido nucleico que codifica la nucleasa se selecciona de:

a. una secuencia de codificación de ADN;
b. un ARNm con un marco abierto de lectura (ORF);
c. una secuencia de codificación en un vector de expresión;
d. una secuencia de codificación en un vector viral.

[00489] La modalidad 468 es la composición de la modalidad inmediatamente anterior, en donde el ARNm comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 321 a 323, 361, 363 a 372 y 374 a 382.

[00490] La modalidad 469 es una formulación farmacéutica que comprende el ARNg de una cualquiera de las modalidades 1 a 434, o la composición de cualquiera de las modalidades 435 a 468 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[00491] La modalidad 470 es un método para modificar un ADN diana que comprende administrar a una célula uno o más de los siguientes: i. el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 434; ii. la composición de cualquiera de las modalidades 435 a 468; y iii. la formulación farmacéutica de la modalidad 469.

[00492] La modalidad 471 es el método de la modalidad 470, en donde el ARNg comprende no más de 110, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45 o 40 nucleótidos.

[00493] La modalidad 472 es el método de la modalidad 470 o 471, en donde el método da como resultado una inserción o eliminación en un gen.

[00494] La modalidad 473 es el método de la modalidad 472, en donde el método tiene como consecuencia una inserción o una eliminación en una edición de bases.

[00495] La modalidad 474 es el método de la reivindicación 158 o -473 que también comprende administrar a la célula una plantilla, en donde al menos una parte de la plantilla se incorpora en un ADN objetivo en un sitio de ruptura bicatenaria inducido por la proteína Cas o cerca de este.

[00496] La modalidad 475 es el ARNg de una cualquiera de las modalidades 1 a 434, la composición de las modalidades 435 a 468 o la formulación farmacéutica de la modalidad 469 para usar en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno.

[00497] La modalidad 476 es el uso del ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 427, la composición de las modalidades 435 a 468 o la formulación farmacéutica de las modalidades 460 a 469 en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno.

[00498] La modalidad 477 es un ARNg sintetizado químicamente que comprende un conector interno.

[00499] La modalidad 478 es una composición que comprende el ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 434, en donde la composición no comprende una porción no unida del ARNg.

[00500] La modalidad 479 es un soporte sólido unido covalentemente al conector del ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 434.

[00501] La modalidad 480 es un método para sintetizar un ARNg que comprende un conector interno en donde es un proceso sintético único.

[00502] La modalidad 481 es un método para sintetizar un ARNg en donde se incorpora un conector interno en línea durante la síntesis.

[00503] La modalidad 482 es un método para sintetizar un ARNg usando una serie de reacciones de acoplamiento secuenciales en donde las reacciones comprenden:

a) reacción de acoplamiento para el enlace covalente de un primer nucleótido a un segundo nucleótido;

b) una reacción de acoplamiento para el enlace covalente de un conector interno al segundo nucleótido; y

c) una reacción de acoplamiento para el enlace covalente de un tercer nucleótido al conector interno,

en donde la reacción de acoplamiento para los enlaces covalentes es la misma.

[00504] La modalidad 483 es el método de la modalidad 482, en donde el enlace covalente se realiza usando química de fosforamidita.

[00505] La modalidad 484 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el ARNg se sintetiza químicamente.

[00506] La modalidad 485 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el conector interno se incorpora al ARNg mediante una reacción de acoplamiento durante la síntesis química del ARNg.

[00507] La modalidad 486 es el ARNg, composición, formulación, método o uso de cualquiera de las modalidades anteriores, preparado mediante un proceso que comprende la adición del conector interno haciendo reaccionar un conector que comprende un resto de fosforamidita con un residuo de nucleósido.

[00508] La modalidad 487 es el ARNg, composición, formulación, método o uso de la modalidad inmediatamente anterior, en donde el proceso comprende además hacer reaccionar un nucleótido que comprende un resto fosforamidita con el conector.

[00509] La modalidad 488 es el ARNg, composición, formulación, método o uso de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el conector interno está unido covalentemente al nucleótido adyacente mediante un enlace fosfodiéster o fosforotioato.

[00510] La modalidad 489 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde no hay urea presente en el conector interno.

[00511] La modalidad 490 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el conector interno no está en la región de la de repetición y antirrepetición del ARNg.

[00512] La modalidad 491 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o cualquier uso de las modalidades anteriores, en donde el ARNg comprende un conector interno que no está en una repetición-antirrepetición de la guía.

[00513] La modalidad 492 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el ARNg es un ARNsg.

[00514] La modalidad 493 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el conector interno une una región dúplex y sustituye de 2 a 12 nucleótidos.

[00515] La modalidad 494 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o cualquier uso de las modalidades anteriores, en donde el ARNg se produce en una única síntesis.

**LEYENDAS DE LAS FIGURAS**

[00516] En las Figuras 1A a 1C se muestra el porcentaje de edición de las guías indicadas con conectores internos administrados *in vitro* mediante lipofección en (A) hepatocitos primarios de ratón (PMH), (B) hepatocitos primarios de cynomolgus (PCH) y (C) hepatocitos primarios humanos (PHH).

[00517] En las Figuras 2A y 2B se muestran curvas de respuesta a la dosis para los resultados de edición para (A) conjunto 1 y (B) conjunto 2 de experimentos en los que se administraron guías con conectores internos PCH *in vitro* mediante lipofección.

[00518] En las Figuras 3A y 3B se muestran curvas de respuesta a la dosis para los resultados de porcentaje de edición de los experimentos en los que las guías con conectores internos se administraron *in vitro* a (A) PMH y (B) PCH con lipofección.

[00519] En las Figuras 4A a 4C se muestran curvas de respuesta a la dosis para los resultados de porcentaje de edición de los experimentos en los que las guías con conectores internos se administraron *in vitro* a (A) PMH, (B) PCH y (C) PRH con lipofección.

[00520] Las Figuras 5A y 5B muestran resultados de estudios con ratones *in vivo* que proporcionan (A) porcentaje de edición y (B) concentración de TTR en suero (ug/ml) para las guías indicadas con conectores internos administrados a una dosis de 0,1 mg/kg de ARN total.

[00521] En la Figura 6 se muestran resultados de estudios en ratones *in vivo* que proporcionan el porcentaje de edición para las guías indicadas con conectores internos que se administran en una dosis de 0,1 mg/kg o 0,03 mg/kg de ARN total.

[00522] En la Figura 7 se muestran resultados de estudios en ratones *in vivo* que proporcionan el porcentaje de edición para las guías indicadas con conectores internos que se administran en una dosis de 0,1 mg/kg o 0,03 mg/kg de ARN total.

[00523] En las Figuras 8A y 8B se muestran resultados de estudios en ratas *in vivo* que proporcionan (A) el porcentaje de edición y (B) la concentración de TTR en suero (ug/ml) para las guías indicadas con conectores internos que se administran en una dosis de 0,1 mg/kg o 0,03 mg/kg de ARN total.

[00524] La Figura 9 muestra una representación de varias guías de Spy Cas9 con conectores internos combinados con resultados de estudios presentados en figuras anteriores.

[00525] En las Figuras 10A a 10E se muestran estructuras guía ejemplares (no se muestran conectores) para (A) Spy Cas9, (B) Sau Cas9, (C) AsCas12A (AsCpf1), (D) EsCas 13D y (E) NmeCas9, que indican la región de destino (relleno gris con contorno discontinuo, no susceptible de sustitución de conector interno), bases no susceptibles de sustitución de conector interno (relleno gris con contorno continuo), bases susceptibles de eliminación simple o por pares (círculos sin relleno), bases susceptibles de sustitución con un conector largo (relleno marcado con contorno continuo) y bases susceptibles de sustitución con un conector corto (relleno rayado con contorno continuo).

[00526] En la Figura 11 se muestra un ejemplo de ARNsg (SEQ ID NO: 300, no se muestra la metilación) en una posible estructura secundaria con etiquetas que designan nucleótidos individuales de la región conservada del ARNsg, incluyendo el tallo inferior, el abultamiento, el tallo superior, el nexo (a cuyos nucleótidos puede hacer referencia como N1 a N18, respectivamente, en la dirección 5' a 3'), y la región de horquilla que incluye las regiones de horquilla 1 y horquilla 2. Un nucleótido entre la horquilla 1 y la horquilla 2 está etiquetado como n. Puede haber una región guía presente en un ARNsg y se indica en esta figura como «$(N)_x$» que precede a la región conservada del ARNsg.

[00527] En la FIG. 12A se muestra la media de porcentaje de edición en el locus de TTR en PMH con relaciones diferentes de ARNsg y ARNm de Nme2Cas9.

[00528] En la FIG. 12B se muestra la media de porcentaje de edición en el locus de TTR en PMH con relaciones diferentes de ARNpg y ARNm de Nme2Cas9.

[00529] En la FIG. 13 se muestra la media de porcentaje de edición en el locus de TTR en PMH para ARNpg con ARNm de Nme2Cas9.

[00530] En la FIG. 14A se muestra la media de porcentaje de edición en exón 1 de TTR en PMH para ARNpg con modificación con 2'-OMe en la secuencia guía con ARNm de Nme2Cas9.

[00531] En la FIG. 14B se muestra la media de porcentaje de edición en exón 3 de TTR en PMH para ARNpg con modificación con 2'-OMe en la secuencia guía con ARNm de Nme2Cas9.

[00532] En la FIG. 14C se muestra la media de porcentaje de edición en exón 1 de TTR en PMH para ARNpg con modificación con 2'-OMe leve en la secuencia guía con ARNm de Nme2Cas9.

[00533] En la FIG. 14D se muestra la media de porcentaje de edición en exón 3 de TTR en PMH para ARNpg con modificación con 2'-OMe leve en la secuencia guía con ARNm de Nme2Cas9.

[00534] En la FIG. 15 se muestra la media de porcentaje de edición en el locus TTR de ratón en células PMH tratadas con construcciones NmeCas9 diseñadas con 1 o 2 secuencias de localización nuclear.

[00535] En la FIG. 16 se muestra la media de porcentaje de edición en el locus de TTR de ratón en células de PMH para ARNpg y ARNm de varios Nme2Cas9.

[00536] En la Fig. 17A se muestra la media de porcentaje de edición en el locus de TTR en hígado de ratón después del tratamiento con ARNpg y Nme2Cas9.

[00537] En la Fig. 17B se muestra la media de proteína TTR en suero después del tratamiento con ARNpg y Nme2Cas9.

[00538] En la Fig. 17C se muestra la media de porcentaje de inactivación de TTR después del tratamiento con ARNpg y Nme2Cas9.

[00539] En la FIG. 17D se muestra la media de porcentaje de edición en el locus de TTR en hígado de ratón después del tratamiento con ARNpg y varias Nme2Cas9.

[00540] En la Fig. 17E se muestra la media de inactivación de proteína TTR en suero después del tratamiento con ARNpg y varios Nme2Cas9.

[00541] En la FIG. 18 se muestra la media de porcentaje de edición en el hígado de ratón después del tratamiento con ARNpg y varias Nme2Cas9.

[00542] En la FIG. 19 se muestra la media de porcentaje de edición en hígado de ratón después del tratamiento con varios editores de base.

[00543] En la FIg. 20 se muestra la media de porcentaje de edición en el locus de HEK3 en hepatoma humano (Huh7) después del tratamiento con varios ARNpg modificados y ARNm de SpyCas9.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

[00544] En el presente documento se proporcionan ARN guía (ARNg) que comprenden un conector interno para su uso en métodos de edición de genes. En las Tablas 2A a 2B se muestran ejemplos de secuencias de ARNg diseñados y probados.

[00545] Algunos de los ARNg proporcionados en este documento son ARN de guía dual (ARNdg) que comprenden un conector interno para su uso en métodos de edición de genes.

[00546] Determinados de los ARNg proporcionados en la presente son ARN guía únicos (ARNsg) que comprende un conector interno para utilizar en métodos de edición del genoma.

[00547] Esta divulgación proporciona además usos de estos ARNg (por ejemplo, ARNsg, ARNdg o ARNcr) para alterar el genoma de un ácido nucleico diana *in vitro* (por ejemplo, células cultivadas *in vitro* para su uso en terapia *ex vivo* u otros usos de células editadas genéticamente) o en una célula de un sujeto tal como un ser humano (por ejemplo, para uso en terapia *in vivo* ).

[00548] Las designaciones de ARNsg a veces se proporcionan con uno o más ceros iniciales inmediatamente después de la G. Esto no afecta al significado de la designación. Así, por ejemplo, G000282, G0282, G00282 y G282 se refieren al mismo ARNsg. Del mismo modo, las designaciones de ARNcr y/o ARNtr a veces se proporcionan con uno o más ceros iniciales inmediatamente después de CR o TR, respectivamente, lo que no afecta el significado de la designación. Así, por ejemplo, CR000100, CR00100, CR0100 y CR100 se refieren al mismo ARNcr, y TR000200, TR00200, TR0200 y TR200 se refieren al mismo ARNtr.

### I. DEFINICIONES

[00549] Tal como se usa en la presente, los artículos «un» y «una» se usan para hacer referencia a uno o más de uno (por ejemplo, a al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o más de un elemento, por ejemplo, una pluralidad de elementos.

[00550] El término «incluido» se utiliza en el presente documento para significar, y se utiliza indistintamente, la frase «incluido, entre otros».

[00551] El término «o» se utiliza en la presente para hacer referencia con la expresión «y/o», y es intercambiable con esta, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Por ejemplo, «cadena con sentido o cadena antisentido» se entiende como «cadena con sentido o cadena antisentido o cadena con sentido y cadena antisentido».

[00552] Los términos «aproximadamente» o «alrededor de» se utilizan en el presente documento para significar dentro de los rangos típicos de tolerancias en la técnica. Por ejemplo, «aproximadamente» puede entenderse como aproximadamente 2 desviaciones estándar de la media. En determinadas modalidades, aproximadamente significa +10%. En determinadas modalidades, aproximadamente significa +5 %, +2 % o +1 %. Cuando «aproximadamente» o «alrededor de» están presentes antes de una serie de números o un rango, se entiende que pueden modificar cada uno de los números de la serie o rango. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debería al menos interpretarse a la luz del número de dígitos significativos informados y aplicando técnicas ordinarias de redondeo.

[00553] Se entiende que el término «al menos» anterior a un número o serie de números incluye el número adyacente al término «al menos», y todos los números o números enteros posteriores que lógicamente podrían incluirse, como se desprende del contexto. Por ejemplo, el número de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico debe ser un número entero. Por ejemplo, «al menos 17 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de 20 nucleótidos» significa que 17, 18, 19 o 20 nucleótidos tienen la propiedad indicada. Cuando «al menos» está presente antes de una serie de números o un rango, se entiende que «al menos» puede modificar cada uno de los números de la serie o rango.

[00554] Tal como se utilizan en el presente documento, «no más que», «menos que» o «hasta» se entienden como el valor adyacente a la frase y los valores lógicos inferiores o enteros, lógicos según el contexto, hasta cero. Por ejemplo, una región dúplex de «no más de 2 pares de bases de nucleótidos» tiene 2, 1 o 0 pares de bases de nucleótidos. Cuando antes de una serie de números o de un rango está presente «no más que», «menos que» o «hasta», se entiende que cada uno de los números de la serie o rango está modificado.

[00555] Tal como se utiliza en el presente documento, los rangos incluyen tanto el límite superior como el inferior.

[00556] Como se usa en el presente documento, se entiende que cuando la cantidad máxima de un valor está representada por 100% (por ejemplo, 100% de inhibición), el valor

está limitado por el método de detección. Por ejemplo, se entiende por inhibición del 100% la inhibición hasta un nivel inferior al nivel de detección del ensayo.

[00557] «Eficiencia de edición» o «porcentaje de edición» como se usan en el presente documento es el número total de lecturas de secuencia con inserciones, eliminaciones o cambios de bases de nucleótidos en la región diana de interés sobre el número total de lecturas de secuencia después de la escisión o mella por RNP Cas.

[00558] Las «regiones», tal como se utilizan en el presente documento, describen porciones de ácidos nucleicos. Las regiones también pueden denominarse «módulos» o «dominios». Las regiones de un ARNsg pueden llevar a cabo funciones particulares, por ejemplo, en la dirección de la actividad endonucleasa del RNP, por ejemplo como se describe en Briner AE et ál., *Molecular Cell* 56:333–339 (2014), o tener estructuras previstas. En la Tabla 3 se describen regiones ejemplares de un ARNsg.

[00559] «Horquilla» o «estructura de horquilla», como se usa en el presente documento, describe un dúplex de ácidos nucleicos que se crea cuando una cadena de ácido nucleico se pliega y forma pares de bases con otra sección de la misma cadena. Una horquilla puede formar una estructura que comprende un bucle o una forma de U. En algunas modalidades, una horquilla puede estar compuesta por un bucle de ARN. Las horquillas se pueden formar uniendo dos secuencias complementarias en una sola molécula de ácido nucleico, con un plegamiento o arrugamiento de la molécula. En algunas modalidades, las horquillas comprenden estructuras de tallo o bucle de tallo. En algunas modalidades, una horquilla comprende un bucle y un tallo. Como se usa en el presente documento, cuando hay dos horquillas presentes en un ARNg, una «región de horquilla» puede referirse a la horquilla 1 y la horquilla 2 y la secuencia intermedia (por ejemplo, «n») entre la horquilla 1 y la horquilla 2 de una porción conservada de un ARNsg.

[00560] Tal como se utiliza en el presente documento, se entiende que «formar una porción dúplex» es capaz de formar una porción dúplex ininterrumpida o se prevé que forme una porción dúplex ininterrumpida, por ejemplo, mediante emparejamiento de bases. Una porción dúplex puede comprender dos secuencias complementarias, por ejemplo, una primera región del tallo en horquilla y una segunda región de tallo en horquilla complementaria a la primera. Como se usa en el presente documento, una porción dúplex tiene una longitud de al menos 2 pares de bases. Una porción dúplex comprende opcionalmente de 2 a 10 pares de

bases, y las dos cadenas que forman la porción dúplex pueden estar unidas, por ejemplo, mediante un bucle de nucleótidos. El emparejamiento de bases en un dúplex puede incluir el emparejamiento de bases Watson-Crick, opcionalmente en combinación con el apilamiento de bases. Como se usa en el presente documento, una porción dúplex puede incluir una discontinuidad de un solo nucleótido en una hebra en la que cada nucleótido contiguo en una hebra está emparejado con un nucleótido en la hebra complementaria que puede tener una discontinuidad de un nucleótido sin emparejamiento de bases, por ejemplo, como en el nucleótido 96 de la SEQ ID NO: 500 en la horquilla 1, en donde la discontinuidad está flanqueada inmediatamente 5' y 3' con pares de bases Watson y Crick. Esto es distinto de los nucleótidos no apareados 36 y 65 en la región de la de repetición y antirrepetición, y de los nucleótidos no apareados 106 a 108 y 139 en la horquilla 2, lo que constituye una discontinuidad que da como resultado dos porciones dúplex, como se define en el presente documento. Las estructuras de ARN son conocidas en la técnica y hay herramientas disponibles para la predicción estructural de ARN (ver, por ejemplo, Sato et ál., *Nature Comm.* 12:941 (2021); *RNAstructure* en rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb /Servers/Predict1/Predict1.html y RNAfold WebServer en rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi). Las longitudes de puente y la flexibilidad estructural requeridas para permitir un pliegue y formar un bucle para permitir que las nucleobases se acerquen suficientemente al par de bases son conocidas en la técnica.

[00561] Como se usa en el presente documento, un «agente de unión a ADN guiado por ARN» significa un polipéptido o complejo de polipéptidos que tienen actividad de unión a ARN y ADN, o una subunidad de unión a ADN de dicho complejo, en donde la actividad de unión a ADN es específica de secuencia y depende de la secuencia del ARN. Los agentes de unión a ADN guiados por ARN a modo de ejemplo incluyen cleavasas Cas (que tienen actividad de escisión de doble cadena), nickasas Cas (que tienen actividad de escisión de cadena única) y formas inactivadas de estas (agentes de unión a ADN dCas). «Nucleasa Cas», tal como se utiliza en el presente documento, abarca cleavasas Cas, nickasas Cas y agentes de unión a ADN dCas. El agente de unión al ADN dCas puede ser una nucleasa muerta que comprende dominios de nucleasa no funcionales (dominio RuvC o HNH). En algunas modalidades, la escisión Cas o nickasa Cas abarca un agente de unión a ADN dCas modificado para permitir la escisión del ADN, por ejemplo, mediante fusión con un dominio FokI. En algunas

modalidades, el agente de unión a ADN guiado por ARN tiene actividad nucleasa, por ejemplo, actividad de cleavasa o nickasa.

[00562] «Ribonucleoproteína» (RNP) o «complejo RNP» como se usa en el presente documento describe un ARNsg, por ejemplo, junto con una nucleasa, tal como una proteína Cas. En algunas modalidades, el RNP comprende Cas9 y ARNg (por ejemplo, ARNsg, ARNdg o ARNcr). En algunas modalidades, el ARN guía guía la nucleasa tal como Cas9 hacia una secuencia diana, y el ARN guía se hibrida con la secuencia diana y el agente se une a ella; en los casos en los que la nucleasa o proteína Cas es una escisión o nickasa, la unión puede ir seguida de una escisión o mella.

[00563] «Bucle de tallo», como se utiliza en el presente documento, describe una estructura secundaria de nucleótidos que forman un «tallo» de pares de bases que termina en un bucle de ácidos nucleicos no apareados. Se puede formar un tallo cuando dos regiones de la misma cadena de ácido nucleico tienen una secuencia al menos parcialmente complementaria cuando se leen en direcciones opuestas. «Bucle», como se utiliza en el presente documento, describe una región de nucleótidos que no tienen pares de bases (es decir, no son complementarios) y que pueden tapar un tallo. Un "tetrabucle" describe un bucle de 4 nucleótidos. Como se usa en el presente documento, el tallo superior de un ARNsg puede comprender un tetrabucle.

[00564] «Sustituido» o «sustitución» como se usan en el presente documento con respecto a un polinucleótido se refiere a una alteración de una nucleobase, por ejemplo, sustitución de nucleótidos, que cambia su base preferida para el emparejamiento Watson-Crick. Cuando una determinada región de un ARN guía «no está sustituida» como se usa en el presente documento (por ejemplo, SEQ ID NO: 200 a 210 y 500 a 501 como se muestra en la Tabla 1A), la secuencia de la región se puede alinear con la de la poción conservada correspondiente, por ejemplo, de un ARNsg de spyCas9 (SEQ ID NO: 400) o de cualquier otro ARNg (por ejemplo, parte de SEQ ID NO: 200 a 210 y 500 a 501) con espacios y coincidencias únicamente (es decir, sin coincidencias erróneas), donde se considera que las bases coinciden si tienen la misma base compañera estándar preferida (A, C, G o T/U) para el emparejamiento de Watson-Crick o pueden formar un dúplex mediante el apilamiento de bases.

[00565] Como se usa en el presente documento, una «sustitución conservadora» con respecto a un polinucleótido se refiere a una alteración de una nucleobase que significa intercambiar posiciones de nucleótidos con emparejamiento de bases de manera que se puedan mantener los pares de bases. Por ejemplo, un par G-C se convierte en un par C-G, un par AU en un par UA u otro par de bases naturales o modificado.

[00566] Como se usan en el presente documento, «sustituido» y similares, con respecto a nucleótidos no apareados, por ejemplo, bucles de las regiones de repetición y antirrepetición, horquilla 1 o horquilla 2, es decir, los nucleótidos 49 a 52, 87 a 90 y 122 a 125 en la SEQ ID NO: 500, respectivamente, u otros nucleótidos desapareados, es la sustitución de uno o más nucleótidos, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 nucleótidos, de la secuencia de nucleótidos con un nucleótido diferente que no interfiere con la formación de una estructura mediante los nucleótidos desapareados, por ejemplo, un abultamiento, un bucle, para permitir la formación de una o más porciones dúplex, por ejemplo, en las regiones de repetición y antirrepetición, horquilla 1 u horquilla 2.

[00567] Como se usan en el presente documento, «sustituido» y similares, con respecto a un conector interno, es la sustitución de al menos 1, preferiblemente al menos 2 nucleótidos con un conector interno. En determinadas modalidades, el conector interno tiene aproximadamente la misma longitud de puente prevista que el número de nucleótidos reemplazados por el conector. En determinadas modalidades, el conector interno es más corto que la longitud de puente prevista del número de nucleótidos reemplazados por el conector. En determinadas modalidades, el conector interno es más largo que la longitud de puente prevista de la cantidad de nucleótidos reemplazados por el conector. En ciertas modalidades, el conector interno sustituye además una porción de la porción dúplex de una porción de repetición y antirrepetición de un ARNg. En determinadas modalidades, el conector interno sustituye a una porción de la porción de bucle de un bucle de tallo en el ARNg. En determinadas modalidades, el conector interno sustituye una porción de la porción dúplex de un bucle de tallo en el ARNg.

[00568] Como se usa en el presente documento, una «porción no unida de un ARNg» con referencia a un ARNg que comprende un conector interno es una molécula que comprende solo los nucleótidos en un lado u otro del conector y opcionalmente el conector mismo o una

parte de este. También puede comprender un resto reactivo al final de la secuencia de nucleótidos, conector o parte de este, o una versión inactivada del resto reactivo.

[00569] «ARN guía», «ARNg» y «guía» se utilizan aquí indistintamente para referirse a un ARNcr (también conocido como ARN CRISPR) o a la combinación de un ARNcr y un ARNtr (también conocido como ARNtracr). El ARNcr y el ARNtr pueden asociarse como una única molécula de ARN (ARN guía única, ARNsg) o en dos moléculas de ARN separadas (ARN guía dual, ARNdg). «ARN guía» o «ARNg» se refiere a cada tipo. El ARNtr puede ser una secuencia natural o una secuencia de ARNtr con modificaciones o variaciones en comparación con secuencias naturales. Los ARN guía pueden incluir ARN modificados como se describe en el presente documento. A menos que se desprenda lo contrario del contexto, un ARN guía tal como se utiliza en el presente documento incluye al menos un conector interno.

[00570] «Conector interno», como se utiliza en el presente documento, describe un segmento no nucleotídico que une dos nucleótidos dentro de un ARN guía. Si el ARNg contiene una región espaciadora, el conector interno se encuentra fuera de la región espaciadora (p. ej., en el andamiaje o la región conservada del ARNg). Para guías de Tipo V, se entiende que la última horquilla es la única horquilla en la estructura, es decir, la región de la de repetición y antirrepetición. Como se usa en el presente documento, el conector es un conector no nucleotídico.

[00571] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «alifático» se refiere a compuestos de hidrocarburos no aromáticos en los que los átomos de carbono constituyentes pueden ser de cadena lineal, cíclica o ramificada, saturados o insaturados. En determinadas modalidades, alifático también incluye hidrocarburos heterocíclicos. Los hidrocarburos cíclicos y heterocíclicos se refieren a estructuras de anillos en las que los átomos de carbono constituyentes, junto con cualquier heteroátomo en un grupo heterocíclico, forman el anillo. Los hidrocarburos cíclicos y heterocíclicos también pueden contener enlaces simples, dobles o triples. Alifático $C_{1-x}$ se refiere a un grupo alifático que tiene de 1 a x átomos de carbono constituyentes. Un grupo alifático puede formar uno o más enlaces químicos con otros restos a través de cualquiera de sus átomos de carbono constituyentes. Los grupos alifáticos pueden ser monovalentes o divalentes según lo determine el contexto en el que se utiliza el término.

[00572] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «alquileno» se refiere a una cadena alifática bivalente saturada, que puede ser lineal o ramificada. Los radicales alquileno típicos incluyen, entre otros: metileno ($CH_2$), 1,2-etilo ($CH_2CH_2$), 1,3-propil ($CH_2CH_2CH_2$), 1,4-butilo ($CH_2CH_2CH_2CH_2$) y similares.

[00573] Tal como se utiliza en el presente documento, el término «alquenileno» se refiere a una cadena alifática bivalente que está al menos parcialmente insaturada (por ejemplo, que contiene al menos un doble enlace), que puede ser lineal o ramificada. Los radicales alquenileno típicos incluyen, entre otros: 1,2-etileno (CH=CH).

[00574] Como se usa en el presente documento, «aceptor de enlaces de hidrógeno» se refiere a un sustituyente que comprende un heteroátomo capaz de formar un enlace de hidrógeno. Los aceptores de enlaces de H pueden ser monovalentes o divalentes según lo determine el contexto en el que se utiliza el término. Los aceptores de enlaces H incluyen sustituyentes que comprenden oxígeno, azufre o fósforo, o sustituyentes que comprenden hidroxi, alcoxi, tiol, éter, tioéter, carbonilo, amidas, carbonatos, carbamatos, fosfato, fosforotioato, fosfonato, sulfato o sulfonato o, por ejemplo, -O-, -OH, -OR, -ROR, -S-, -SH, -SR, -NH-, -NR-, -C(O)-R, -C(O)-O-, - OC(O)O-, -C(O)-OR, -OC(O)-OR, -C(O)-H, -C(O)-OH, -C(O)-NR-, -OC(O)-NR-, -NC(O)-NR-,-$OPO_3$,-$PO_3$,-$RPO_3$, -$P(O)_2O$-, -$OP(O)_2O$-, -OP(R)(O)O-, -OP(O)(S)O-, -$S(O)_2$-R, -$S(O)_2$-O, -$RS(O)_2$-R, -$RS(O)_2$-OR, -$S(O)_2$-, -$SO_3$.

[00575] La «longitud de puente» de un conector interno como se usa en el presente documento se refiere a la distancia o número de átomos en la cadena más corta de átomos en la ruta desde el primer átomo del conector (unido a un sustituyente 3', tal como oxígeno o fosfato), del nucleótido anterior al último átomo del conector (unido a un sustituyente 5', tal como oxígeno o fosfato) del siguiente nucleótido) (por ejemplo, de ~ a # en la estructura de Fórmula (I) descrita más adelante). En la siguiente tabla se proporcionan longitudes de puente aproximadas previstas para varios conectores.

[00576] En algunas modalidades, el ARNg (por ejemplo, ARNsg) comprende una «región guía», que a veces se denomina «espaciador» o «región espaciadora», por ejemplo, en Briner AE et ál., *Molecular Cell* 56:333-. 339 (2014) para ARNsg (pero aplicable en el presente documento a todos los ARN guía). La región guía o región espaciadora también se denomina a veces «región variable», «dominio guía» o «dominio diana». En algunas modalidades, una «región guía» precede inmediatamente a una «porción conservada de un ARNsg» en su

extremo 5' y en algunas modalidades, el ARNsg está acortado. En las Tablas 3A-B se muestra una «porción conservada de un ARNsg» a modo de ejemplo. En algunas modalidades, una «región diana» comprende una serie de nucleótidos en el extremo 5' de un ARNcr.

[00577] Como se utiliza en el presente documento, se entiende por «región de la de repetición y antirrepetición» la porción de la guía correspondiente al dúplex o los dúplex formados por las secuencias de ARNcr y ARNtr en un ARN guía. En un ARN guía único, las secuencias de ARNtr y ARNcr se truncan opcionalmente antes del enlace covalente. La posición exacta del truncamiento puede variar. El enlace covalente es habitualmente una secuencia corta de ARN que permite la formación de una horquilla, normalmente una estructura de tallo-bucle.

[00578] Una posición numérica o rango en el ARN guía se refiere a la posición determinada desde el extremo 5' a menos que se especifique otro punto de referencia; por ejemplo, el «nucleótido 5» en un ARN guía es el quinto nucleótido desde el extremo 5'; o «nucleótidos 5 a 8» se refiere a 4 nucleótidos que comienzan con el quinto nucleótido desde el extremo 5' y terminan con el octavo nucleótido hacia el extremo 3'.

[00579] En algunas modalidades, un ARNg comprende nucleótidos que «coinciden con el patrón de modificación» en los nucleótidos correspondientes o especificados de un ARNg descrito en el presente documento. Esto significa que los nucleótidos que coinciden con el patrón de modificación tienen las mismas modificaciones (por ejemplo, fosforotioato, 2'-fluoro, 2'-OMe, etc.) que los nucleótidos en las posiciones correspondientes del ARNg descrito en el presente documento, independientemente de si las nucleobases en esas posiciones coinciden. Por ejemplo, si en un primer ARNg, los nucleótidos 5 y 6, respectivamente, tienen modificaciones de 2'-OMe y fosforotioato, entonces este ARNg tiene el mismo patrón de modificación en los nucleótidos 5 y 6 que un segundo ARNg que también tiene 2'-OMe y modificaciones de fosforotioato en los nucleótidos 5 y 6, respectivamente, independientemente de si las nucleobases en las posiciones 5 y 6 son iguales o diferentes en el primer y segundo ARNg. Sin embargo, una modificación de 2'-OMe en el nucleótido 6, pero no en el nucleótido 7, no es el mismo patrón de modificación en los nucleótidos 6 y 7 que una modificación de 2'-OMe en el nucleótido 7, pero no en el nucleótido 6. De manera similar, un patrón de modificación que coincida en al menos 75 % del patrón de modificación de un ARNg descrito en el presente documento significa que al menos el 75 % de los nucleótidos tienen las mismas

modificaciones que las posiciones correspondientes del ARNg descrito en el presente documento. Las posiciones correspondientes pueden determinarse mediante alineación estructural o por pares.

[00580] En las Tablas 3A-B se muestra una «región conservada» de un ARNsg Cas9 de *S. pyogenes* (spyCas9 (también denominado «spCas9»)). La primera fila muestra la numeración de los nucleótidos, la segunda fila muestra la secuencia (por ejemplo, SEQ ID NO: 400) y la tercera fila muestra las regiones.

[00581] Como se usa en el presente documento, una región «acortada» en un ARNg es una región en una porción conservada de un ARNg que carece de al menos 1 nucleótido en comparación con la región correspondiente en una porción conservada de un ARNg no modificado (ver, por ejemplo, la Figura 11 ( SEQ ID NO: 400) o las Tablas 3A-B). Bajo ninguna circunstancia «acortado» implica ninguna limitación particular en un proceso o forma de producción del ARNg. En algunas modalidades, un ARNg comprende una región de horquilla 1 acortada, en donde (i) la región de horquilla 1 acortada carece de 6 a 8 nucleótidos; y (A) una o más de las posiciones H1-1, H1-2 o H1-3 está eliminada o sustituida con respecto a la SEQ ID NO: 400 o (B) una o más de las posiciones H1-6 a H1-10 está sustituida con relación a SEQ ID NO: 400; o (ii) la región de horquilla 1 acortada carece de 9 a 10 nucleótidos, incluidos H1-1 o H1-12; o (iii) la región de horquilla 1 acortada carece de 5 a 10 nucleótidos y una o más de las posiciones N18, H1-12 o N están sustituidas con respecto a la SEQ ID NO: 400 (ver Tabla 3A). En algunas modalidades, un ARNg no spyCas9 comprende una región de horquilla 1 acortada que carece de 6 a 8 nucleótidos y en la que una o más posiciones corresponden a H1-1, H1-2 o H1-3 en SEQ ID NO: 400 según se determina, por ejemplo, mediante alineación estructural o por pares, se elimina o se sustituye, se sustituye una o más de las posiciones correspondientes a H1-6 a H1-10 en la SEQ ID NO: 400, según se determina, por ejemplo, mediante alineación estructural o por pares. En algunas modalidades, un ARNg que no es spyCas9 comprende una región de horquilla 1 acortada que carece de 9 a 10 nucleótidos, incluidos los nucleótidos correspondientes a H1-1 o H1-12 en SEQ ID NO: 400 según se determina, por ejemplo, mediante alineación estructural o por pares. En algunas modalidades, un ARNg no spyCas9 comprende una región de horquilla 1 acortada que carece de 5 a 10 nucleótidos y se sustituye una o más posiciones correspondientes a N18, H1-12 o N en la SEQ ID NO: 400 como se determina, por ejemplo, por pares o alineación estructural. En

algunas modalidades, un ARNg comprende una región del tallo superior acortada, en donde la región de tallo superior acortada carece de 1 a 6 nucleótidos.

[00582] Como se usa en el presente documento, un «sitio YA» se refiere a un dinucleótido 5'-pirimidina-adenina-3'. Para aclarar, un «sitio YA» en una secuencia original que se altera modificando una base todavía se considera un sitio YA (modificado) en la secuencia resultante, independientemente de la ausencia de un dinucleótido YA literal. Un «sitio YA de región conservada» está presente en la región conservada de un ARNsg. Un «sitio YA de región guía» está presente en la región guía de un ARNsg. Un sitio YA no modificado en un ARNsg puede ser susceptible a la escisión por endonucleasas similares a la RNasa-A, por ejemplo, RNasa A. En ciertas modalidades, un sitio YA se modifica para reducir la susceptibilidad a la RNAsa A mediante una modificación del azúcar 2', por ejemplo, 2' OMe, 2'F o modificación de la estructura principal, por ejemplo, enlace fosforotioato. En determinadas modalidades, un sitio YA se modifica modificando la base de modo que ya no esté presente una secuencia YA.

[00583] Como se analiza en el presente documento, las posiciones de los nucleótidos correspondientes a las descritas con respecto al ARNg de spyCas9 pueden identificarse en otro ARNg con secuencia o similitud estructural mediante alineación estructural o por pares. La alineación estructural es útil cuando las moléculas comparten estructuras similares a pesar de una variación considerable de secuencia. Por ejemplo, spyCas9 y Casp de *Staphylococcus aureus* (SauCas9) tienen secuencias divergentes, pero una alineación estructural significativa. *Véase*, por ejemplo, la Figura 2(F) de Nishimasu et ál., *Cell* 162(5): 1113-1126 (2015). La alineación estructural se puede utilizar para identificar nucleótidos en un SauCas9 u otro ARNsg que corresponden a posiciones particulares, tales como las posiciones H1-1, H1-2 o H1-3, las posiciones H1-6 a H1-10, la posición H1-12, o las posiciones N18 o N de la porción conservada de un ARNsg de spyCas9 (por ejemplo, SEQ ID NO: 400) (ver Tabla 3A).

[00584] El alineamiento estructural implica identificar los residuos correspondientes en dos (o más) secuencias (i) al modelar la estructura de una primera secuencia usando la estructura conocida de la segunda secuencia o (ii) comparar las estructuras de la primera y la segunda secuencia cuando ambas son conocidas, e identificar el residuo en la primera secuencia posicionado de manera más similar a un residuo de interés en la segunda secuencia. Los residuos correspondientes se identifican en algunos algoritmos basados en la

minimización de la distancia en una posición dada (por ejemplo, la posición 1 de la nucleobase o el carbono 1' del anillo de pentosa para polinucleótidos, o carbonos alfa para polipéptidos) en las estructuras superpuestas (por ejemplo, qué conjunto de posiciones emparejadas proporciona una desviación cuadrática media minimizada para la alineación). Al identificar posiciones en un ARNg que no es spyCas9 correspondientes a las posiciones descritas con respecto al ARNg de spyCas9, el ARNg de spyCas9 puede ser la «segunda» secuencia. Cuando un ARNg de interés no spyCas9 no tiene una estructura conocida disponible, pero está más estrechamente relacionado con otro ARNg no spyCas9 que sí tiene una estructura conocida, puede ser más efectivo modelar el ARNg de interés no spyCas9 utilizando el estructura conocida del ARNg no spyCas9 estrechamente relacionado y luego comparar ese modelo con la estructura del ARNg spyCas9 para identificar el residuo correspondiente deseado en el ARNg no spyCas9 de interés. Existe una extensa literatura sobre modelado estructural y alineación de proteínas; las divulgaciones representativas incluyen US 6859736; US 8738343; y los citados en Aslam et ál., *Electronic Journal of Biotechnology* 20 (2016) 9–13. Para una discusión sobre el modelado de una estructura basada en una estructura o estructuras relacionadas conocidas, véase, por ejemplo, Bordoli et ál., *Nature Protocols*4 (2009) 1-13, y las referencias allí citadas. Véase también en la Figura 2(F) de Nishimasu et ál., *Cell* 162(5): 1113-1126 (2015) la alineación del ácido nucleico. Además, se han realizado extensos estudios estructurales sobre complejos de nucleasas Cas con sus ARN guía, véase, por ejemplo, Jiang et ál., *Science*. 26 de junio de 2015; 348 (6242): 1477-81; Anders et ál., *Nature*. 25 de septiembre de 2014; 513 (7519): 569-73; Zhu et ál., *Nat Struct Mol Biol*. 2019 agosto;26(8):679-685; Nishimasu et ál., *Cell*. 27 de febrero de 2014; 156(5):935-49; Nishimasu et ál., *Cell*. 27 de agosto de 2015; 162 (5): 1113-26; Hirano et ál., *Nat Commun*. 29 de abril de 2019;10(1):1968; Fuchsbauer et ál., *Mol Cell*. 19 de diciembre de 2019;76(6):922-937; Zhang et ál., *Nat Catal* 3, 813–823 (2020); Yamada et ál., *Mol Cell*. 16 de marzo de 2017;65(6):1109-1121; Hirano et ál., *Cell*. 25 de febrero de 2016;164(5):950-61; Gao et ál., *Cell Res*. 2016 agosto;26(8):901-13; y Stella et ál., *Nature*. 22 de junio de 2017; 546 (7659): 559-563. Errata en: *Nature*. 27 de julio de 2017; 547 (7664): 476; Qiao et ál., *Biotechnol Bioeng*. 8 de mayo de 2021 (doi: 10.1002/bit.27813 Epub antes de la impresión). Provistas de estas coestructuras, se puede determinar fácilmente la ubicación de regiones dúplex, horquillas y contactos entre las nucleasas y sus guías.

[00585] Una «secuencia diana», como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico a la que la región guía dirige una nucleasa para su escisión. En algunas modalidades, una proteína spyCas9 puede ser dirigida por una región guía a una secuencia diana mediante los nucleótidos presentes en la región guía.

[00586] Como se usa en el presente documento, el «extremo 5'» se refiere al primer nucleótido del ARNg (incluido un ARNdg (usualmente el extremo 5' del ARNcr del ARNdg), ARNsg), en el que la posición 5' no está unida a otro nucleótido.

[00587] Como se usa en el presente documento, una «modificación del extremo 5'» se refiere a un ARNg que comprende una región guía que tiene modificaciones en uno o más de uno (1) a aproximadamente siete (7) nucleótidos en su extremo 5', opcionalmente en donde el primer nucleótido (desde el extremo 5') del ARNg se modifica.

[00588] Como se usa en el presente documento, el «extremo 3'» se refiere al extremo o nucleótido terminal de un ARNg, en el que la posición 3' no está unida a otro nucleótido. En alguna modalidad, el extremo 3' está en la cola 3'. En algunas modalidades, el extremo 3' está en la porción conservada de un ARNg.

[00589] Como se usa en el presente documento, una «modificación del extremo 3'» se refiere a un ARNg que tiene modificaciones en uno o más de uno (1) a aproximadamente siete (7) nucleótidos en su extremo 3', opcionalmente en donde el último nucleótido (es decir, el más hacia 3' de los nucleótidos) del ARNg se modifican. Si está presente una cola 3', de 1 a aproximadamente 7 nucleótidos pueden estar dentro de la cola 3'. Si no está presente una cola 3', de 1 a aproximadamente 7 nucleótidos pueden estar dentro de la porción conservada de un ARNsg.

[00590] El «último», «penúltimo», «antepenúltimo», etc., nucleótido se refiere al nucleótido más 3', segundo más 3', tercero más 3', etc., respectivamente, en una secuencia dada. Por ejemplo, en la secuencia 5'-AAACTG-3', el último, penúltimo y antepenúltimo nucleótido son G, T y C, respectivamente. La frase «últimos 3 nucleótidos» se refiere al último, penúltimo y antepenúltimo nucleótido; de manera más general, «últimos N nucleótidos» se refiere al último al enésimo nucleótido, inclusive. «Tercer nucleótido desde el extremo 3' del extremo 3'» equivale a «antepenúltimo nucleótido». De manera similar, «tercer nucleótido desde el extremo 5' del extremo 5'» equivale a «tercer nucleótido en el extremo 5'».

[00591] Como se usa en el presente documento, una «modificación del extremo protector» (tal como una modificación protectora del extremo 5' o una modificación protectora del extremo 3') se refiere a una modificación de uno o más nucleótidos dentro de siete nucleótidos del extremo de un ARNsg que reduce la degradación del ARNsg, como la degradación exonucleolítica. En algunas modalidades, una modificación del extremo protector comprende modificaciones de al menos dos o al menos tres nucleótidos dentro de siete nucleótidos del extremo del ARNsg. En algunas modalidades, las modificaciones comprenden enlaces fosforotioato, modificaciones 2' tales como 2'-OMe o 2'-fluoro, 2'-H (ADN), ENA, UNA o una combinación de estos. En algunas modalidades, las modificaciones comprenden enlaces fosforotioato y modificaciones 2'-OMe. En algunas modalidades, se modifican al menos tres nucleótidos terminales, por ejemplo, con enlaces fosforotioato o con una combinación de enlaces fosforotioato y modificaciones 2'-OMe. Se abarcan modificaciones conocidas por los expertos en la técnica para reducir la degradación exonucleolítica.

[00592] En algunas modalidades, una «cola 3'» que comprende de 1 a 20 nucleótidos, opcionalmente de 1 a 7 nucleótidos o 1 nucleótido, y sigue a la porción conservada de un ARNsg en su extremo 3'. En determinadas modalidades, la base terminal es uracilo. En determinadas modalidades, la cola es un nucleótido y la base terminal es uracilo.

[00593] La «nucleasa Cas», también conocida como «proteína Cas», tal como se usa en la presente, abarca cleavasas Cas, nickasas Cas y agentes de unión a ADN dCas. Las cleavasas o nickasas dCas y los agentes de unión a ADN dCas incluyen un complejo Csm o Cmr de un sistema CRISPR de tipo III, la subunidad Cas10, Csm1 o Cmr2 de este, un complejo en cascada de un sistema CRISPR de tipo I, su subunidad Cas3 y nucleasas Cas de clase 2; un sistema CRISPR de tipo V que incluye Cas12, o una subunidad de este, tal como Cas12a (Cpf1) o Cas12e (CasX); y un sistema CRISPR tipo VI, que incluye Cas13d. Como se usa en el presente documento, una «nucleasa Cas de clase 2» es un polipéptido monocatenario con actividad de unión al ADN guiada por ARN, tal como una nucleasa Cas9 o una nucleasa Cpf1. Las nucleasas Cas de clase 2 incluyen cleavasas Cas de clase 2 y nickasas Cas de clase 2 (p. ej., variantes H840A, D10A o N863A), que además tienen actividad de nickasa o cleavasa de ADN guiadas por ARN, y agentes de unión a ADN dCas de clase 2, en los que la actividad nickasa o cleavasa está inactivada. Las nucleasas Cas de clase 2 incluyen, por ejemplo, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (por ejemplo,

variantes N497A, R661A, Q695A, Q926A), HypaCas9 (por ejemplo, variantes N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1.0) (por ejemplo, variantes K810A, K1003A, R1060A) y proteínas eSPCas9(1.1) (por ejemplo, variantes K848A, K1003A, R1060A) y modificaciones de estas. La proteína Cpf1, Zetsche et ál., *Cell*, 163: 1-13 (2015), es homóloga a Cas9 y contiene un dominio de nucleasa similar a RuvC. Las secuencias de Cpf1 de Zetsche se incorporan como referencia en su totalidad. Véase, por ejemplo, Zetsche, Tablas S1 y S3. «Cas9» abarca Spy Cas9, las variantes de Cas9 enumeradas en el presente documento y sus equivalentes. Véase, por ejemplo, Makarova et ál., *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et ál., *Molecular Cell,* 60:385-397 (2015).

[00594] Los sistemas CRISPR de clase 2 se caracterizan por tener una endonucleasa monomérica, en lugar de una nucleasa multimérica. Los sistemas CRISPR de clase 2 incluyen sistemas de Tipo II y Tipo V.

[00595] Los sistemas de tipo II incluyen una endonucleasa Cas9 relativamente grande que tiene un dominio de reconocimiento de ARN, dos dominios de nucleasa, un dominio HNH conectado a un dominio RuvC mediante un puente de hélice rico en arginina y un dominio de interacción con motivo adyacente protoespaciador (PAM). Los ARN guía tienden a ser relativamente largos, es decir, los ARN guía únicos suelen tener aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, o más, y se ha demostrado mediante varios estudios funcionales que incluyen múltiples regiones dúplex y horquillas 3' con respecto al espaciador (región de dominio de dirección) que incluye la región de la de repetición y antirrepetición y una segunda región de horquilla, que normalmente contiene una o dos estructuras de horquilla previstas.

[00596] Las endonucleasas Cas9 de tipo II incluyen endonucleasas Cas9 de tipo II-A, por ejemplo, *S. pyogenes* (Spy Cas9), y endonucleasas Cas9 de tipo II-C, por ejemplo, *C. jejuni* (Cje), *R. palustris* (Rpa), *R. rubrum* (Rru), *A. naeslundii* (Ana) y *C. diphtheriae* (Cdi).

[00597] Los sistemas de tipo V se caracterizan por nucleasas y guías relativamente más pequeñas. Las nucleasas tienen un único lóbulo de reconocimiento de ADN (REC) y un único lóbulo de nucleasa (NUC). Las guías se producen de forma natural como un único ARN de aproximadamente 40 a 45 nucleótidos de longitud e incluyen una única región de la de repetición y antirrepetición en horquilla de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud seguida de una región espaciadora de 23 a 25 nucleótidos. Los sistemas de tipo V incluyen

Cpf1 de *Francisella novicida* (FnCpf1), Cpf1 de *Lachnospiraceae bacterium* (LbCpf1) y Cpf1 de *Acidaminococcus sp*. Cpf1 (AsCpf1/ Cas 12a).

[00598] Como se usa en el presente documento, se considera que una primera secuencia «comprende una secuencia con al menos un X% de identidad con» una segunda secuencia si una alineación de la primera secuencia con la segunda secuencia muestra que el X% o más de las posiciones de la segunda secuencia en su totalidad coincide con la primera secuencia. Por ejemplo, la secuencia AAGA comprende una secuencia con 100% de identidad con la secuencia AAG porque una alineación daría el 100% de identidad porque hay coincidencias con las tres posiciones de la segunda secuencia. Las diferencias entre ARN y ADN (generalmente el intercambio de uridina por timidina o viceversa) y la presencia de análogos de nucleósidos como las uridinas modificadas no contribuyen a diferencias en identidad o complementariedad entre polinucleótidos siempre que los nucleótidos relevantes (como timidina, uridina o uridina modificada) tienen el mismo complemento (p. ej., adenosina para todas las timidina, uridina o uridina modificada; otro ejemplo es la citosina y la 5-metilcitosina, las cuales tienen guanosina o guanosina modificada como complemento). Así, por ejemplo, la secuencia 5'-AXG donde X es cualquier uridina modificada, como pseudouridina, N1-metil pseudouridina o 5-metoxiuridina, se considera 100% idéntica a AUG en el sentido de que ambas son perfectamente complementarias de la misma secuencia (5'-CAU). Los algoritmos de alineación ejemplares son los algoritmos Smith-Waterman y Needleman-Wunsch, que son conocidos en la técnica. Un experto en la técnica comprenderá qué elección de los ajustes de algoritmo y parámetro es apropiada para un par de secuencias dado que se alinearán; para secuencias de longitud generalmente similar e identidad esperada > 50% para aminoácidos o > 75% para nucleótidos, el algoritmo Needleman-Wunsch con los ajustes predeterminados de la interfaz de algoritmo Needleman-Wunsch proporcionada por el EBI en el servidor web www.ebi.ac.uk es generalmente apropiado.

[00599] «ARNm» se usa en el presente documento para referirse a un polinucleótido que es ARN o ARN modificado y comprende un marco abierto de lectura que puede traducirse en un polipéptido (es decir, puede servir como sustrato para la traducción mediante un ribosoma y ARNt aminoacilados). El ARNm puede comprender una cadena principal de fosfato-azúcar que incluye residuos de ribosa o análogos de estos, por ejemplo, residuos de 2'-metoxi ribosa. En algunas modalidades, los azúcares de una cadena principal de fosfato-azúcar de ácido

nucleico consisten esencialmente en residuos de ribosa, residuos de 2'-metoxi ribosa o una combinación de estos. En general, los ARNm no contienen una cantidad sustancial de residuos de timidina (p. ej., 0 residuos o menos de 30, 20, 10, 5, 4, 3 o 2 residuos de timidina; o menos del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% o 0,1% de contenido de timidina). Un ARNm puede contener uridinas modificadas en algunas o en todas sus posiciones de uridina. En algunas modalidades, un ARNm modificado comprende al menos un nucleótido en el que uno o más de los fosfatos, azúcares o nucleobases difieren de los de un nucleótido de adenosina, citidina, guanidina o uridina estándar.

[00600] Tal como se utiliza en el presente documento, un «sujeto» se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas modalidades, «sujeto» se refiere a humanos. En algunas modalidades, «sujeto» se refiere a animales no humanos. En algunas modalidades, «sujeto» se refiere a primates. En alguna modalidad, «sujeto» se refiere a primates no humanos. En algunas modalidades, los sujetos incluyen, entre otros, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos o gusanos. En determinadas modalidades, el sujeto no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, un ganado vacuno, un primate o un cerdo). En algunas modalidades, un sujeto puede ser un animal transgénico, un animal modificado genéticamente o un clon. En algunas modalidades de la invención, el sujeto es un adolescente. En algunas modalidades, se utilizan los términos «individuo» o «paciente» y pretenden ser intercambiables con «sujeto» en donde el sujeto es un sujeto humano.

[00601] Como se usa en el presente documento, «entregar» y «administrarK se usan indistintamente e incluyen aplicaciones *ex vivo* e *in vivo*.

[00602] La coadministración, como se usa en el presente documento, significa que se administran una pluralidad de sustancias lo suficientemente cercanas en el tiempo para que los agentes actúen juntos. La coadministración abarca la administración de sustancias juntas en una única formulación y la administración de sustancias en formulaciones separadas lo suficientemente cerca en el tiempo para que los agentes actúen juntos.

[00603] Como se usa en el presente documento, la frase «farmacéuticamente aceptable» significa aquello que es útil para preparar una composición farmacéutica que generalmente no es tóxica y no es biológicamente indeseable y que de otro modo no es inaceptable para uso farmacéutico. Farmacéuticamente aceptable generalmente se refiere a sustancias que no son

pirogénicas. Farmacéuticamente aceptable puede referirse a sustancias que son estériles, especialmente para sustancias farmacéuticas que son para inyección o infusión.

[00604]

## II. ARN GUÍA QUE COMPRENDEN CONECTORES INTERNOS

[00605] En el presente documento se proporcionan ARN guía (ARNg) que comprenden un conector interno para su uso en métodos de edición de genes.

### A. Ubicaciones/números de conectores internos

[00606] En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 1 nucleótido. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 2 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 3 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 4 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 5 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 6 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 7 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 8 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 9 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 10 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 11 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 12 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 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 o 28 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, un conector interno sustituye al menos a 28 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, un conector interno sustituye al menos 22 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 2 a 6 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector sustituye al menos 2 a 4 nucleótidos.

[00607] En algunas modalidades, un conector interno sustituye hasta 28 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, un conector interno sustituye hasta 22 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, un conector interno sustituye hasta 12 nucleótidos del ARNg.

[00608] En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 3 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 4 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 5 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 6 nucleótidos. En algunas

modalidades, el conector interno sustituye 7 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 8 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 9 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 10 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 11 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 12 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector sustituye de 2 a 28 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector sustituye de 2 a 22 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector sustituye de 2 a 12 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector sustituye de 2 a 6 nucleótidos. En algunas modalidades, el conector sustituye de 2 a 4 nucleótidos.

[00609] En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 3 a 30 átomos. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 6 a 30 átomos. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 30 átomos. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 12 a 30 átomos. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 15 a 30 átomos. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 18 a 30 átomos. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 21 a 30 átomos. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 12 a 21 átomos. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 21 átomos. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 6 a 12 átomos.

[00610] En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 3 a 30 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 12 a 30 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 12 a 24 átomos, y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 12 a 21 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 16 a 20 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene

una longitud de puente de aproximadamente 15 a 18 átomos, y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg.

[00611] En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 15 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 16 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 17 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 18 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 19 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 20 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 21 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 22 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 23 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 24 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 25 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 26 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 27 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 28 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 29 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 30 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg.

[00612] En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 21 átomos y el conector sustituye 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 21 átomos y el conector sustituye 6 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 21 átomos y el conector sustituye 8 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 21 átomos y el conector sustituye 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 21 átomos y el conector sustituye 10 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 21 átomos y el conector sustituye 12 nucleótidos del ARNg.

[00613] En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 18 átomos y el conector sustituye 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 18 átomos y el conector sustituye 6 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 18 átomos y el conector sustituye 8 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 18 átomos y el conector sustituye 4 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 18 átomos y el conector sustituye 10 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 18 átomos y el conector sustituye 12 nucleótidos del ARNg.

[00614] En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 18 átomos, opcionalmente, de 6 a 12 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 12 átomos, y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 8 a 10 átomos, y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg.

[00615] En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg. En

algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 7 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 8 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 10 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 11 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 12 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg.

[00616] En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 átomos y el conector sustituye 2 nucleótidos del ARNg.

[00617] En algunas modalidades, el conector interno está en una región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 3 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 3 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 4 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 5 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 6 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 7 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 8 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 9 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 10 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 11 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 12 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades,

el conector interno sustituye hasta 28 nucleótidos en la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el conector interno sustituye hasta 20 nucleótidos en la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el conector interno está flanqueado por nucleótidos que forman una región dúplex de al menos 2 pares de bases de longitud. En determinadas modalidades, el conector interno no está presente en un abultamiento en una región de repetición y antirrepetición.

[00618] En algunas modalidades, el conector interno está en una región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 2 nucleótidos de la región horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye hasta 22 nucleótidos de la región horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye hasta 12 nucleótidos de la región horquilla del ARNg.

[00619] En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 2 nucleótidos de la región horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 4 nucleótidos de la región horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 6 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 8 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 10 nucleótidos de la horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 12 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 14 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 16 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 18 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 20 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 22 nucleótidos de la horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye hasta 22 nucleótidos de la región horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2 a 6 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2 a 4 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno está flanqueado por nucleótidos que forman una región dúplex de al menos 2 pares de bases de longitud. En algunas modalidades,

el conector interno sustituye a toda una estructura en horquilla en una región de horquilla, es decir, no se forma un dúplex mediante los nucleótidos que flanquean el conector interno.

[00620] En algunas modalidades, el conector interno sustituye 1, 2, 3, 4, 5 o 6 pares de bases de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 1 par de bases de la región de horquilla del ARNg, es decir, nucleótidos que está previsto que formarán un par de bases en una estructura en horquilla de manera que una eliminación de 1 par de bases da como resultado la eliminación de dos nucleótidos y un número reducido de pares de bases en la estructura de horquilla en uno. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2 pares de bases de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 3 pares de bases de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 4 pares de bases de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 5 pares de bases de la de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 6 pares de bases de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 1 a 12 pares de bases de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 1 a 6 pares de bases de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 1 a 4 pares de bases de la región de horquilla del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye hasta 12 pares de bases de la región de horquilla del ARNg.

[00621] En algunas modalidades, el conector interno está en una región de nexo del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 2 nucleótidos de la región nexo del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 1 o 2 nucleótidos de la región de nexo del ARNg.

[00622] En algunas modalidades, el conector interno está en una estructura de horquilla entre una primera porción del ARNg y una segunda porción del ARNg, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00623] En algunas modalidades, el ARNg comprende tres conectores internos. En algunas modalidades, el ARNg comprende dos conectores internos. En algunas modalidades, el ARNg comprende un conector interno.

**Tallo superior de la región de repetición y antirrepetición**

[00624] En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición está en una estructura de horquilla entre una primera porción y una segunda porción de la región de repetición y antirrepetición, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00625] En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye 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 o 28 nucleótidos de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye hasta 28 nucleótidos en la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el conector interno sustituye hasta 20 nucleótidos en la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el conector interno sustituye hasta 12 nucleótidos en la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 4 nucleótidos en la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el conector interno sustituye de 4 a 20 nucleótidos en la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el conector interno sustituye de 4 a 14 nucleótidos en la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el conector interno sustituye de 4 a 6 nucleótidos en la región de repetición y antirrepetición.

[00626] En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye un bucle, o parte de este, de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla estructura. En algunas modalidades, el conector interno no sustituye una porción abultada de una región de repetición y antirrepetición.

[00627] En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye 2 nucleótidos del bucle de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye 3 nucleótidos del bucle de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye 4 nucleótidos del bucle de la estructura de horquilla.

[00628] En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y al menos 1 nucleótido del tallo

de la horquilla. En algunas modalidades, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos del tallo de la horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y al menos 2 nucleótidos del tallo de la horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y al menos 2 a 24 nucleótido del tallo de la horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y de 2 a 18 nucleótidos del tallo de la horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y de 2 a 8 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[00629] En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 o 24 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 2, 4, 6 u 8 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 2 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 4 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 6 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 8 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 10 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla.

[00630] En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o

12 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 1, 2, 3 o 4 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 1 par de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 2 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 3 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 4 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 5 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 6 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 7 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla.

[00631] En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye todos los nucleótidos constituyen el bucle de la estructura de horquilla.

[00632] En algunas modalidades, el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo superior de la estructura de horquilla.

**Región nexo**

[00633] En algunas modalidades, el conector interno sustituye 1 o 2 nucleótidos del bucle de la región nexo del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 6 a 18 átomos. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 6 a 12 átomos.

**Región de horquilla**

[00634] En algunas modalidades, el conector interno sustituye una estructura en horquilla en la región de horquilla del ARNg.

[00635] En algunas modalidades, la región de horquilla es equivalente a una región de horquilla que se puede obtener sustituyendo un conector interno por 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de una estructura de horquilla de un ARNg, por ejemplo, cualquiera de los ARNg mostrados en la Tabla 1A o cualquiera de las SEQ ID NO: 200-210 y 500-501.

[00636] En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2 a 22 nucleótidos de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2 a 12 nucleótidos de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2 a 6 nucleótidos de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2 a 4 nucleótidos de la estructura de horquilla. El ARNg que comprende un conector interno en la región de horquilla puede formar una porción dúplex en la región de horquilla. El conector interno en la región de horquilla puede sustituir el bucle y el ARNg puede formar una porción dúplex en la región de horquilla. El conector interno en la región de horquilla puede sustituir el bucle y uno o más pares de bases en la región de tallo y el ARNg puede formar una porción dúplex en la región ed horquilla.

[00637] En algunas modalidades, el conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la estructura de horquilla en la región de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la estructura de horquilla en la región de horquilla.

[00638] En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2, 3, 4 o 5 nucleótidos del bucle de la estructura en horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2 nucleótidos del bucle de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 3 nucleótidos del bucle de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 4 nucleótidos del bucle de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 5 nucleótidos del bucle de la estructura

de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2 a 5 nucleótidos del bucle de la estructura de horquilla.

[00639] En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructrura de horquilla y al menos 1 nucleótido del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructrura de horquilla y al menos 2 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla.

[00640] En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 o 24 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 2, 4, 6 u 8 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructrura de horquilla y 2 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructrura de horquilla y 4 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructrura de horquilla y 6 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructrura de horquilla y 8 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructrura de horquilla y hasta 24 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla.

[00641] En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 1, 2, 3, 4, 5 o 6 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 1, 2, 3 o 4 pares de bases tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructrura de horquilla y 1 par de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructrura de horquilla y 2 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el

conector interno sustituye el bucle de la estructrura de horquilla y 3 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla. En algunas modalidades, el conector interno sustituye el bucle de la estructrura de horquilla y 4 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla.

[00642] En algunas modalidades, el conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la estructura de horquilla.

[00643] En algunas modalidades, el conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo la estructura de horquilla.

[00644] En algunas modalidades, la horquilla es una horquilla 1 y el conector interno sustituye la horquilla 1. En algunas modalidades, el ARNg es un ARNg de *SpyCas9* y el conector interno sustituye la horquilla 1.

[00645] En modalidades adicionales, el ARNg comprende además una horquilla 2 en 3' con respecto a la horquilla 1. En algunas modalidades, el conector interno sustituye al menos 2 nucleótidos de un bucle de la horquilla 2.

[00646] En algunas modalidades, la horquilla 2 no incluye ninguna sustitución de conector interno. En algunas modalidades, el ARNg es un ARNg de Spy Cas9 y la horquilla 2 no incluye ninguna sustitución de conector interno.

[00647] En algunas modalidades, el ARNg comprende además una región guía. En modalidades adicionales, la región guía tiene 17, 18, 19, 20 o 21 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el ARNg no comprende una región guía.

[00648] En algunas modalidades, el ARNg es un ARN guía único (ARNsg).

[00649] En algunas modalidades, el ARNg comprende un ARNtracr (ARNtr).

**B. Estructuras de enlaces internos: propiedades físicas, propiedades químicas.**

[00650] Los ARNg descritos en el presente documento comprenden un conector interno. En general, se puede utilizar cualquier conector interno compatible con la función del ARNg. Puede ser deseable que el conector tenga cierto grado de flexibilidad. En algunas modalidades, el conector interno comprende al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o más enlaces simples en la ruta. Un enlace está en la vìa si es parte de la vìa más corta de enlaces entre los dos nucleótidos cuyas posiciones 5' y 3' están conectadas al conector.

[00651] En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 6 a 40 Angstrom. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 8 a 25 Angstrom. En algunas modalidades, el conector interno

tiene una longitud de puente de alrededor de 8 a 15 Angstrom. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 10 a 40 Angstrom. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 10 a 35 Angstrom. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 10 a 30 Angstrom. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 10 a 25 Angstrom. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 15 a 40 Angstrom. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 15 a 35 Angstrom. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 15 a 25 Angstrom. En algunas modalidades, la longitud del conector se puede elegir basándose al menos en parte en el número de nucleótidos que el conector sustituye con respecto a un ARNg homólogo que no contiene un conector interno. Por ejemplo, si el conector toma el lugar de dos nucleótidos, se puede usar un conector que tenga una longitud de aproximadamente 8 a 15 Angstrom, tal como cualquiera de las modalidades descritas en otra parte del presente documento abarcadas dentro del rango de aproximadamente 8 a 15 Angstrom. Si el conector toma el lugar de más d edos nucleótidos, se usa un conector con una longitud de alrededor de 10 a 25 Angstrom, tal como cualquiera de las modalidades descritas en otra parte del presente y comprendidas en el rango de alrededor de 10 a 25 Angstrom.

[00652] Se proporcionan longitudes de conector previstas a modo de ejemplo por número de átomos, número de unidades de etilenglicol, longitud aproximada del conector en Angstrom en el supuesto de que un monómero de etilenglicol tiene aproximadamente 3,7 Angstrom y ubicación adecuada para la sustitución de al menos toda la porción de bucle de una estructura de horquilla en la siguiente tabla. La sustitución de dos nucleótidos requiere una longitud del conector de al menos aproximadamente 11 Angstrom. La sustitución de al menos 3 nucleótidos requiere una longitud de conector de alrededor de 16 Angstrom.

**Tabla 1**

| Número de átomos | Número de unidades de etilenglicol | Longitud aproximada en Angstroms | Ubicación adecuada para la sustitución completa del bucle |
|---|---|---|---|
| 3 | 1 | 3,7 | Repetición y antirrepetición (tanto para |

| Número de átomos | Número de unidades de etilenglicol | Longitud aproximada en Angstroms | Ubicación adecuada para la sustitución completa del bucle |
|---|---|---|---|
| | | | bucle como tallo, cuando no está presente el tallo) |
| 6 | 2 | 7,4 | Repetición y antirrepetición (tanto para bucle como tallo, cuando no está presente el tallo) |
| 9 | 3 | 11,1 | Repetición y antirrepetición (para tanto bucle y tallo, cuando no está presente el tallo), nexo |
| 12 | 4 | 14,8 | Nexo |
| 15 | 5 | 18,5 | Repetición y antirrepetición, horquilla 1, horquilla 2 |
| 18 | 6 | 22,2 | Repetición y antirrepetición, horquilla 1, horquilla 2 |
| 21 | 7 | 25,9 | Repetición y antirrepetición, horquilla 1, horquilla 2 |
| 24 | 8 | 29,6 | Repetición y antirrepetición, horquilla 1, horquilla 2 |
| 27 | 9 | 33,3 | Repetición y antirrepetición, horquilla 1, horquilla 2 |
| 30 | 10 | 37 | Repetición y antirrepetición, horquilla 1, horquilla 2 |

[00653] En algunas modalidades, el conector interno comprende una estructura de fórmula (I):

~-L0-L1-L2-#

(I)

en donde:

~ indica un enlace a un sustituyente 3' del nucleótido anterior;

# indica un enlace a un sustituyente 5' del siguiente nucleótido;

L0 es nulo o alifático $C_{1-3}$;

L1 es $–[E^1-(R^1)]_m-$, donde

cada $R^1$ es independientemente un grupo alifático $C_{1-5}$, opcionalmente sustituido con 1 o 2 $E^2$,

cada $E^1$ y $E^2$ son aceptores independientes de enlaces de hidrógeno, o se eligen cada uno independientemente de hidrocarburos cíclicos e hidrocarburos heterocíclicos, y

cada m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y

L2 es nulo, alifático $C_{1-3}$ o es un aceptor de enlace de hidrógeno.

[00654] En algunas modalidades, L1 comprende una o más unidades $-CH_2CH_2O-$, $-CH_2OCH_2-$ o $-OCH_2CH_2-$ (subunidades de etilenglicol). En algunas modalidades, el número de unidades $-CH_2CH_2O-$, $-CH_2OCH_2-$ o $-OCH_2CH_2-$ está en el rango de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

[00655] En algunas modalidades, m es 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas modalidades, m es 1, 2 o 3. En algunas modalidades, m es 6, 7, 8, 9 o 10.

[00656] En algunas modalidades, L0 es nulo. En algunas modalidades, L0 es $-CH_2-$ o $-CH_2CH_2-$.

[00657] En algunas modalidades, L2 es nulo. En algunas modalidades, L2 es -O-, -S- o alifático $C_{1-3}$ . En algunas modalidades, L2 es -O-. En algunas modalidades, L2 es -S-. En algunas modalidades, L2 es $-CH_2-$ o $-CH_2CH_2-$.

[00658] Las identidades y valores de los restos y variables en la Fórmula I se pueden elegir para proporcionar un conector interno que tenga cualquiera de las longitudes de puente descritas en el presente documento. En algunas modalidades, el número de átomos en la cadena más corta de átomos en la vía de ~ a # en la estructura de Fórmula (I) es 30 o menos, o 27 o menos, o 24 o menos, o 21 o menos, o 18 o menos, o 15 o menos, o 12 o menos, o 10 o menos.

[00659] En algunas modalidades, el número de átomos en la cadena más corta de átomos en la vía de ~ a # en la estructura de Fórmula (I) es de 6 a 30, o es de 9 a 30, o es de 9 a 21. En algunas modalidades, el número de átomos en la cadena de átomos más corta en la vía de ~ a # en la estructura de Fórmula (I) es 9. En algunas modalidades, el número de

átomos en la cadena de átomos más corta en la vía de ~ a # en la estructura de la Fórmula (I) es 18.

[00660] En algunas modalidades, cada grupo alifático $C_{1-3}$ y grupo alifático $C_{1-5}$ está saturado. En algunas modalidades, al menos un grupo alifático $C_{1-5}$ es un alquileno $C_{1-4}$ , o en donde al menos dos grupos alifáticos $C_{1-5}$ son un alquileno $C_{1-4}$ , o en donde al menos tres grupos alifáticos $C_{1-5}$ son un alquileno $C_{1-4}$ . En algunas modalidades, al menos un $R^1$ se selecciona de $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$ o $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$. En algunas modalidades, cada $R^1$ se selecciona independientemente de $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$ o $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$. En algunas modalidades, cada $R^1$ es $-CH_2CH_2-$.

[00661] En algunas modalidades, al menos un grupo alifático $C_{1-5}$ es un alquileno $C_{1-4}$, o en donde al menos dos grupos alifáticos $C_{1-5}$ son alquenileno $C_{1-4}$, o en donde al menos tres grupos alifáticos $C_{1-5}$ son un alquenileno $C_{1-4}$. En algunas modalidades, al menos un $R^1$ se selecciona de $-CHCH-$, $-CHCHCH_2-$ o $-CH_2CHCHCH_2-$.

[00662] En algunas modalidades, cada $E^1$ se selecciona independientemente de -O-, -S-, -NH-, -NR-, -C(O)-O-, -OC(O)O-, -C(O)-NR-, -OC(O)-NR-, -NC(O)-NR-, $-P(O)_2O-$, $-OP(O)_2O-$, -OP(R)(O)O-, -OP(O)(S)O-, $-S(O)_2-$ e hidrocarburos cíclicos e hidrocarburos heterocíclicos. En algunas modalidades, cada $E^1$ se elige independientemente de -O-, -S-, -NH-, -NR-, -C(O)-O-, -OC(O)O-, $-P(O)_2O-$, $-OP(O)_2O-$ y -OP(R)(O)O.

[00663] En algunas modalidades, cada $E^1$ es -O-.

[00664] En algunas modalidades, cada $E^1$ es -S-.

[00665] En algunas modalidades, al menos un grupo alifático $C_{1-5}$ en $R^1$ está opcionalmente sustituido con un $E^2$.

[00666] En algunas modalidades, cada $E^2$ se selecciona independientemente de -OH, -OR, -ROR, -SH, -SR, -C(O)-R, -C(O)-OR, -OC(O)-OR, -C(O)-H, -C(O)-OH, $-OPO_3$, $-PO_3$, $-RPO_3$, $-S(O)_2-R$, $-S(O)_2-OR$, $-RS(O)_2-R$, $-RS(O)_2-OR$, $-SO_3$ e hidrocarburos cíclicos e hidrocarburos heterocíclicos. En algunas modalidades, cada $E^2$ se elige independientemente entre -OH, -OR, -SH, -SR, -C(O)-R, -C(O)-OR, -OC(O)-OR,$-OPO_3$, $-PO_3$,$-RPO_3$ y $-SO_3$.

[00667] En algunas modalidades, cada $E^2$ es -OH u -OR.

[00668] En algunas modalidades, cada $E^2$ es -SH o -SR.

[00669] En algunas modalidades, el conector interno comprende al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis subunidades de etilenglicol unidas covalentemente entre sí. En algunas

modalidades, el conector interno comprende un conector que tiene de 1 a 10 unidades de etilenglicol. En algunas modalidades, el conector interno comprende un conector que tiene de 2 a 7 unidades de etilenglicol. En algunas modalidades, el conector interno comprende un conector que tiene de 3 a 6 unidades de etilenglicol. En algunas modalidades, el conector interno comprende un conector que tiene 3 unidades de etilenglicol. En algunas modalidades, el conector interno comprende un conector que tiene 6 unidades de etilenglicol.

[00670] En algunas modalidades, el conector interno comprende un conector de polietilenglicol. En algunas modalidades, el conector interno comprende un conector de polietilenglicol que tiene de 1 a 9 unidades de etilenglicol. En algunas modalidades, el conector interno comprende un conector de polietilenglicol que tiene de 3 a 6 unidades de etilenglicol. En algunas modalidades, el conector interno comprende un conector de polietilenglicol que tiene 3 unidades de etilenglicol. En algunas modalidades, el conector interno comprende un conector de polietilenglicol que tiene 6 unidades de etilenglicol.

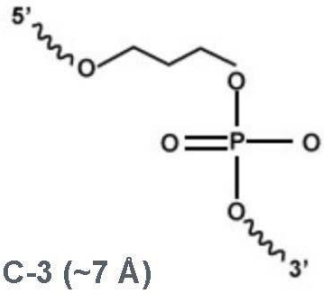
[00671] En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente, de 15 a 21 átomos y el conector sustituye al menos 4 nucleótidos del ARNg. Para abreviar, se hace referencia a un conector interno que tiene una longitud de puente de aproximadamente 15 a 21 átomos en otra parte del presente documento como «conector 1». El conector interno que tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente aproximadamente 15 a 21 átomos, puede elegirse de cualquiera de las modalidades descritas en el presente documento. El conector interno que tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente aproximadamente 15 a 21 átomos, puede tener cualquier característica compatible descrita en el presente documento para conectores internos.

[00672] En algunas modalidades, un conector comprende una pluralidad de subunidades de polietilenglicol, tales como al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 subunidades de polietilenglicol. En algunas modalidades, un conector comprende al menos 5, 6 o 7 subunidades de polietilenglicol. En algunas modalidades, un conector consiste en al menos 5, 6 o 7 subunidades de polietilenglicol.

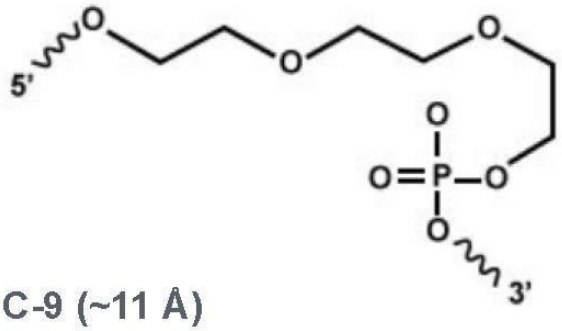
[00673] En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 18 átomos, opcionalmente, de 6 a 12 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg. Para abreviar, se hace referencia a un conector interno que

tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 18 átomos, opcionalmente aproximadamente 6 a 12 átomos, en otra parte del presente documento como «conector 2». El conector interno que tiene una longitud de puente de alrededor de 6 a 18 átomos, opcionalmente, alrededor de 6 a 12 átomos, se puede seleccionar de cualquiera de las modalidades descritas en la presente. El conector interno que tiene una longitud de puente de alrededor de 6 a 12 átomos puede tener cualquier rasgo compatible descrito en la presente para conectores internos. En algunas modalidades, un conector 2 comprende una pluralidad de subunidades de polietilenglicol (PEG), tal como al menos 2, 3 o 4 subunidades de polietilenglicol. En algunas modalidades, un conector 1 consiste en al menos 2, 3 o 4 subunidades de polietilenglicol. En algunas modalidades, un conector 1 consiste en al menos 2, 3 o 4 subunidades de polietilenglicol.

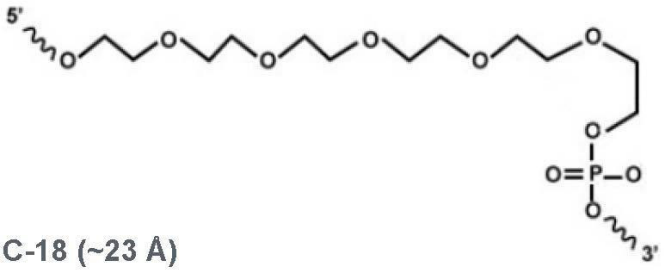
[00674] Los ejemplos de conectores que contienen PEG incluyen los siguientes:




C-3 (~7 Å)




C-9 (~11 Å)




C-18 (~23 Å)

[00675] Los conectores para uso en las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente de diversas fuentes que incluyen, entre otras, Biosearch Technologies (p. ej., fosforamidita espaciadora CE C2, 2-(4,4'-dimetoxitritiloxi) etil-1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita y amidita espaciadora C6 (DMT-1,6-hexandiol)); Glen Research (espaciador fosforamidita C3, 3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propil-1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita; espaciador fosforamidita 9,9-O-dimetoxitritil-trietileno glicol, 1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita; espaciador C12 CE fosforamidita, 12-(4,4'-dimetoxitritiloxi)dodecil-1-[(2-cianoetil)-(N ,N-diisopropil)]-fosforamidita y espaciador fosforamidita 18, 18-O-dimetoxitritilhexaetilenglicol, 1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita).

**C. Métodos de fabricación**

[00676] Se proporcionan métodos para sintetizar un ARNg que comprende un conector interno descrito en el presente documento. Se pueden introducir precursores adecuados, por ejemplo, un conector, en un oligonucleótido de ARNsg utilizando el componente básico de fosforamidita correspondiente en métodos para producir ARNsg en un único proceso sintético. Dichos bloques de construcción están disponibles comercialmente o pueden prepararse mediante métodos conocidos.

[00677] Los métodos de síntesis incluyen una serie de reacciones de acoplamiento secuenciales que incluyen unir covalentemente un primer nucleótido a un segundo nucleótido; unir covalentemente un conector interno a un segundo nucleótido; y unir covalentemente un tercer nucleótido al conector interno. En determinadas modalidades, dichos enlaces se realizan usando química de fosforamidita. En determinadas modalidades, el método incluye un enlace covalente de un segundo conector al primer conector antes del enlace covalente del tercer nucleótido.

[00678] En algunas modalidades, se proporciona un soporte sólido unido covalentemente al conector del ARNg descrito en el presente documento.

[00679] El ARNg provisto en este documento con conectores internos se produce en un único proceso sintético de modo que se produce una cadena de ARNg de longitud completa (ARNsg, ARNcr o ARNtr) mediante el método sintético. En el caso de un ARNdg, el ARNcr y el ARNtr se sintetizan por separado y se hibridan. Es decir, cuando el ARNg se produce como ARNdg, las porciones sintetizadas por separado no requieren enlace covalente para formar un

ARNg estable. En determinadas modalidades, el ARNcr y el ARNtr de un ARNdg que contiene un conector interno como se proporciona en el presente documento no incluyen un enlace covalente entre el ARNcr y el ARNtr.

[00680] En modalidades preferidas, el ARNg no se produce mediante química de clic.

**D. Tipos de ARN guía**

[00681] En algunos casos, el ARN guía es un ARN guía único.

[00682] En algunas modalidades, el ARN guía comprende un ARNtracr (ARNtr).

[00683] Las secuencias de ARNg ejemplares se muestran en la Tabla 1A a continuación. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NO: 200 a 210 y 500 a 501 en donde un conector interno sustituye uno o más nucleótidos. En algunas modalidades, al menos un nucleótido que se muestra en negrita en la Tabla 1A se reemplaza con un conector interno. En algunas modalidades, al menos dos nucleótidos consecutivos que se muestran en negrita en la Tabla 1 se reemplazan con un conector interno. En algunas modalidades, al menos tres nucleótidos consecutivos indicados en negrita en la Tabla 1A se reemplazan con un conector interno. En algunas modalidades, al menos cuatro nucleótidos consecutivos indicados en negrita en la Tabla 1A se reemplazan con un conector interno. En algunas modalidades, al menos dos nucleótidos no consecutivos indicados en negrita en la Tabla 1A se reemplazan con un conector interno. En algunas modalidades, al menos los primeros dos o más nucleótidos consecutivos y al menos los segundos dos o más nucleótidos consecutivos mostrados en negrita en la Tabla 1A se reemplazan con un conector interno, en donde los primeros dos o más nucleótidos consecutivos no son consecutivos con los segundos dos o más nucleótidos consecutivos. En algunas modalidades, al menos unos primeros tres o más nucleótidos consecutivos y al menos unos segundos tres o más nucleótidos consecutivos indicados en negrita en la Tabla 1A se reemplazan con un conector interno, en donde los primeros tres o más nucleótidos consecutivos no son consecutivos con los segundos tres o más nucleótidos consecutivos. En algunas modalidades, al menos unos primeros cuatro o más nucleótidos consecutivos y al menos unos segundos dos o más nucleótidos consecutivos indicados en negrita en la Tabla 1A se reemplazan con un conector interno, en donde los primeros cuatro o más nucleótidos consecutivos no son consecutivos con los segundos dos o más nucleótidos consecutivos. En algunas modalidades, al menos unos primeros cuatro o más nucleótidos consecutivos y al

menos unos segundos cuatro o más nucleótidos consecutivos indicados en negrita en la Tabla 1A se reemplazan con un conector interno, en donde los primeros cuatro o más nucleótidos consecutivos no son consecutivos con los segundos cuatro o más nucleótidos consecutivos.

**Tabla 1A. Tabla de ARN guía ejemplares** (como se usa en el presente documento, «Conector 1» se refiere a un conector interno que tiene una longitud de puente de aproximadamente 15 a 21 átomos. Como se usa en el presente documento, «Conector 2» se refiere a un conector interno que tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 12 átomos).

| **tipo Cas** | **Longitud (nt)** | **SEQ ID NO:** | **Secuencia de ARNg (Ejemplos de nucleótidos sujetos a sustitución con conectores internos en negrita. En algunas modalidades, la negrita cursiva indica el Enlazador 1 y la negrita romana (no la cursiva) indica reemplazos del Enlazador 2).** | **Cantidad de conectores** |
|---|---|---|---|---|
| SpyCas9[1-4] | 100 | **200** | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUUGUACUC***GAAA***GAAGCUACAAAGAUAAGGCU**UC**AUGCC GAAAUCAACACCCUGUCAU***UUU***AUGGCAGGGUGU | 3 |
| SpyCas9[1-4] | 90 | **201** | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGCUGGGGAGCCU***GAAA***AGGCUACCUAGCAAGACCCC***UUCG***UG GGGUCGCAUUCUUCACCCCC***AGCA***GGGGGUUC | 3 |
| SauCas9[5] | 100 | **202** | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGUACUCUG***GAAA***CAGAAUCUACUAAAACAAGGCA**AA**A UGCCGUGUUUAUCUCGUCAA***CUUG***UUGGCGAGAUUUU | 3 |
| CdiCas9[6] | 113 | **203** | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNACUGGGGUUCAG***GAAA***CUGAACCUCAGUAAGCAUUGGC**UC**GU UUCCAAUGUUGAUUGCUCCGCCGGUGCUCCUUA***UUUU***UAAGGGCGCCGGCA | 3 |
| St1Cas9[7] | 117 | **204** | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUUGUACUCUCAAGAUU***CAAU***AAUCUUGCAGAAGCUACAA AGAUAAGGCUUCAUGCCGAAAUCAACACCCUGUCAU***UUU***AUGGCAGGGUGUUUU | 2 |
| SthCas9[8] | 97 | **205** | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUUGUACUC***GAAA***GAAGCUACAAAGAUAAGGCU**UC**AUGCC GAAAUCAACACCCUGUCAU***UUU***AUGGCAGGGGUGU | 3 |
| AceCas9 | 94 | **206** | NNNNNNNNNNNNNNNNNNGCUGGGGAGCCU***GAAA***AGGCUACCUAGCAAGACCCC***UUCG***UGGG GUCGCAUUCUUCACCCCC***AGCA***GGGGGUUC | 3 |
| CjeCas9[9] | 93 | **207** | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGUCCCU***GAAA***AGGGACUAAAAUAAAGAGUUUGCGGGA CUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGC | 1 |

| **tipo Cas** | **Longitud (nt)** | **SEQ ID NO:** | **Secuencia de ARNg (Ejemplos de nucleótidos sujetos a sustitución con conectores internos en negrita. En algunas modalidades, la negrita cursiva indica el Enlazador 1 y la negrita romana (no la cursiva) indica reemplazos del Enlazador 2).** | **Cantidad de conectores** |
|---|---|---|---|---|
| FnoCas9[10] | 94 | **208** | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUCAGUUGCGCC***GAAA***GGCGCUCUGUAAUCAUUAAAAAGUAUUUUGAACGGACCUCUGUUUGACACGUCUG | 1 |
| AsCpf1/Cas12a[11] | 45 | **209** | UAAUUUCUACU***CUU***GUAGAUNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN | 1 |
| EsCas13d[12] | 52 | **210** | CUGGUGCAA***AUUUG***CACUAGCUUAAAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN | 1 |
| NmeCas9[13] | 101-145 | **500** | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUGUAGCUCCCUUUCUCAUUUCG***GAAA***CGAAAUGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCU***GAAA***AGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCCUUAAAGC***UUCU***GCUUUAAGGGGCAUCGUUUA<br>(el subrayado indica los nucleótidos que se pueden eliminar) | 3 |
| Acortado NmeCas9 | 101 | **501** | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUGUAGCUCCCUUC***GAAA***GACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUC***GAAA***GAUGUGCCGCAACGCUCUGCC***UUCU***GGCAUCGUU | 3 |

Referencias para la guía de ARN para diferentes especies de Cas9:

1. *Science*. 26 de junio de 2015;348(6242):1477-81. doi: 10.1126/science.aab1452. PMID: 26113724.
2. *Nature*. 25 de setiembre de 2014;513(7519):569-73. doi: 10.1038/nature13579. Publicación electrónica 27 de julio de 2014. PMID: 25079318; PMCID: PMC4176945.

3. *Nat Struct Mol Biol*. agosto de 2019;26(8):679-685. doi: 10.1038/s41594-019-0258-2. Publicación electrónica del 8 de julio de 2019. PMID: 31285607; PMCID: PMC6842131.
4. *Cell*. 27 de febrero de 2014; 156 (5): 935-49. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001. Publicación electrónica del 13 de febrero de 2014. PMID: 24529477; PMCID: PMC4139937.
5. *Cell*. 27 de agosto de 2015; 162 (5): 1113-26. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.007. PMID: 26317473; PMCID: PMC4670267.
6. *Nat Struct Mol Biol*. 29 de abril de 2019;10(1):1968. doi: 10.1038/s41467-019-09741-6. PMID: 31036811; PMCID: PMC6488586.
7. *Mol Cell*. 19 de diciembre de 2019;76(6):922-937.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.012. Publicación electrónica del 8 de octubre de 2019. PMID: 31604602.
8. *Nat Catal* 3, 813–823 (2020). https://doi.org/10.1038/s41929-020-00506-9
9. *Mol Cell*. 16 de marzo de 2017;65(6):1109-1121.e3. doi: 10.1016/j.molcel.2017.02.007. PMID: 28306506.
10. *Cell*. 25 de febrero de 2016; 164 (5): 950-61. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.039. Publicación electrónica del 11 de febrero de 2016. PMID: 26875867; PMCID: PMC4899972.
11. *Cell Res*. agosto de 2016;26(8):901-13. doi: 10.1038/cr.2016.88. Publicación electrónica del 22 de julio de 2016. PMID: 27444870; PMCID: PMC4973337.
12. *Biotech. Bioeng*. 30 de abril de 2021; DOI: 10.1002/bit.27813; PMID: 33964175
13. *Mol Cell*. 19 de diciembre de 2019; 76(6): 938-952.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.025. Publicación electrónica 24 oct 2019). PMID: 31668930 PMCID: PMC6934045 DOI: 10.1016/j.molcel.2019.09.025

[00684] En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NO: 200 a 210 y 500, incluidas las modificaciones descritas en otra parte del presente documento. En las figuras 10A a 10E se muestran ejemplos de ARNsg en las que se muestran la región guía (región de unión al objetivo) y los nucleótidos que pueden sustituir los conectores internos. En la Tabla 1B se muestran varias modalidades de las estructuras y especies de ARNg con un posible número de posiciones y conectores internos.

**Tabla 1B.**

| **Estructuras de ARNg** | **Tipo** | **Cantidad de conectores internos** | **Posiciones de conectores internos** |
|---|---|---|---|
| Repetición/antirrepetición; nexo; Hp1; Hp2 | Spy | 3 | Región de repetición/antirrepetición; nexo (dentro de la horquilla o reemplazo de horquilla), Horquilla 1 (Hp1) |
| Repetición/antirrepetición; nexo; Hp1; Hp2 | Spy | 2 | Dos cualesquiera de Repetir/Anti-R; nexo (dentro de la horquilla o reemplazar horquilla), Hp1 |
| Repetición/antirrepetición; nexo; Hp1; Hp2 | Spy | 1 | Cualquiera de repetición/antirrepetición, nexo (con horquilla o reemplazo de horquilla), Hp1 |
| Repetición/antirrepetición; Hp1; Hp2 | Cdi, Sau, Sth y Ace | 3 | Todos de repetición/antirrepetición; Hp1; Hp2 |
| Repetición/antirrepetición; Hp1; Hp2 | Cdi, Sau, Sth y Ace | 2 | Para Sau, se prefiere no Hp2 |
| Repetición/antirrepetición; Hp1; Hp2 | Cdi, Sau, Sth y Ace | 1 | Para Sau, se prefiere no Hp2 |
| Repetición/antirrepetición; Hp1; Hp2 | St1 | 2 | Repetición/antirrepetición; Hp2 |
| Repetición/antirrepetición; Hp1; Hp2 | Cje | 1 | Repetición/antirrepetición |
| Repetición/antirrepetición | Cpf1 - varios | 1 | Repetición/antirrepetición |
| Repetición/antirrepetición; Hp1; Hp2 | NMe | 3 | Todos de repetición/antirrepetición; Hp1; Hp2 |
| Repetición/antirrepetición; Hp1; Hp2 | NMe | 2 | Cualquiera de repetición/antirrepetición; Hp1; Hp2 |

| Estructuras de ARNg | Tipo | Cantidad de conectores internos | Posiciones de conectores internos |
|---|---|---|---|
| Repetición/antirrepetición; Hp1; Hp2 | NMe | 1 | Cualquiera de repetición/antirrepetición; Hp1; Hp2 |

**a. ARN guía de SpyCas9**

[00685] En algunas modalidades, el ARN guía es un ARN guía de Cas9 de *S. pyogenes* (SpyCas9). Tal como se utiliza en este documento, un ARN guía de SpyCas9 significa que es funcional con SpyCas9. Lo mismo se aplica a otros ARNg para diferentes especies de Cas9 divulgadas en el presente documento.

[00686] En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 200 o 201. En algunas modalidades, el ARN guía es un ARN guía de SpyCas9 modificado. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 200 o 201 que incluyen modificaciones que se describen en otra parte de la presente.

[00687] En algunas modalidades, el ARNsg comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región nexo, una región de horquilla 1 y una región de horquilla 2, y comprende al menos uno de:

un primer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos, opcionalmente, al menos 4 nucleótidos, de una región del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición;

un segundo conector interno que sustituye 1 o 2 nucleótidos de la región de nexo; y

un tercer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la horquilla 1.

[00688] En la Fig. 10A se muestra un ejemplo de ARNsg de SpyCas9 en el que la región guía (región de unión al objetivo) y los nucleótidos que pueden sustituir el primer conector en la región de repetición y antirrepetición, el segundo conector en la región nexo y el tercer conector en la región de horquilla 1.

[00689] En algunas modalidades, el ARNsg comprende el primer conector interno y el segundo conector interno. En algunas modalidades, el ARNsg comprende el primer conector interno y el tercer conector interno. En algunas modalidades, el ARNsg comprende el segundo conector interno y el segundo conector interno. En algunas

modalidades, el ARNsg comprende el primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[00690] En algunas modalidades, el primer conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 30 átomos, opcionalmente, de 15 a 21 átomos.

[00691] En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región del tallo superior. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la región del tallo superior. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la región de tallo superior.

[00692] En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la región de tallo superior. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye 4 nucleótidos del bucle de la región de tallos superior.

[00693] En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle de la región del tallo superior y al menos 2, 4, 6 u 8 nucleótidos del tallo de la región del tallo superior. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle de región de tallo superior y 1, 2, 3 o 4 pares de bases del tallo de la región de tallo superior. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle de la región de tallo superior y un par de bases del tallo de la región de tallo superior. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle de la región de tallo superior y 2 pares de bases del tallo de la región de tallo superior. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle de la región de tallo superior y 3 pares de bases del tallo de la región de tallo superior. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle de la región de tallo superior y 4 pares de bases del tallo de la región de tallo superior.

[00694] En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la región de tallo superior (es decir, la porción del tallo sobre el abultamiento). En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo de la región de tallo superior.

[00695] En algunas modalidades, el abultamiento en la región de repetición y antirrepetición no contiene un conector. En algunas modalidades, la porción de tallo inferior de la región de repetición y antirrepetición no contiene un conector.

[00696] En algunas modalidades, el segundo conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 6 a 18 átomos, opcionalmente, de 9 a 18 átomos. En algunas

modalidades, el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de la región nexo del ARNsg.

[00697] En algunas modalidades, el tercer conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 30 átomos, opcionalmente, de 15 a 21 átomos.

[00698] En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye 2, 4, 6, 8 o 10 nucleótidos de la horquilla 1 del ARNg. En algunas modalidades, el tercer conector sustituye 1, 2, 3, 4 o 5 pares de bases de la horquilla 1 del ARNg. En algunas modalidades, el tercer conector sustituye un par de bases de la de horquilla 1 del ARNg. En algunas modalidades, el tercer conector sustituye 2 pares de bases de la horquilla 1 del ARNg. En algunas modalidades, el tercer conector sustituye 3 pares de bases de la horquilla 1 del ARNg. En algunas modalidades, el tercer conector sustituye 4 pares de bases de la horquilla 1 del ARNg. En algunas modalidades, el tercer conector sustituye 5 pares de bases de la horquilla 1 del ARNg.

[00699] En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla 1. En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla 1.

[00700] En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla 1. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye 2 nucleótidos del bucle de la horquilla 1. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye 3 nucleótidos del bucle de la horquilla 1. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye 4 nucleótidos del bucle de la horquilla 1.

[00701] En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y al menos 1 nucleótido del tallo de la horquilla. En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 2, 4 o 6 nucleótidos del tallo de la horquilla. En algunas modalidades, el tercer conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2 o 3 pares de bases del tallo de la horquilla.

[00702] En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la de horquilla. En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo de la horquilla.

[00703] En algunas modalidades, una región de horquilla 2 del ARNsg no contiene ningún conector interno.

[00704] En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de un bucle de la región nexo del ARNsg.

[00705] En algunas modalidades, el ARNsg comprende una porción conservada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 200. En algunas modalidades, 2, 3 o 4 de los nucleótidos 33 a 36 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 200. En algunas modalidades, los nucleótidos 32 a 37 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 200. En algunas modalidades, los nucleótidos 31 a 38 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 200. En algunas modalidades, los nucleótidos 30 a 39 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 200. En algunas modalidades, los nucleótidos 29 a 40 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 200. En algunas modalidades, los nucleótidos 55 a 56 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 200. En algunas modalidades, 2, 3 o 4 nucleótidos 73 a 76 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 200. En algunas modalidades, los nucleótidos 72 a 77 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 200. En algunas modalidades, los nucleótidos 71 a 78 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 200. En algunas modalidades, los nucleótidos 70 a 79 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 200. En algunas modalidades, se eliminan los nucleótidos 97 a 100 con respecto a la SEQ ID NO: 200.

[00706] En algunas modalidades, el ARNsg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 201. En algunas modalidades, 2, 3 o 4 de los nucleótidos 33 a 36 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201. En algunas modalidades, los nucleótidos 32 a 37 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201. En algunas modalidades, los nucleótidos 31 a 38 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201. En algunas modalidades, los nucleótidos 30 a 39 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201. En algunas modalidades, los nucleótidos 29 a 40 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201. En algunas modalidades, los nucleótidos 55 a 56 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201. En algunas modalidades, 2, 3 o 4 nucleótidos 50 a 53 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201. En algunas modalidades, los nucleótidos 49 a 54 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201. En algunas modalidades, se eliminan los nucleótidos 77 a 80 con respecto a la SEQ ID NO: 201.

b. **ARN guía adicionales**

[00707] En algunas modalidades, el ARNsg no proviene de Cas9 de *S. pyogenes* (no-spyCas9).

[00708] En algunas modalidades, el ARN guía es un ARN guía de Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SauCas9). En la figura 10B se muestra un ejemplo de ARNsg de SauCas9. En algunos casos, el ARN guía es un ARN guía de SauCas modificado.

[00709] En algunas modalidades, un ARNsg comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región de horquilla 1 y una región de horquilla 2, y también comprende al menos uno de:

1) un primer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos, opcionalmente, al menos 4 nucleótidos, de una región del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición del ARNsg;
2) un segundo conector interno que sustituye 1 o 2 nucleótidos de la horquilla 1 del ARNsg; o
3) un tercer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos, opcionalmente, al menos 4 nucleótidos, de la horquilla 2 del ARNsg.

[00710] En algunas modalidades, el ARNsg comprende el primer conector interno y el segundo conector interno. En algunas modalidades, el ARNsg comprende el primer conector interno y el tercer conector interno. En algunas modalidades, el ARNsg comprende el segundo conector interno y el tercer conector interno. En algunas modalidades, el ARNsg comprende el primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[00711] En algunas modalidades, el primer conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 30 átomos, opcionalmente, de 15 a 21 átomos. En algunas modalidades, el primer conector interno está en una horquilla entre una primera porción del ARNsg y una segunda porción del ARNsg, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región del tallo superior. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la región del tallo superior. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la región de tallo superior. En algunas modalidades, el

primer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la región de tallo superior.

[00712] En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle de la región del tallo superior y al menos 2, 4, 6 u 8 nucleótidos del tallo de la región del tallo superior. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle de región de tallo superior y 1, 2, 3 o 4 pares de bases del tallo de la región de tallo superior. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la región de tallo superior.

[00713] En algunas modalidades, el segundo conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 18 átomos. En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de la horquilla 1 del ARNsg. En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de una región de tallo de la región nexo del ARNsg.

[00714] En algunas modalidades, el tercer conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 30 átomos, opcionalmente, de 15 a 21 átomos. En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la horquilla 2 del ARNg. En algunas modalidades, el tercer conector sustituye 1, 2, 3, 4 o 5 pares de bases de la horquilla 2 del ARNg. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2 a 6 nucleótidos de la horquilla 2. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 2 a 4 nucleótidos de la horquilla 2.

[00715] En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla 2. En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla 2.

[00716] En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla 2. En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y al menos 1 nucleótido del tallo de la horquilla 2. En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos del tallo de la horquilla 2. En algunas modalidades, el tercer conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2 o 3 pares de bases del tallo de la horquilla 2. En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la horquilla 2. En algunas modalidades, el tercer conector interno está en una horquilla entre una primera

porción del ARNsg y una segunda porción del ARNsg, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00717] En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 202. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 202 que incluye modificaciones que se describen en otra parte de la presente.

[00718] En algunas modalidades, 2, 3 o 4 de nucleótidos 33 a 38 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202. En algunas modalidades, los nucleótidos 34 a 39 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202. En algunas modalidades, los nucleótidos 33 a 40 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202. En algunas modalidades, los nucleótidos 32 a 41 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202. En algunas modalidades, los nucleótidos 31 a 42 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202. En algunas modalidades, los nucleótidos 61 a 62 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202. En algunas modalidades, 2, 3 o 4 de nucleótidos 84 a 87 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202. En algunas modalidades, los nucleótidos 83 a 88 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202. En algunas modalidades, los nucleótidos 82 a 89 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202. En algunas modalidades, los nucleótidos 81 a 90 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202. En algunas modalidades, se eliminan los nucleótidos 97 a 100 con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[00719] En algunas modalidades, el ARNg es un ARN guía de SauCas9 y no incluye el tercer conector interno.

[00720] En algunas modalidades, el ARN guía es un ARN guía de Cas9 de *Corynebacterium diphtheriae* (CdiCas9). En algunos casos, el ARN guía es un ARN guía de CdiCas9 modificado. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 203. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 203 que incluye modificaciones que se describen en otra parte de la presente.

[00721] En algunas modalidades, el ARNg es un ARN guía de Cas9 de *C. diphtheriae* (CdiCas9), un ARN guía de Cas9 de *S. thermophilus* (SthCas9) o un ARN guía de Cas9 de *Acidothermus cellulolyticus* (AceCas9).

[00722] En algunas modalidades, el ARN guía es un ARN guía de Cas9 de *Streptococcus thermophilus* (St1Cas9 o SthCas9). En algunos casos, el ARN guía es un ARN guía de St1Cas9 modificado. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 204 o 205. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 204 o 205 que incluyen modificaciones que se describen en otra parte de la presente.

[00723] En algunas modalidades, un ARNsg comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región horquilla 1 y una región horquilla 2, y comprende un primer conector interno que sustituye al menos 4 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición y un segundo conector interno que sustituye al menos 3 nucleótidos de la horquilla 2.

[00724] En algunas modalidades, el primer conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 15 a 21 átomos. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el primer conector interno está en una horquilla entre una primera porción del ARNsg y una segunda porción de la región de repetición y antirrepetición, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00725] En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[00726] En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la estructura de horquilla de la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle de la estructura de horquilla y al menos 2, 4, 6, 8, 10 o 12 nucleótidos del tallo de la estructura de horquilla de la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye el bucle de la estructura de horquilla y 1, 2, 3, 4, 5 o 6 pares de bases del tallo de la estructura de horquilla de la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la estructura de horquilla de la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que

constituyen el bucle y el tallo de la estructura de horquilla de la región de tallo superior de la región de repetición y antirrepetición (es decir, la porción de la región de repetición y antirrepetición por encima del abultamiento). En algunas modalidades, el segundo conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 30, opcionalmente, de 15 a 21 átomos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos de la región de la horquilla 2 del ARNg. En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye una región de bucle de la horquilla 2. En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye una región de bucle y parte de una región de tallo de la horquilla 2. En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye un bucle, o una parte de este, de la horquilla 2. En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye el bucle y el vástago, o parte de este, de la horquilla 2. En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla 2. En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la horquilla 2. En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye el bucle de la horquilla 2 y al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos del tallo de la horquilla 2. En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2 o 3 pares de bases del tallo de la horquilla 2.

[00727] En algunas modalidades, el ARNsg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 204. En algunas modalidades, los nucleótidos 41 a 44 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 204. En algunas modalidades, los nucleótidos 101 a 103 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 204. En algunas modalidades, se sustituyen 2 a 18 nucleótidos entre los nucleótidos 94 a 111 con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[00728] En algunas modalidades, el ARN guía es un ARN guía de Cas9 de *A.cellulolyticus* (AceCas9). En algunos casos, el ARN guía es un ARN guía de AceCas9 modificado. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 206. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 206 que incluye modificaciones que se describen en otra parte de la presente.

[00729] En algunas modalidades, el ARN guía es un ARN guía de Cas9 de *Campylobacter jejuni* (CjeCas9). En algunos casos, el ARN guía es un ARN guía de CjeCas9 modificado.

[00730] En algunas modalidades, un ARNg que comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición y una región horquilla, y comprende un conector interno que sustituye al menos 4 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el primer conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 30 átomos, opcionalmente, de 15 a 21 átomos. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg. En algunas modalidades, el primer conector interno está en una estructura de horquilla entre una primera porción del ARNsg y una segunda porción de la región de repetición y antirrepetición, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00731] En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 207. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 207 que incluye modificaciones que se describen en otra parte de la presente. En algunas modalidades, los nucleótidos 33 a 36 sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 207. En algunas modalidades, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 pares de bases de los nucleótidos 27 a 32 y 37 a 42 sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 207.

[00732] En algunas modalidades, el ARN guía de Cpf1 es un ARN guía de Cas9 de *Francisella novicida* (FnoCas9). En algunos casos, el ARN guía es un ARN guía de FnoCas9guide modificado.

[00733] En algunas modalidades, un ARNg comprende una región de repetición y antirrepetición, y un conector interno que sustituye al menos 4 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 30 átomos, opcionalmente, de 15 a 21 átomos. En algunas modalidades, el conector interno sustituye 3, 4, 5 o 6 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[00734] En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 208. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 208 que incluye modificaciones que se describen en otra parte de la presente. En algunas modalidades, 2, 3 o 4 de nucleótidos 40 a 43 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 208. En algunas

modalidades, en donde los nucleótidos 39 a 44 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 208.

**ARN guía Cpf1 de tipo VI**

[00735] En algunas modalidades, el ARNg es un ARN guía de Cpf1. En algunas modalidades, el ARN guía es un ARN guía de AsCpf1/Cas12a. En la figura 10C se muestra un ejemplo de ARNsg de AsCpf1/Cas12a. En algunos casos, el ARN guía es un ARN guía de AsCpf1/Cas12a modificado. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 209. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 209 que incluye modificaciones que se describen en otra parte de la presente. En algunas modalidades, el ARNg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 209 y los nucleótidos 11 a 14, 12 a 15 u opcionalmente, 12 a 14, sustituyen el conector interno relativo de la SEQ ID NO: 209.

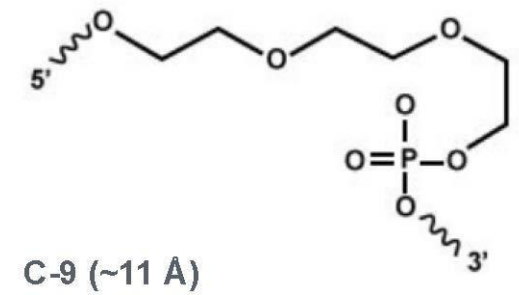
[00736] En algunas modalidades, el ARN guía es un ARN guía de Cas13d de *Eubacterium siraeum* (Es) (EsCas13d). En la figura 10D se muestra un ejemplo de ARNsg de EsCas13d. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 210. En algunas modalidades, el ARN guía comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 210 que incluye modificaciones que se describen en otra parte de la presente. En algunas modalidades, el ARNg comprende una secuencia de SEQ ID NO: 210 y los nucleótidos 9 a 16, u opcionalmente 10 a 15, o al menos 2 nucleótidos de estos, y sustituye el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 210.

[00737] En la Figura 10E se muestra un ejemplo de ARNsg de Nme y a continuación se proporcionan varias modalidades.

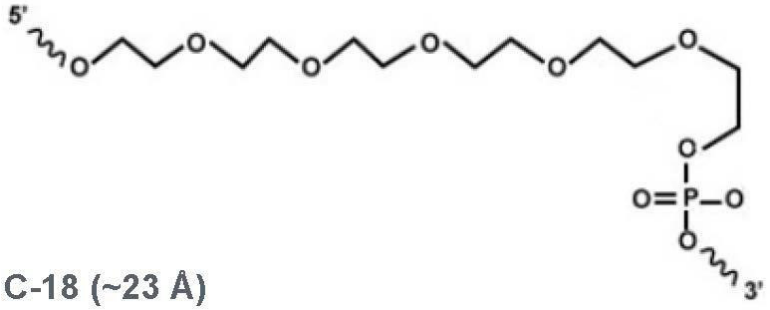
[00738] En las Tablas 2A-2B se proporcionan varios ejemplos de ARNsg que comprenden al menos un conector interno. Se indican las modificaciones de nucleótidos en las Tablas 2A a 2B a continuación: m: 2’-OMe; *: enlace PS. Así, por ejemplo, mA representa 2'-O-metil adenosina.

[00739] Cuando se proporcionan secuencias de nucleótidos no modificadas, A, C, G y U son independientemente nucleótidos de ARN no modificados o modificados. Cuando se proporcionan secuencias de nucleótidos modificadas, en ciertas modalidades, nucleótidos de ARN no modificados A, C, G y U. Cuando se proporcionan secuencias de nucleótidos modificadas, en determinadas modalidades, A, C, G y U son independientemente nucleótidos de ARN no modificados o modificados.

En las tablas del presente documento, L1 y L2 son opcionalmente C9 y C18, respectivamente, como sigue:




C-9 (~11 Å)




C-18 (~23 Å)

[00740] Las designaciones de ARNsg a veces se proporcionan con uno o más ceros iniciales inmediatamente después de la G. Esto no afecta al significado de la designación. Así, por ejemplo, G000282, G0282, G00282 y G282 se refieren al mismo ARNsg. Del mismo modo, las designaciones de ARNcr y/o ARNtr a veces se proporcionan con uno o más ceros iniciales inmediatamente después de CR o TR, respectivamente, lo que no afecta el significado de la designación. Así, por ejemplo, CR000100, CR00100, CR0100 y CR100 se refieren al mismo ARNcr, y TR000200, TR00200, TR0200 y TR200 se refieren al mismo ARNtr.

[00741] En las Tablas 2A a 2C se proporcionan ejemplos de ARN guía de SpyCas9 que comprenden conectores internos. Tal como se utilizan en la presente, «conector 1» o «L1» hacen referencia a un conector interno con una longitud de puente de alrededor de 15 a 21 átomos. Como se usa en el presente documento, «conector 2» o «L2» se refiere a un conector interno que tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 12 átomos (por ejemplo, aproximadamente 9 átomos); «conector 3» o «L3» se refiere a un conector interno que tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 átomos; «conector 4» o «L4» se refiere a un conector interno que tiene una longitud de puente de aproximadamente 3 átomos; «dS» se refiere a un nucleósido abásico.

**Tabla 2A. Tabla de ejemplos de secuencias de ARNg**

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| G022497 | 1 | ACGCAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(**L1**)UAGCAAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCAC(**L1**)GGGCACCGAGUCGGUGC | 101 | mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(**L1**)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCAC(**L1**)GGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G022498 | 2 | ACGCAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(**L1**)UAGCAAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCA(**L1**)GGCACCGAGUCGGUGC | 102 | mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(**L1**)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCA(**L1**)GGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G022499 | 3 | ACGCAAAUAUCAGUCCAGCGGGUUUUAGAGCU(**L1**)AGCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCAC(**L1**)GGGCACCGAGUCGGUGC | 103 | mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmU(**L1**)mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCAC(**L1**)GGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G022500 | 4 | ACGCAAAUAUCAGUCCAGCGGGUUUUAGAGCU(**L1**)AGCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCA(**L1**)GGCACCGAGUCGGUGC | 104 | mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmU(**L1**)mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCA(**L1**)GGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G022501 | 5 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(**L1**)UAGCAAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCAC(**L1**)GGGCACCGAGUCGGUGC | 105 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(**L1**)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCAC(**L1**)GGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G022502 | 6 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(**L1**)UAGCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCA(**L1**)GGCACCGAGUCGGUGC | 106 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(**L1**)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCA(**L1**)GGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G022503 | 7 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCU(**L1**)AGCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCAC(**L1**)GGGCACCGAGUCGGUGC | 107 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmU(**L1**)mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCAC(**L1**)GGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| G022504 | 8 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCU(**L1**)AGCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCA(**L1**)GGCACCGAGUCGGUGC | 108 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmU(**L1**)mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(**L2**)GUCCGUUAUCA(**L1**)GGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G018631 (ctrl) | 9 | ACGCAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC | 109 | mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G017276 (ctrl) | 10 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC | 110 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G000502 (ctrl) | 11 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU | 111 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU |
| G000534 (ctrl) | 12 | ACGCAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU | 112 | mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU |
| G012401 | 13 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC | 113 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G017278 | 14 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGC | 114 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmA |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACAAGGGCACCGAGUCGGUGC | | mAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |

**Tabla 2B. Secuencias de ejemplos de ARNg adicionales**

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| G018666 | 20 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAG(L2)UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGCU | 120 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmG(L2)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018667 | 21 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(L2)UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGCU | 121 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(L2)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018668 | 22 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUG(L2)AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGCU | 122 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmG(L2)mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018669 | 23 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCU(L2)AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGCU | 123 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmU(L2)mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018670 | 24 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGC(L2)GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGGUCGGGUGCU | 124 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmC(L2)mGmCAAGUUAAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| G018671 | 25 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCG(L2)GCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCG | 125 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmG(L2)mGmCAAGUUAAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | UUAUCAACUUGGCACCGAG UCGGUGCU | | ACUUGGCACCGAGUCGmU*mG*mC* mU |
| G018672 | 26 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAG(L2)CAAGUU AAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGGCACCGAGG UCGUGCU | 126 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmG(L2)mCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCA CCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| G018673 | 27 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGCUAG(L1)UA GCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGGCA CCGAGUCGUGCU | 127 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmCmUmAmG(L1)mUm AmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG mU*mG*mC*mU |
| G018674 | 28 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGCUA(L1)UAG CAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGGCAC CGAGUCGUGCU | 128 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGmU *mG*mC*mU |
| G018675 | 29 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGCUG(L1)AGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAACUUGGCACC GAGUCGGUGCU | 129 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmCmUmG(L1)mAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGGCACCGAGUCGGmU*m G*mC*mU |
| G018676 | 30 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGCU(L1)AGCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGGCACCG AGUCGGUGCU | 130 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmCmU(L1)mAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AACUUGGCACCGAGUCGGmU*mG*m C*mU |
| G018677 | 31 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGCG(L1)GCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGGCACCGA GUCGGUGCU | 131 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmCmG(L1)mGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA CUUGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC* mU |
| G018678 | 32 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGC(L1)GCAAG UUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGGCACCGAG | 132 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmC(L1)mGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | UCGGUGCU | | |
| G018679 | 33 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAG(L1)CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGCU | 133 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmG(L1)mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| G018680 | 34 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGC(L4)GUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGUGCU | 134 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L4)GUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018681 | 35 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGUGCU | 135 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018682 | 36 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGCU | 136 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018683 | 37 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC(L2)UGGCACCGAGUCGGUGCU | 137 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC(L2)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018684 | 38 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC(L2)GGCACCGAGUCGUGCU | 138 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC(L2)GGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018685 | 39 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGUGCU | 139 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| G018686 | 40 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAA(L2)GGCA CCGAGUCGGUGCU | 140 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAA(L2)GGCACCGAGU CGGmU*mG*mC*mU |
| G018687 | 41 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAAC(L1)UGG CACCGAGUCGGUGCU | 141 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAAC(L1)UGGCACCGA GUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018688 | 42 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAAC(L1)GGC ACCGAGUCGGUGCU | 142 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAAC(L1)GGCACCGAG UCGGmU*mG*mC*mU |
| G018689 | 43 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAA(L1)UGGC ACCGAGUCGUGCU | 143 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAG UCGGmU*mG*mC*mU |
| G018690 | 44 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAA(L1)GGCA CCGAGUCGGUGCU | 144 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAA(L1)GGCACCGAGU CGGmU*mG*mC*mU |
| G018691 | 45 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGCUA(L1)UAG CAAGUUAAAAUAAGGC(L2)G UCCGUUAUCAACUUGGCAC CGAGUCGGUGCU | 145 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCC GUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGm U*mG*mC*mU |
| G018692 | 46 | ACACAAAUACCAGUCCAGC GGUUUUAGAGCUA(L1)UAG CAAGUUAAAAUAAGGC(L1)G UCCGUUAUCAACUUGGCAC CGAGUCGGUGCU | 146 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG GUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCC GUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGm U*mG*mC*mU |
| G018693 | 47 | ACACAAAUACCAGUCCAGC | 147 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCG |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | GGUUUUAGAGCUA(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGUGCU | | GUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018694 | 48 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGUGCU | 148 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018695 | 49 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGUGCU | 149 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018696 | 50 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGUGCU | 150 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018697 | 51 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAG(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGUGCU | 151 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmG(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018698 | 52 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAG(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGUGCU | 152 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmG(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018699 | 53 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCU(L1)AGCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGUGCU | 153 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmU(L1)mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018700 | 54 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCU(L1)AGCA | 154 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmU(L1)mAmGmCAA |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | AGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGUGCU | | GUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018701 | 55 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUG(L1)AGCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGUGCU | 155 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmG(L1)mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018702 | 56 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUG(L1)AGCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGUGCU | 156 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmG(L1)mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018703 | 57 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGC(L1)GCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGUGCU | 157 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmC(L1)mGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAA(L2)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018704 | 58 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGC(L1)GCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGUGCU | 158 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmC(L1)mGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018705 | 59 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L2)GGGCACCGAGUCGGUGCU | 159 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L2)GGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018706 | 60 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGUGCU | 160 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018707 | 61 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA | 161 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | GUCCGUUAUCA(L1)GGCGACCGAGUCGUGCU | | GUCCGUUAUCA(L1)GGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018708 | 62 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA(L2)GGCACCGAGUCGGGUGCU | 162 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA(L2)GGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G018804 | 63 | ACACACAAUACUAUCCAGGCGGUUAGAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGAGGAGGCGAGUGC | 163 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmCmGmAmAmAmGmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC |
| G018805 | 64 | ACACACAAUACUAUCCAGGCGGUUAGAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGAGGAGGCGAGUGC | 164 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACmGmAmAmAmGmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC |
| G018806 | 65 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC | 165 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G018807 | 66 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGUGC | 166 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G018808 | 67 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGUGC | 167 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G018809 | 68 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(L1)UAG | 168 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAm |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGUGC | | GmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G018810 | 69 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(L2)UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC | 169 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(L2)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G018811 | 70 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCCACCGAGUCGGUGC | 170 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmAmAmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC |
| G018812 | 71 | ACACAAAAUCAGUCCAGCGGUUAGAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUGCACCGAGUGC | 171 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAmAmAmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC |
| G018813 | 72 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGGUGC | 172 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G018814 | 73 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGUGC | 173 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G018815 | 74 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGCUA(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG | 174 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | UCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGUGC | | UUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G018816 | 75 | ACACAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAGC(L1)GCAAGUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGGUGC | 175 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmC(L1)mGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L1)GUCCGUUAUCAA(L1)UGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| G030924 (gen diana: HEK3) | 77 | GGCCCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGA(dS)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGGUGCU | 177 | mG*mG*mC*CCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGA(dS)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| G030925 (gen diana: HEK3) | 78 | GGCCCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGA(L4)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGGUGCU | 178 | mG*mG*mC*CCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGA(S3)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| G030926 (gen diana: HEK3) | 79 | GGCCCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGA(L3)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGGUGCU | 179 | mG*mG*mC*CCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGA(L3)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| G030927 (gen diana: HEK3) | 80 | GGCCCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGA(L2)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGGUGCU | 180 | mG*mG*mC*CCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGA(L2)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| G030928 (gen diana: HEK3) | 81 | GGCCCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGA(L1)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGGUGCU | 181 | mG*mG*mC*CCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGA(L1)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| G030929 (gen diana: HEK3) | 82 | GGCCCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGAGC(L1)GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGA | 182 | mG*mG*mC*CCAGACUGAGCCACGUGAGUUUUAGAmGmC(L1)mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*m |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | GUCGGGUGCU | | U |
| G025989 (gen diana: HEK3) | 83 | GGCCCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGAGCUA(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGGUGCU | 183 | mG*mG*mC*CCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| G030930 (gen diana: HEK3) | 84 | GGCCCAGACUAGCACGUAGUAGUAGUA(L1)UAGCAAGUAGUAAAGGCUAGUCCGUUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGUGCU | 184 | mG*mG*mC*CCAGACUGAGCACGUGAGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUmCmGmGmU*mG*mC*mU |

## Tabla 2C. Ejemplos de ARN guía de SpyCas9 que comprenden conectores

| SEQ ID NO: | Secuencia de ARNg |
|---|---|
| 211 | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUA(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAACUU(L1)AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU |
| 212 | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUA(L1)UAGCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGUGC |
| 213 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| 214 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCA(L1)GGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| 215 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmU(L1)mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| 216 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmU(L1)mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC(L2)GUCCGUUAUCA(L1)GGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| 217 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmU(L1)mAmGmCAAGUUAAAGGC(L2)GUCCGUUAUCA(L1)GGCCCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| 218 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmU(L1)mAmGmCAAGUUAAAGGC(L2)GUCCGUUAUCA(L1)GGCCCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| 219 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAC(L1)GGGCCCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| 220 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUAAAGGC(L2)GUCCGUUAUCA(L1)GGCCCCGAGUCGG*mU*mG*mC |

| SEQ ID NO: | Secuencia de ARNg |
|---|---|
| 221 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmU(L1)mAmGmCAAGUAAAGGC(L2)GUCCGUUAUCAC(L1)GGGCCCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| 222 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmU(L1)mAmGmCAAGUUAAAGGC(L2)GUCCGUUAUCA(L1)GGCCCGAGUCGG*mU*mG*mC |
| 223 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGA(dS)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| 224 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGA(L4)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| 225 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGA(L3)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| 226 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGA(L2)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| 227 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGA(L1)AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGmU*mG*mC*mU |
| 228 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmC(L1)mGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| 229 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUCGGmU*mG*mC*mU |
| 230 | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmA(L1)mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAC(L1)GGGCACCGAGUmCmGmGmU*mG*mC*mU |

[00742] Se indican las modificaciones de nucleótidos en las Tablas 2A a 2C a continuación: m: 2'-OMe; y *: enlace PS. Como se usa en el presente documento, «N» puede ser cualquier nucleótido natural o no natural. Por ejemplo, en el presente documento se incluye la SEQ ID NO: 230 en la Tabla 2C, donde las N se reemplazan con cualquiera de las secuencias guía descritas en el presente documento. Las modificaciones permanecen como se muestra en SEQ ID NO: 230 a pesar de la sustitución de N por los nucleótidos de una guía. Es decir, aunque los nucleótidos de la guía reemplazan las N, los primeros tres nucleótidos tienen modificaciones 2'-O-Me y existen enlaces fosforotioato entre el primer y segundo nucleótido, el segundo y tercer nucleótido y el tercer y cuarto nucleótido.

**E. Tipos de modificaciones químicas descritas en este documento**

[00743] En el presente documento se describen ARN guía (p. ej., ARNsg, ARNdg y ARNcr) que comprenden modificaciones en diversas posiciones. En algunas modalidades,

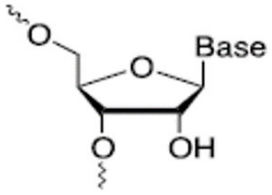
una posición de un ARNg que comprende una modificación se modifica con uno cualquiera o más de los siguientes tipos de modificaciones.

**Modificaciones 2'-O-metilo**

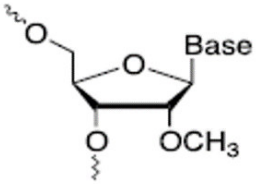
[00744] Se cree que los azúcares modificados controlan el fruncimiento de los anillos de azúcar de los nucleótidos, una propiedad física que influye en la afinidad de unión de los oligonucleótidos por las hebras complementarias, la formación de dúplex y la interacción con las nucleasas. Por tanto, las sustituciones de los anillos de azúcar pueden alterar la conformación y el fruncimiento de estos azúcares. Por ejemplo, las modificaciones 2'-O-metilo (2'-OMe) pueden aumentar la afinidad de unión y la estabilidad de la nucleasa de los oligonucleótidos, aunque, como se muestra en los ejemplos, el efecto de cualquier modificación en una posición determinada en un oligonucleótido debe determinarse empíricamente.

[00745] Los términos «mA», «mC», «mU» o «mG» pueden usarse para indicar un nucleótido que ha sido modificado con 2'-OMe.

[00746] Un ribonucleótido y un ribonucleótido modificado con 2'-O-metilo se pueden representar de la siguiente manera:



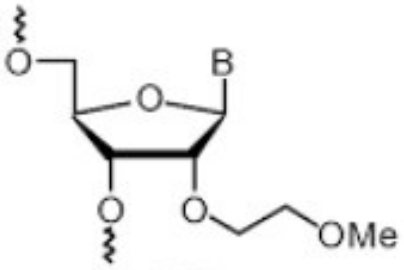

RNA




2′-*O*-Me

**Modificaciones 2'-O-(2-metoxietilo)**

[00747] En algunas modalidades, la modificación puede ser 2'-O-(2-metoxietilo) (2'-O-moe). Un ribonucleótido con modificación 2'-O-mo se puede representar de la siguiente manera:




MOE

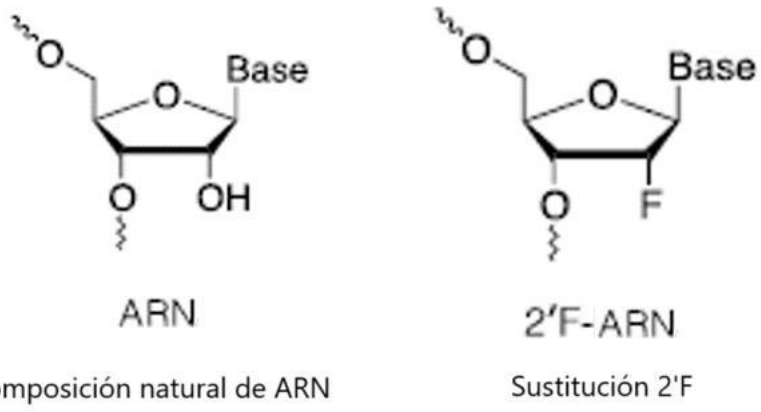
[00748] Es posible utilizar los términos «moeA», «moeC», «moeU» o «moeG» para indicar un nucleótido modificado con 2’-O-moe.

**Modificaciones 2'-fluoro**

[00749] Otra modificación química que se ha demostrado que influye en los anillos de azúcar de nucleótidos es la sustitución de halógeno. Por ejemplo, la sustitución de 2'-fluoro (2'-F) en los anillos de azúcar de nucleótidos puede aumentar la afinidad de unión de oligonucleótidos y la estabilidad de la nucleasa.

[00750] En esta solicitud, los términos «fA», «fC», «fU» o «fG» se pueden usar para indicar un nucleótido que ha sido sustituido con 2'-F.

[00751] Un ribonucleótido sin y con sustitución 2'-F se puede representar de la siguiente manera:



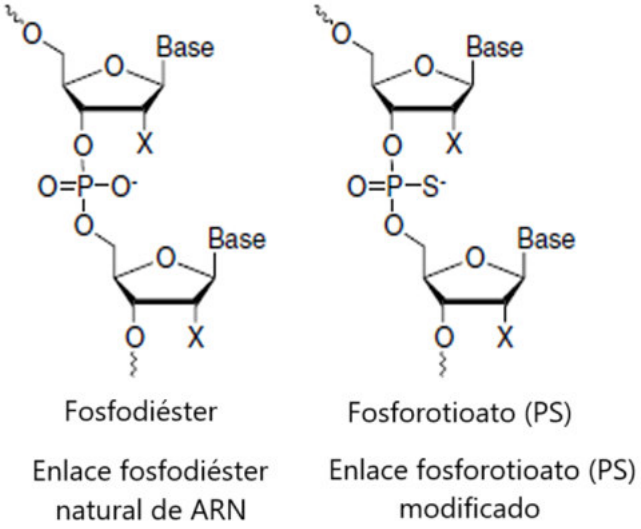

**Modificaciones fosforotioato**

[00752] Un enlace o enlace fosforotioato (PS) se refiere a un enlace donde un azufre se sustituye por un oxígeno fosfato sin puente en un enlace fosfodiéster, por ejemplo, entre nucleótidos. Cuando se usan fosforotioatos para generar oligonucleótidos, los oligonucleótidos modificados también pueden denominarse S-oligos.

[00753] Se puede utilizar un «*» para representar una modificación de PS. En esta solicitud, los términos A*, C*, U* o G* pueden usarse para indicar un nucleótido que está unido al siguiente nucleótido (por ejemplo, 3') con un enlace PS. A lo largo de esta solicitud, las modificaciones de PS se agrupan con el nucleótido cuyo carbono 3' está unido al fosforotioato; por lo tanto, indicar que una modificación de PS está en la posición 1 significa que el fosforotioato está unido al carbono 3' del nucleótido 1 y al carbono 5' del nucleótido 2. Por lo tanto, cuando un sitio YA se indica como «modificado con PS» o similares, por ejemplo, el enlace PS está entre Y y A o entre A y el siguiente nucleótido.

[00754] En esta solicitud, los términos «mA*», «mC*», «mU*» o «mG*» pueden usarse para indicar un nucleótido que ha sido sustituido con 2'-OMe y que está unido al siguiente (por ejemplo, 3') nucleótido con un enlace PS, al que a veces se le puede denominar «enlace PS». De manera similar, los términos «fA*», «fC*», «fU*» o «fG*» pueden usarse para indicar un nucleótido que ha sido sustituido con 2'-F y que está unido al siguiente (p. ej., 3') nucleótido con un enlace PS. Los equivalentes de un enlace o enlace PS están abarcados por las modalidades descritas en el presente documento.

[00755] El siguiente diagrama muestra la sustitución de S- por un oxígeno de fosfato sin puente, generando un enlace PS en lugar de un enlace fosfodiéster:




Fosfodiéster

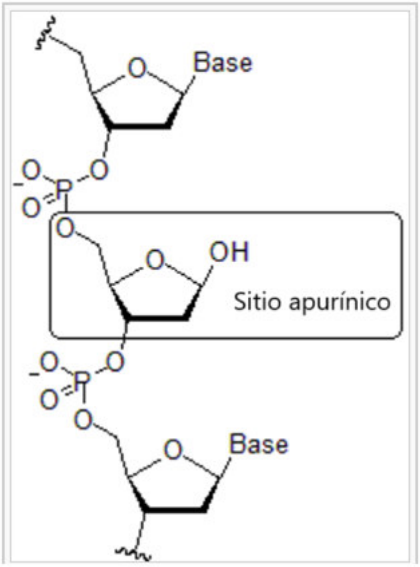
Enlace fosfodiéster natural de ARN

Fosforotioato (PS)

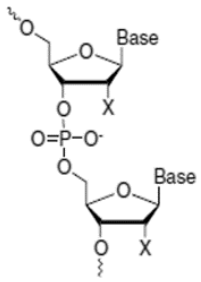
Enlace fosforotioato (PS) modificado

**Modificaciones abásicas invertidas**

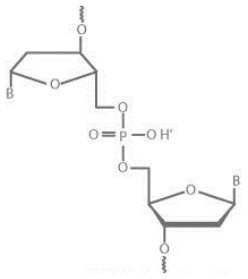
[00756] Los nucleótidos abásicos se refieren a aquellos que carecen de bases nitrogenadas. Como los nucleótidos abásicos no pueden formar un par de bases, no interrumpen la formación de una estructura por parte de los nucleótidos desapareados, por ejemplo, un abultamiento, un bucle. La siguiente figura representa un oligonucleótido con un sitio abásico (en este caso, mostrado como apurínico; un sitio abásico también podría ser un sitio apirimidínico, donde la descripción del sitio abásico típicamente hace referencia al par de bases de Watson-Crick; por ejemplo, un sitio apurínico se refiere a un sitio que carece de una base nitrogenada y normalmente se emparejaría con un sitio pirimidínico) que carece de una base, en donde la base puede estar sustituida por otro resto en la posición 1' del anillo furano (por ejemplo, un grupo hidroxilo, como se muestra a continuación, para formar un sitio ribosa o desoxirribosa, como se muestra a continuación, o un hidrógeno):



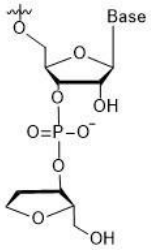

[00757] Las bases invertidas se refieren a aquellas con enlaces que están invertidos con respecto al enlace normal de 5' a 3' (es decir, un enlace de 5' a 5' o un enlace de 3' a 3'). Por ejemplo:




Enlace de oligonucleótido normal



Enlace de oligonucleótido invertido 5'




Enlace invertido 3' con sitio abásico invertido 3' sustituido con H

[00758] Un nucleótido abásico se puede unir con un enlace invertido. Por ejemplo, un nucleótido abásico se puede unir al nucleótido de extremo 5' a través de un enlace 5' a 5', o se puede unir un nucleótido abásico al nucleótido de extremo 3' a través de un enlace 3' a 3'. Un nucleótido abásico invertido en el nucleótido de extremo 5' o 3' también puede denominarse caperuza de extremo abásico invertido. En esta solicitud, los términos «invd» indican un enlace de nucleótido abásico invertido.

**Desoxirribonucleótidos**

[00759] Un desoxirribonucleótido (en el que el azúcar comprende una posición 2'-desoxi) se considera una modificación en el contexto de un ARNg, en el sentido de que el

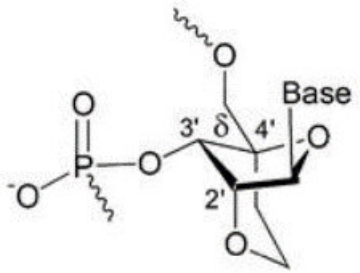
nucleótido se modifica con respecto al ARN estándar mediante la sustitución de un protón por un hidroxilo en la posición 2'. A menos que se indique lo contrario, una modificación de desoxirribonucleótido en una posición que es U en un ARN no modificado también puede comprender la sustitución de la nucleobase U por una T.

**Análogo de ribosa bicíclica**

[00760] Los análogos de ribosa bicíclicos ejemplares incluyen ácido nucleico bloqueado (LNA), ENA, ácido nucleico puenteado (BNA) u otras modificaciones similares a LNA. En algunos casos, un análogo de ribosa bicíclico tiene las posiciones 2' y 4' conectadas a través de un conector. El conector puede ser de fórmula -X-$(CH_2)_n$-donde n es 1 o 2; X es O, NR o S; y R es H o alquilo $C_{1-3}$, por ejemplo, metilo. Los ejemplos de análogos de ribosa bicíclicos incluyen LNA que comprenden una estructura bicíclica 2'-O-$CH_2$-4' (oxi-LNA) (véanse los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226); 2′-NH-$CH_2$-4′ o 2′-N($CH_3$)-$CH_2$-4′ (amino-LNA) (Singh et ál., *J. Org. Chem.*63:10035-10039 (1998) Singh et ál., *J. Org. Chem.*63:6078-6079 (1998)); y 2′-S-$CH_2$-4′ (tio-LNA) (Singh et ál., *J. Org. Chem.*63:6078-6079 (1998); Kumar et ál., *Biorg. Med. Chem. Lett.* 8:2219-2222 (1998)).

**ENA**

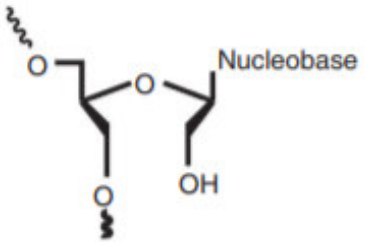
[00761] Una modificación ENA se refiere a un nucleótido que comprende una modificación de 2'-*O*,4'-*C*-etileno. A continuación, se muestra una estructura ejemplar de un nucleótido ENA, en la que las líneas onduladas indican conexiones a los nucleótidos adyacentes (o posiciones terminales, según sea el caso, en el entendido de que, si el nucleótido terminal 3' es un nucleótido ENA, la posición 3' puede comprender un hidroxilo en lugar de un fosfato). Para una discusión más detallada sobre los nucleótidos de ENA, véase, por ejemplo, Koizumi et ál., *Nucleic Acids Res*. 31: 3267–3273 (2003).




**UNA**

[00762] Una UNA o modificación de ácido nucleico desbloqueado se refiere a un nucleótido que comprende una modificación de 2',3'-seco-ARN, en la que los carbonos 2' y 3' no están unidos directamente entre sí. A continuación, se muestra una estructura ejemplar de un nucleótido UNA, en la que las líneas onduladas indican conexiones con los

fosfatos adyacentes o modificaciones que reemplazan a los fosfatos (o posiciones terminales, según sea el caso). Para una discusión más detallada sobre los nucleótidos UNA, véase, por ejemplo, Snead et ál., *Molecular Therapy* 2: e103, doi:10.1038/mtna.2013.36 (2013).




**Modificaciones básicas**

[00763] Una modificación de base es cualquier modificación que altera la estructura de una nucleobase o su enlace a la estructura principal, incluida la isomerización (como en la pseudouridina). En algunas modalidades, una modificación de base incluye inosina. En algunas modalidades, una modificación comprende una modificación de base que reduce la actividad de la ARN endonucleasa, por ejemplo, interfiriendo con el reconocimiento de un sitio de escisión por una RNasa o estabilizando una estructura de ARN (por ejemplo, estructura secundaria) que disminuye la accesibilidad de un sitio de escisión a una RNasa. Las modificaciones de bases ejemplares que pueden estabilizar las estructuras de ARN son la pseudouridina y la 5-metilcitosina. Véase Peacock et ál., *J Org Chem*. 76: 7295–7300 (2011). En algunas modalidades, una modificación de bases puede aumentar o disminuir la temperatura de fusión (Tm) de un ácido nucleico, por ejemplo, aumentando el enlace de hidrógeno en un par de bases de Watson-Crick, formando un par de bases no canónico o creando un par de bases no coincidentes.

[00764] Las modificaciones anteriores y sus equivalentes están incluidas dentro del alcance de las modalidades descritas en el presente documento.

**Modificaciones YA**

[00765] Una modificación en un sitio YA (también denominada modificación YA) puede ser una modificación del enlace internucleósido, una modificación de la base (pirimidina o adenina), por ejemplo, mediante modificación química, sustitución o de otro modo, o una modificación del azúcar (por ejemplo, en la posición 2', tal como 2'-O-alquilo, 2'-F, 2'-moe, 2'-F arabinosa, 2'-H (desoxirribosa) y similares). En algunas modalidades, una «modificación YA» es cualquier modificación que altera la estructura del motivo de dinucleótido para reducir la actividad de endonucleasa de ARN, p. ej., mediante

interferencia con el reconocimiento o la escisión de un sitio YA con una RNasa o mediante estabilización de una estructura de ARN (p. ej., estructura secundaria) que reduce la accesibilidad de un sitio de escisión a una RNasa. *Véase* Peacock et ál., *J Org Chem*. 76: 7295–7300 (2011); Behlke, *Oligonucleotides* 18:305-320 (2008); Ku et ál., *Adv. Drug Delivery Reviews* 104: 16-28 (2016); Ghidini et ál., *Chem. Commun.,* 2013, 49, 9036. Peacock et ál., Belhke, Ku y Ghidini proporcionan modificaciones ejemplares adecuadas como modificaciones YA. Se abarcan las modificaciones conocidas por los expertos en la técnica para reducir degradación endonucleolítica. Los ejemplos de modificaciones de 2'-ribosa que afectan al grupo 2' hidroxilo implicado en la escisión de la RNasa son 2'-H y 2'-O-alquilo, incluido 2'-O-Me. Las modificaciones tales como análogos de ribosa bicíclica, UNA y enlaces internucleosídicos modificados de los residuos en el sitio YA pueden ser modificaciones de YA. Las modificaciones de bases ejemplares que pueden estabilizar las estructuras de ARN son la pseudouridina y la 5-metilcitosina. En algunas modalidades, se modifica al menos un nucleótido del sitio YA. En algunas modalidades, la pirimidina (también llamada «posición de pirimidina») del sitio YA comprende una modificación (que incluye una modificación que altera el enlace internucleósido inmediatamente 3' del azúcar de la pirimidina, una modificación de la base pirimidina y una modificación de la ribosa, por ejemplo, en su posición 2'). En algunas modalidades, la adenina (también conocida como «posición de adenina») del sitio YA que comprende una modificación (lo que incluye una modificación que altera el enlace internucleósido inmediatamente 3' con respecto al azúcar de la pirimidina, una modificación de la base pirimidina y una modificación de la ribosa, p. ej., en su posición 2'). En algunas modalidades, la pirimidina y la adenina del sitio YA comprenden modificaciones. En algunas modalidades, la modificación de YA reduce la actividad de la ARN endonucleasa.

[00766] Las modificaciones anteriores y sus equivalentes están incluidas dentro del alcance de las modalidades descritas en el presente documento.

**Modificaciones de regiones guía o sitios YA**

[00767] En algunas modalidades, un ARNg comprende modificaciones en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o más sitios YA. En algunas modalidades, la pirimidina del sitio YA comprende una modificación (que incluye una modificación que altera el enlace internucleosídico inmediatamente 3' del azúcar de la pirimidina). En algunas modalidades, la adenina del sitio YA comprende una modificación (lo que incluye una modificación que altera el enlace internucleósido inmediatamente 30 con respecto al

azúcar de la adenina). En algunas modalidades, la pirimidina y la adenina del sitio YA comprenden modificaciones, tales como modificaciones de azúcar, base o enlace internucleosídico. Las modificaciones de YA pueden ser cualquiera de los tipos de modificaciones establecidos en este documento. En algunas modalidades, las modificaciones de YA comprenden uno o más de fosforotioato, 2'-OMe o 2'-fluoro. En algunas modalidades, las modificaciones de YA comprenden modificaciones de pirimidina que comprenden uno o más de fosforotioato, 2'-OMe, 2'-H, inosina o 2'-fluoro. En algunas modalidades, la modificación de YA comprende un análogo de ribosa bicíclico (por ejemplo, un LNA, BNA o ENA) dentro de una región dúplex de ARN que contiene uno o más sitios YA. En algunas modalidades, la modificación de YA comprende un análogo de ribosa bicíclico (por ejemplo, un LNA, BNA o ENA) dentro de una región dúplex de ARN que contiene un sitio YA, en donde la modificación de YA es distal al sitio YA.

[00768] La región guía de un ARNg puede modificarse según cualquier modalidad que comprenda una región guía modificada establecida en el presente documento. En algunas modalidades, la región guía comprende 1, 2, 3, 4, 5 o más sitios YA («sitios YA de la región guía») que pueden comprender modificaciones de YA. En algunas modalidades, los sitios YA de la región guía modificada comprenden modificaciones como se describe para los sitios YA anteriormente. Se establecen modalidades adicionales de modificaciones de la región guía, incluidas modificaciones del sitio YA de la región guía, en otros lugares del presente documento. Cualquier modalidad establecida en otra parte de esta divulgación se puede combinar en la medida de lo posible con cualquiera de las modalidades anteriores.

**Modificaciones de nucleótidos terminales**

[00769] En algunas modalidades, se modifican las regiones de extremo 5' o 3' de un ARNg.

**Modificaciones de la región de extremo 3'**

[00770] En algunas modalidades, los 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos terminales (es decir, los últimos) en la región de extremo 3' están modificados. A lo largo de la presente, se puede hacer referencia a esta modificación como una «modificación de extremo 3'». En algunas modalidades, los 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos terminales (es decir, los últimos) en la región de extremo 3' comprenden más de una modificación. En algunas modalidades, al menos uno de los 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos terminales (es decir, los últimos) en la región de extremo 3' están modificados. En algunas modalidades, al menos dos de los 1, 2,

3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos terminales (es decir, los últimos) en la región de extremo 3' están modificados. En algunas modalidades, al menos tres de los 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos terminales (es decir, los últimos) en la región de extremo 3' están modificados. En algunas modalidades, la modificación comprende un enlace PS. En algunas modalidades, la modificación de la región del extremo 3' es una modificación del extremo protector 3'. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende una modificación del extremo protector 3'.

[00771] En algunas modalidades, la modificación de extremo 3' comprende un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-OMe), un nucleótido modificado con 2'-O-(2-metoxietilo) (2'-O-moe), un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado abásico invertido o combinaciones de estos.

[00772] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende además un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-O-Me).

[00773] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende también un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F).

[00774] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende además un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

[00775] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende también un nucleótido modificado abásico invertido.

[00776] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende además una modificación de uno cualquiera o más de los últimos 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende también un nucleótido modificado. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende también dos nucleótidos modificados. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende también tres nucleótidos modificados. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende también cuatro nucleótidos modificados. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende también cinco nucleótidos modificados. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende también seis nucleótidos modificados. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende también siete nucleótidos modificados.

[00777] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende además una modificación de entre 1 y 7 o entre 1 y 5 nucleótidos.

[00778] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende además modificaciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos en el extremo 3' del ARNg.

[00779] En algunas modalidades, la modificación de extremo 3' comprende o comprende también las modificaciones de alrededor de 1 a 3, 1 a 5, 1 a 6 o 1 a 7 nucleótidos en el extremo 3' del ARNg.

[00780] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende además uno cualquiera o más de los siguientes: un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado con 2'-O-Me, un nucleótido modificado con 2'-O-moe, un nucleótido modificado con 2'-F, un nucleótido modificado abásico invertido y una combinación de estos.

[00781] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende además 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 enlaces PS entre nucleótidos.

[00782] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende también al menos un nucleótido modificado con 2'-F, 2'-O-Me, 2'-O-moe o abásico invertido. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende además un enlace PS, en donde el enlace está entre el último y el penúltimo nucleótido. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende además dos enlaces PS entre los últimos tres nucleótidos. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende también cuatro enlaces PS entre los últimos cuatro nucleótidos.

[00783] En algunas modalidades, la modificación de extremo 3' comprende o comprende también enlaces PS entre cualesquiera uno o más de los últimos cuatro nucleótidos. En algunas modalidades, la modificación de extremo 3' comprende o comprende también enlaces PS entre cualesquiera uno o más de los últimos cinco nucleótidos. En algunas modalidades, la modificación de extremo 3' comprende o comprende también enlaces PS entre uno o más de los últimos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos.

[00784] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende además una modificación de uno o más de los últimos 1 a 7 nucleótidos, en donde la modificación es un enlace PS, nucleótido abásico invertido, 2'-OMe, 2'-O-moe, 2'-F, o combinaciones de estos.

[00785] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende además una modificación del último nucleótido con 2'-OMe, 2'-O-moe, 2'-F o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o dos enlaces PS al siguiente nucleótido o el primer nucleótido de la cola 3'.

[00786] En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende o comprende además una modificación del último o penúltimo nucleótido con 2'-OMe, 2'-O-moe, 2'-F, o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o más enlaces PS.

[00787] En algunas modalidades, la modificación de extremo 3' comprende o comprende también una modificación del último, penúltimo o antepenúltimo nucleótido con 2'-OMe, 2'-O-moe, 2'-F o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o más enlaces PS.

[00788] En algunas modalidades, la modificación de extremo 3' comprende o comprende también una modificación del último, penúltimo, antepenúltimo o anterior al antepenúltimo nucleótido con 2'-OMe, 2'-O-moe, 2'-F o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o más enlaces PS.

[00789] En algunas modalidades, la modificación de extremo 3' comprende o comprende también una modificación del último, penúltimo, antepenúltimo, anterior al antepenúltimo o quinto al último nucleótido con 2'-OMe, 2'-O-moe, 2'-F o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o más enlaces PS.

[00790] En determinadas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende modificaciones 2'-O-Me y modificaciones PS. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende el mismo número de modificaciones 2'-O-Me y modificaciones PS. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' comprende una modificación 2'-O-Me más que la modificación PS. En algunas modalidades, la modificación de extremo 3' comprende una modificación 2'-O-Me menos que la modificación PS. En algunas modalidades, la modificación de extremo 3' comprende 4 modificaciones 2'-O-Me. En algunas modalidades, la modificación de extremo 3' comprende 3 modificaciones 2'-O-Me.

[00791] En algunas modalidades, el ARNg que comprende una modificación del extremo 3' comprende o comprende además una cola 3', en donde la cola 3' comprende una modificación de uno cualquiera o más de los nucleótidos presentes en la cola 3'. En algunas modalidades, la cola 3' está completamente modificada. En algunas modalidades, la cola 3' comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1 a 2, 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 1 a 6, 1 a 7, 1 a 8, 1 a 9 o 1 a 10 nucleótidos, opcionalmente donde uno o más de estos nucleótidos están modificados.

**Cola 3’**

[00792] En algunas modalidades, el ARNg comprende un extremo 3' que comprende una cola 3', que sigue y está 3' de la porción conservada de un ARNg. En algunas modalidades, la cola 3' comprende entre 1 y aproximadamente 20 nucleótidos, entre 1 y aproximadamente 15 nucleótidos, entre 1 y aproximadamente 10 nucleótidos, entre 1 y aproximadamente 5 nucleótidos, entre 1 y aproximadamente 4 nucleótidos, entre 1 y aproximadamente 3 nucleótidos, y entre 1 y aproximadamente 2 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' comprende aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' comprende 1 nucleótido. En algunas modalidades, la cola 3' comprende 2 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' comprende 3 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' comprende 4 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' comprende aproximadamente 1-2, 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 1 a 7, 1 a 10, al menos 1 a 5, al menos 1 a 3, al menos 1 a 4, al menos 1 a 5, al menos 1 a 5, al menos 1 a 7 o al menos 1 a 10 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola termina con un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado. En algunas modalidades, la cola 3' tiene una longitud de 1 nucleótido y es un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado. En algunas modalidades, el nucleótido 3' del ARNg es un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado.

[00793] En algunas modalidades, la cola 3' comprende de 1 a 20 nucleótidos y sigue el extremo 3' de la porción conservada de un ARNg.

[00794] En algunas modalidades, la cola 3' comprende o comprende también una o más modificaciones de extremo protectora, un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado con 2'-OMe, un nucleótido modificado con 2'-O-moe, un nucleótido modificado con 2'-F, un nucleótido modificado abásico invertido y una combinación de estas.

[00795] En algunas modalidades, la cola 3' comprende o comprende además uno o más enlaces fosforotioato (PS) entre nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' comprende o comprende además uno o más nucleótidos modificados con 2'-OMe. En algunas modalidades, la cola 3' comprende o comprende también uno o más nucleótidos modificados con 2'-O-moe. En algunas modalidades, la cola 3' comprende o comprende también uno o más nucleótidos modificados con 2'-F. En algunas modalidades, la cola 3' comprende o comprende también uno o más nucleótidos modificados abásicos invertidos.

En algunas modalidades, la cola 3' comprende o comprende además una o más modificaciones del extremo protector. En algunas modalidades, la cola 3' comprende o comprende también una combinación de uno o más enlaces fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado con 2'-OMe, un nucleótido modificado con 2'-O-moe, un nucleótido modificado con 2'-F y un nucleótido modificado abásico invertido.

[00796] En algunas modalidades, el ARNg no comprende una cola 3'.

**Modificaciones de la región de extremo 5'**

[00797] En algunas modalidades, la región de extremo 5' está modificada, por ejemplo, se modifican los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos del ARNg. A lo largo de la presente, se puede hacer referencia a esta modificación como una «modificación de extremo 5'». En algunas modalidades, los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos de la región del extremo 5' comprenden más de una modificación. En algunas modalidades, al menos uno de los 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos terminales (es decir, el primero) en el extremo 5' está modificado. En algunas modalidades, al menos dos de los 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos terminales en la región de extremo 5' están modificados. En algunas modalidades, al menos tres de los 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos terminales en la región de extremo 5’ están modificados. En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' es una modificación de extremo protectora 5'.

[00798] En algunas modalidades, se modifican las regiones terminales 5' y 3' (por ejemplo, extremos) del ARNg. En algunas modalidades, solo se modifica la región terminal 5' del ARNg. En algunas modalidades, solo se modifica la región terminal 3' (más o menos una cola 3') de la porción conservada de un ARNg.

[00799] En algunas modalidades, el ARNg comprende modificaciones en 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de los primeros 7 nucleótidos en una región terminal 5' del ARNg. En algunas modalidades, el ARNg comprende modificaciones en 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de los 7 nucleótidos terminales en una región de extremo 3'. En algunas modalidades, se modifican 2, 3 o 4 de los primeros 4 nucleótidos en la región del extremo 5', o 2, 3 o 4 de los 4 nucleótidos terminales en la región del extremo 3'. En algunas modalidades, 2, 3 o 4 de los primeros 4 nucleótidos en la región del extremo 5' están unidos con enlaces fosforotioato (PS).

[00800] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' o del extremo 3' comprende una modificación con 2'-O-metilo (2'-O-Me) o 2'-O-(2-metoxietil) (2'-O-moe). En algunas modalidades, la modificación comprende una modificación con 2'-fluoro (2'-F) de

un nucleótido. En algunas modalidades, la modificación comprende un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos. En algunas modalidades, la modificación comprende un nucleótido abásico invertido. En algunas modalidades, la modificación comprende una modificación de extremo protectora. En algunas modalidades, la modificación comprende más de una modificación seleccionada entre modificación del extremo protector, 2'-O-Me, 2'-O-moe, 2'-fluoro (2'-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos y un nucleótido abásico invertido. En algunas modalidades, se abarca una modificación equivalente.

[00801] En algunas modalidades, el ARNg comprende uno o más enlaces fosforotioato (PS) entre los primeros uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete nucleótidos en el extremo 5'. En algunas modalidades, el ARNg comprende uno o más enlaces PS entre los últimos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete nucleótidos en el extremo 3'. En algunas modalidades, el ARNg comprende uno o más enlaces PS entre los últimos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete nucleótidos en el extremo 3' y los primeros uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete nucleótidos del extremo 5' del extremo 5'. En algunas modalidades, además de los enlaces PS, los nucleótidos terminales 5' y 3' pueden comprender nucleótidos modificados con 2'-O-Me, 2'-O-moe o 2'-F.

[00802] En algunas modalidades, el ARNg comprende una modificación del extremo 5', por ejemplo, en donde se modifica el primer nucleótido de la región guía. En algunas modalidades, el ARNg comprende una modificación del extremo 5', en donde el primer nucleótido de la región guía comprende una modificación del extremo protector 5'.

[00803] En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-OMe), un nucleótido modificado con 2'-O-(2-metoxietilo) (2'-O-moe), un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado abásico invertido o combinaciones de estos.

[00804] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-O-Me).

[00805] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F).

[00806] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

[00807] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también un nucleótido modificado abásico invertido.

[00808] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también una modificación de cualesquiera uno o más de los nucleótidos 1 a 7 de la región guía de un ARNg. En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también un nucleótido modificado. En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también dos nucleótidos modificados. En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también tres nucleótidos modificados. En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también cuatro nucleótidos modificados. En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también cinco nucleótidos modificados. En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también seis nucleótidos modificados. En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también siete nucleótidos modificados.

[00809] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también una modificación de entre 1 y 7, entre 1 y 5, entre 1 y 4, entre 1 y 3, o entre 1 y 2 nucleótidos.

[00810] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también las modificaciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótidos del extremo 5'. En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también las modificaciones de alrededor de 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 1 a 6 o 1 a 7 nucleótidos del extremo 5'.

[00811] En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también las modificaciones en el primer nucleótido en el extremo 5' del ARNg. En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también las modificaciones en el primer y el segundo nucleótidos del extremo 5' del ARNg. En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también las modificaciones en el primer, segundo y tercer nucleótidos del extremo 5' del ARNg. En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también las modificaciones en el primer, segundo, tercer y cuarto nucleótidos del extremo 5' del ARNg. En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también las modificaciones en el primer, segundo, tercer, cuarto y quinto nucleótidos del extremo 5' del ARNg. En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también las modificaciones en el primer, segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto nucleótidos del extremo 5' del ARNg. En algunas modalidades, la modificación de extremo

5' comprende o comprende también las modificaciones en el primer, segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto y séptimo nucleótidos del extremo 5' del ARNg.

[00812] En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, o un nucleótido modificado con 2'-O-Me, o un nucleótido modificado con 2'-O-moe, o un nucleótido modificado con 2'-F, o un nucleótido modificado abásico invertido o combinaciones de estos.

[00813] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 enlaces PS entre nucleótidos. En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también alrededor de 1 a 2, 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 1 a 6 o 1 a 7 enlaces PS entre nucleótidos.

[00814] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también al menos un enlace PS, en donde si hay un enlace PS, el enlace está entre los nucleótidos 1 y 2 de la región guía.

[00815] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende también al menos dos enlaces PS, y los enlaces están entre los nucleótidos 1 y 2, y 2 y 3 de la región guía.

[00816] En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también enlaces PS entre cualesquiera uno o más de los nucleótidos 1 y 2, 2 y 3, y 3 y 4 de la región guía.

[00817] En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también enlaces PS entre cualesquiera uno o más de los nucleótidos 1 y 2, 2 y 3, 3 y 4, y 4 y 5 de la región guía.

[00818] En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también enlaces PS entre cualesquiera uno o más de los nucleótidos 1 y 2, 2 y 3, 3 y 4, 4 y 5, y 5 y 6 de la región guía.

[00819] En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también enlaces PS entre cualesquiera uno o más de los nucleótidos 1 y 2, 2 y 3, 3 y 4, 4 y 5, 5 y 6, y 7 y 8 de la región guía.

[00820] En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también una modificación de uno o más de los nucleótidos 1 a 7 de la región guía, en donde la modificación es un enlace PS, un nucleótido abásico invertido, 2'-OMe, 2'-O-moe, 2'-F o combinaciones de estas.

[00821] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende además una modificación del primer nucleótido de la región guía con 2'-O-Me, 2'-O-moe, 2'-F o combinaciones de estas, y un enlace PS opcional al siguiente nucleótido.

[00822] En algunas modalidades, la modificación del extremo 5' comprende o comprende además una modificación del primer o segundo nucleótido de la región guía con 2'-O-Me, 2'-O-moe, 2'-F o combinaciones de estas, y opcionalmente uno o más enlaces PS entre el primer y segundo nucleótido o entre el segundo y tercer nucleótido.

[00823] En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también una modificación al primer, segundo o tercer nucleótido de la región variable con 2'-O-Me, 2'-O-moe, 2'-F o combinaciones de estas, y opcionalmente uno o más enlaces PS entre el primer y el segundo nucleótido, entre el segundo y el tercer nucleótido, o entre el tercer y el cuarto nucleótido.

[00824] En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también una modificación al primer, segundo, tercer o cuarto nucleótido de la región variable con 2'-O-Me, 2'-O-moe, 2'-F o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o más enlaces PS entre el primer y el segundo nucleótido, entre el segundo y el tercer nucleótido, entre el tercer y el cuarto nucleótido, o entre el cuarto y el quinto nucleótido.

[00825] En algunas modalidades, la modificación de extremo 5' comprende o comprende también una modificación al primer, segundo, tercer, cuarto o quinto nucleótido de la región variable con 2'-O-Me, 2'-O-moe, 2'-F o combinaciones de estos, y opcionalmente uno o más enlaces PS entre el primer y el segundo nucleótido, entre el segundo y el tercer nucleótido, entre el tercer y el cuarto nucleótido, entre el cuarto y el quinto nucleótido, o entre el quinto y el sexto nucleótido.

**Modificaciones de la región de repetición y antirrepetición**

[00826] En algunas modalidades, se proporciona un ARNg que comprende una modificación de la región de repetición y antirrepetición, en donde la modificación de la región de repetición y antirrepetición comprende una modificación de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o los 12 nucleótidos en la región de repetición y antirrepetición.

[00827] En algunas modalidades, se proporciona un ARNg que comprende una modificación de la región de repetición y antirrepetición, en donde la modificación de la región de repetición y antirrepetición comprende una modificación de alrededor de 1 a 2, 1 a 3, 1 a 4, 1 a 5, 1 a 6, 1 a 7, 1 a 8, 1 a 9, 1 a 10 o 1 a 12 nucleótidos en la región de repetición y antirrepetición.

[00828] En algunas modalidades, se proporciona un ARNg que comprende una modificación de la región de repetición y antirrepetición, en donde la modificación del tallo superior comprende un nucleótido modificado con 2'-OMe. En algunas modalidades, se proporciona un ARNg que comprende una modificación de la región de repetición y antirrepetición, en donde la modificación del tallo superior comprende un nucleótido modificado con 2'-O-moe. En algunas modalidades, se proporciona un ARNg que comprende una modificación de la región de repetición y antirrepetición, en donde la modificación del tallo superior comprende un nucleótido modificado con 2'-F.

[00829] En algunas modalidades, se proporciona un ARNg que comprende una modificación de la región de repetición y antirrepetición, en donde la modificación de la región de repetición y antirrepetición comprende un nucleótido modificado con 2'-OMe, un nucleótido modificado con 2'-O-moe, un nucleótido modificado con 2'-F o combinaciones de estos.

[00830] En algunas modalidades, el ARNg comprende una modificación del extremo 5' y una modificación de la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el ARNg comprende una modificación del extremo 3' y una modificación de la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, el ARNg comprende una modificación del extremo 5', una modificación del extremo 3' y una modificación del tallo superior.

***Modificaciones de horquilla***

[00831] En algunas modalidades, el ARNg comprende una modificación en la región de horquilla. En algunas modalidades, la modificación de la región de horquilla comprende al menos un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-OMe), un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F) o combinaciones de estos.

[00832] En algunas modalidades, la modificación de la región de horquilla está en la región de horquilla 1. En algunas modalidades, la modificación de la región de horquilla está en la región de horquilla 2. En algunas modalidades, las modificaciones están dentro de las regiones de horquilla 1 y horquilla 2, opcionalmente, en donde la «n» entre las horquillas 1 y 2 también se modifica.

[00833] En algunas modalidades, la modificación de horquilla comprende o comprende también un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-OMe).

[00834] En algunas modalidades, la modificación de horquilla comprende o comprende también un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F).

[00835] En algunas modalidades, la modificación de la región de horquilla comprende al menos un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con 2'H (ADN), un nucleótido modificado con PS, una modificación YA, un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-O-Me), un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F) o combinaciones de estos.

[00836] En algunas modalidades, el ARNg comprende una modificación del extremo 3' y una modificación en la región de horquilla.

[00837] En algunas modalidades, el ARNg comprende una modificación del extremo 5' y una modificación en la región de horquilla.

[00838] En algunas modalidades, el ARNg comprende una modificación del tallo superior y una modificación en la región de horquilla.

[00839] En algunas modalidades, el ARNg comprende una modificación del extremo 3', una modificación en la región de horquilla, una modificación del tallos uperior y una modificación del extremo 5'.

## F. EJEMPLOS DE ARN GUÍA MODIFICADOS

[00840] Se incluyen los ARNg modificados que comprenden combinaciones de modificaciones del extremo 5', modificaciones del extremo 3', modificaciones del tallo superior, modificaciones en horquilla y modificaciones del extremo 3', como se describió anteriormente. A continuación, se describen ejemplos de ARNg modificados.

**ARNsg; Dominios/regiones de estos**

[00841] En algunas modalidades, un ARNg proporcionado en el presente documento es un ARNsg. Briner AE et ál., *Molecular Cell* 56:333–339 (2014) describe dominios funcionales de ARNsg, denominados en el presente documento «dominios», incluido el dominio «espaciador» responsable de la orientación, el «tallo inferior», el «abultamiento», el tallo «superior» (que puede incluir un tetrabucle), el «nexo» y los dominios «horquilla 1» y «horquilla 2». Véase Briner et ál. en la página 334, Figura 1A. Como se describe en detalle en otra parte del presente documento, uno o más dominios (por ejemplo, la horquilla 1 o el tallo superior) pueden acortarse en un ARNsg descrito en el presente documento.

[00842] En algunas modalidades, el ARNsg comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región nexo, una región de horquilla 1 y una región de horquilla 2. La región de repetición y antirrepetición comprende una región de tallo superior y una región de tallo inferior. La Tabla 3B proporciona un esquema de los

dominios de un ARNsg tal como se utiliza en el presente documento. En la Tabla 3B, la «n» entre regiones representa un número variable de nucleótidos, por ejemplo, de 0 a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más. En algunas modalidades, n es igual a 0. En algunas modalidades, n es igual a 1.

[00843] En algunas modalidades, el ARNsg comprende al menos uno de: un primer conector interno que sustituye al menos a 4 nucleótidos de la región del tallo superior; un segundo conector interno que sustituye a 2 nucleótidos de la región del nexo; y un tercer conector interno que sustituye al menos a 2 nucleótidos de la horquilla 1.

[00844] En algunas modalidades, el ARNsg comprende el primer conector interno y el segundo conector interno. En algunas modalidades, el ARNsg comprende el primer conector interno y el tercer conector interno. En algunas modalidades, el ARNsg comprende el segundo conector interno y el segundo conector interno. En algunas modalidades, el ARNsg comprende el primer conector interno, el segundo conector interno y el segundo conector interno.

[00845] En algunas modalidades, el primer conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 30 átomos, opcionalmente, de 15 a 21 átomos. En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[00846] En algunas modalidades, el segundo conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 15 átomos. En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye una región de horquilla de la región nexo del ARNsg. En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de una región de tallo de la región nexo del ARNsg.

[00847] En algunas modalidades, el tercer conector interno tiene una longitud de puente de alrededor de 9 a 30 átomos, opcionalmente, de 15 a 21 átomos. En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la horquilla 1 del ARNg.

[00848] En algunas modalidades, el primer conector interno está en una horquilla entre una primera porción y una segunda porción, y la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00849] En algunas modalidades, el tercer conector interno está en una horquilla entre una primera porción del ARNsg y una segunda porción del ARNsg, y la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00850] En algunas modalidades, una región de horquilla 2 del ARNsg no contiene ningún conector interno. En algunas modalidades, la región de horquilla 2 está en un ARNg de SpyCas9.

**Región de extremo 5'**

[00851] En algunas modalidades, el ARNsg comprende nucleótidos en el extremo 5' como se muestra en las Tablas 3A-B. En algunas modalidades, el extremo 5' del ARNsg comprende una región espaciadora o guía que funciona para dirigir una proteína Cas, por ejemplo, una proteína Cas9, a una secuencia de nucleótidos objetivo. En algunas modalidades, el extremo 5' no comprende una región guía. En algunas modalidades, el extremo 5' comprende un espaciador y nucleótidos adicionales que no funcionan para dirigir una proteína Cas a una región de nucleótidos objetivo.

**Tallo inferior**

[00852] En algunas modalidades, el ARNsg comprende una región del tallo inferior (LS) que, cuando se ve linealmente, está separada por un abultamiento y regiones del tallo superior. Ver las Tablas 3A-B.

[00853] En algunas modalidades, las regiones del tallo inferior comprenden de 1 a 12 nucleótidos, por ejemplo, en una modalidad, las regiones del tallo inferior comprenden LS1-LS12. En algunas modalidades, la región del tallo inferior comprende menos nucleótidos que los que se muestran en la Tabla 3. En algunas modalidades, la región del tallo inferior comprende más nucleótidos que los que se muestran en las Tablas 3A-B. Cuando la región de tallo inferior comprende menos o más nucleótidos de los que se muestran en el esquema de la Tabla 3, se debe mantener el patrón de modificación, como resultará evidente para el experto en la técnica.

[00854] En algunas modalidades, la región de tallo inferior tiene nucleótidos que son complementarios en la secuencia de ácido nucleico cuando se leen en direcciones opuestas. En algunas modalidades, la complementariedad en la secuencia de ácido nucleico de tallo inferior conduce a una estructura secundaria de un tallo en el ARNsg (por ejemplo, las regiones pueden pares de bases entre sí). En algunas modalidades, las regiones de tallo inferior pueden no ser perfectamente complementarias entre sí cuando se leen en direcciones opuestas.

**Abultamiento**

[00855] En algunas modalidades, el ARNsg comprende una región de abultamiento que comprende seis nucleótidos, B1-B6. Cuando se ve linealmente, la región del

abultamiento se separa en dos regiones. Véase la Tabla 3. En algunas modalidades, la región del abultamiento comprende seis nucleótidos, en donde los dos primeros nucleótidos van seguidos de una región del tallo superior, seguida de los últimos cuatro nucleótidos del abultamiento. En algunas modalidades, la región de abultamiento comprende menos nucleótidos que los que se muestran en las Tablas 3A-B. En algunas modalidades, la región abultada comprende más nucleótidos que los que se muestran en las Tablas 3A-B. Cuando la región con abultamiento comprende menos o más nucleótidos que los que se muestran en el esquema de las Tablas 3A-B, como será evidente para los expertos en la técnica, se debería mantener el patrón de modificación.

[00856] En algunas modalidades, la presencia de un abultamiento da como resultado una torsión direccional entre los módulos de tallo superior e inferior en un ARNsg.

**Tallo superior**

[00857] En algunas modalidades, la región del tallo superior es una región del tallo superior acortada, tal como cualquiera de las regiones del tallo superior acortadas descritas en otra parte del presente documento.

[00858] En otras modalidades, el ARNsg comprende una región del tallo superior que comprende 12 nucleótidos. En algunas modalidades, la región del tallo superior comprende una secuencia de bucle. En algunos casos, el bucle es un tetrabucle (bucle que consiste en cuatro nucleótidos). En algunas modalidades, la región de tallo superior comprende más nucleótidos que los que se muestran en la Tabla 3B.

[00859] Cuando la región de tallo superior comprende menos o más nucleótidos que los que se muestran en el esquema de las Tablas 3A-B, como será evidente para los expertos en la técnica, se debería mantener el patrón de modificación.

[00860] En algunas modalidades, la región de tallo superior tiene nucleótidos que son complementarios en la secuencia de ácido nucleico cuando se lee en direcciones opuestas. En algunas modalidades, la complementariedad en la secuencia de ácido nucleico del tallo superior lleva a una estructura secundaria de un tallo en el ARNsg (p. ej., puede haber emparejamiento de bases entre las regiones). En algunas modalidades, las regiones de tallo superior pueden no ser perfectamente complementarias entre sí cuando se leen en direcciones opuestas.

[00861] En algunas modalidades, la región del tallo superior comprende menos nucleótidos que los que se muestran en la Figura 10A y, a veces, no está presente. En determinadas modalidades, los nucleótidos del abultamiento B2 y B3 (correspondientes a

los nucleótidos 8 y 21 de SEQ ID: 400; véase la Tabla 3A) se unen directamente (es decir, de manera que no hay nucleótidos intermedios presentes) mediante un conector interno. En ciertas modalidades, B2 y B3 están unidos directamente por uno o más, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 nucleósidos abásicos. En ciertas modalidades, B2 y B3 están unidos por un conector interno o uno o más, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4, nucleósidos abásicos en los que los nucleótidos adicionales presentes no forman una porción dúplex por encima del abultamiento. En determinadas modalidades, un conector interno une B2 y B3 o uno o más, p. ej., 1, 2, 3 o 4 nucleósidos abásicos, en donde nucleótidos adicionales presentes no forman una porción dúplex mayor de 3 nucleótidos por encima del abultamiento.

**Nexo**

[00862] En algunas modalidades, el ARNsg comprende una región de nexo que está ubicada entre la región del tallo inferior y la región de horquilla 1. En algunas modalidades, el nexo comprende 18 nucleótidos. En algunas modalidades, la región del nexo comprende los nucleótidos N1 a N18 como se muestra en las Tablas 3A-B. En algunas modalidades, la región de nexo comprende una sustitución (por ejemplo, en la posición N18) o carece de un nucleótido, tal como cualquiera de las regiones de nexo con una sustitución o que carece de un nucleótido descritas en detalle en otra parte del presente documento.

[00863] En algunas modalidades, la región nexo comprende menos nucleótidos que los que se muestran en las Tablas 3A-B. En algunas modalidades, la región nexo comprende más nucleótidos que los que se muestran en las Tablas 3A-B. Cuando la región nexo comprende menos o más nucleótidos que los que se muestran en el esquema de las Tablas 3A-B, como será evidente para los expertos en la técnica, se debería mantener el patrón de modificación.

[00864] En algunas modalidades, la región nexo tiene nucleótidos que son complementarios en la secuencia de ácido nucleico cuando se lee en direcciones opuestas. En algunas modalidades, la complementariedad en la secuencia de ácido nucleico lleva a una estructura secundaria de un tallo o bucle y tallo en el ARNsg (p. ej., determinados nucleótidos en la región nexo pueden tener emparejamiento de bases entre sí). En algunas modalidades, las regiones nexo pueden no ser perfectamente complementarias entre sí cuando se leen en direcciones opuestas.

**Horquilla**

[00865] En algunas modalidades, el ARNsg comprende una o más estructuras en horquilla dentro de la región en horquilla. La región de horquilla está corriente abajo (es

decir, en dirección 3') con respecto a la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, la región de horquilla está corriente abajo de la región de nexo, cuando está presente. En algunas modalidades, la región de nucleótidos inmediatamente corriente abajo de la región de nexo se denomina «horquilla 1» o «H1». En algunas modalidades, la región de nucleótidos 3' a la horquilla 1 se denomina «horquilla 2» o «H2». En algunas modalidades, la región de horquilla comprende tanto la horquilla 1 como la horquilla 2. En algunas modalidades, el ARNsg comprende la horquilla 1 o la horquilla 2.

[00866] En algunas modalidades, la región de horquilla 1 es una región de horquilla 1 acortada, tal como cualquiera de las regiones de horquilla 1 acortada descritas en otra parte del presente documento.

[00867] En otras modalidades, la región de horquilla 1 comprende 12 nucleótidos inmediatamente corriente abajo de la región de nexo. En algunas modalidades, la región de horquilla 1 comprende los nucleótidos H1-1 a H1-12 como se muestra en la Tabla 3B.

[00868] En algunas modalidades, la región de horquilla 2 comprende 15 nucleótidos corriente abajo de la región de horquilla 1. En algunas modalidades, la región de horquilla 2 comprende los nucleótidos H2-1 a H2-15, tal como se muestra en la Tabla 3B.

[00869] En algunas modalidades, uno o más nucleótidos están presentes entre las regiones de horquilla 1 y de horquilla 2. Uno o más nucleótidos entre la región de horquilla 1 y horquilla 2 pueden estar modificados o no modificados. En algunas modalidades, la horquilla 1 y la horquilla 2 están separadas por un nucleótido. En algunas modalidades, las regiones de horquilla comprenden menos nucleótidos que los que se muestran en la Tabla 3B. En algunas modalidades, las regiones de horquilla comprenden más nucleótidos que los que se muestran en la Tabla 3B. Cuando una región de horquilla comprende menos o más nucleótidos que los que se muestran en el esquema de la Tabla 3B, como será evidente para los expertos en la técnica, se debería mantener el patrón de modificación.

[00870] En algunas modalidades, una región de horquilla tiene nucleótidos que son complementarios en la secuencia de ácido nucleico cuando se lee en direcciones opuestas. En algunas modalidades, las regiones de horquilla pueden no ser perfectamente complementarias entre sí cuando se leen en direcciones opuestas (por ejemplo, la parte superior o bucle de la horquilla comprende nucleótidos desapareados).

**Extremo 3'**

[00871] El ARNsg tiene un extremo 3', que es el último nucleótido del ARNsg. La región del extremo 3' incluye los últimos 1 a 7 nucleótidos del extremo 3'. En algunas

modalidades, el extremo 3' es el extremo de la horquilla 2. En algunas modalidades, el ARNsg comprende nucleótidos después de la(s) región(es) de horquilla. En algunas modalidades, el ARNsg incluye una región de la cola 3', en cuyo caso el último nucleótido de la cola 3' es el extremo 3'. En algunas modalidades, la cola 3' comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 o más nucleótidos, por ejemplo, que no están asociados con la estructura secundaria de una horquilla. En algunas modalidades, la región de la cola 3' comprende 1, 2, 3 o 4 nucleótidos que no están asociados con la estructura secundaria de una horquilla. En algunas modalidades, la región de cola 3' comprende 4 nucleótidos que no están asociados con la estructura secundaria de una horquilla. En algunas modalidades, la región de cola 3' comprende 1, 2 o 3 nucleótidos que no están asociados con la estructura secundaria de una horquilla.

[00872] En algunas modalidades, el espaciador o la región diana del ARNg está presente en el extremo 3' del ARNg.

**Tabla 3A (Porción conservada de un ARNsg de spyCas9; SEQ ID NO: 400)**

| 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 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| G | U | U | U | U | A | G | A | G | C | U | A | G | A | A | A | U | A | G | C | A | A | G | U | U | A | A | A | A | U |
| LS1-LS6 | | | | | | B1-B2 | | US1-US12 | | | | | | | | | | | | B3-B6 | | | | LS7-LS12 | | | | | |

| 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | A | G | G | C | U | A | G | U | C | C | G | U | U | A | U | C | A | A | C | U | U | G | A | A | A | A | A | G | U |
| Nexo | | | | | | | | | | | | | | | | | | H1-1 a H1-12 | | | | | | | | | | | |

| 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| G | G | C | A | C | C | G | A | G | U | C | G | G | U | G | C |
| N | H2-1 a H2-15 | | | | | | | | | | | | | | |

**Tabla 3B (Regiones de ARNsg de spyCas9 (vista lineal, 5' a 3')**

| | LS1-6 | | B1 -2 | | US1-12 | | B3-6 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Extremo 5' (n) | tallo inferior | n | bulto | n | tallo superior | n | bulto | n |

| LS7-12 | | N1-18 | | H1-1 a H1-12 | | H2-1 a H2-15 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| tallo inferior | n | nexo | n | horquilla 1 | n | horquilla 2 | extremo 3' |

[00873] En algunas modalidades, el ARNsg comprende una porción conservada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 400.

[00874] En algunas modalidades, 2, 3 o 4 de los nucleótidos 13 a 16 (US5-US8 de la región de tallo superior) se sustituyen por el primer conector interno relativo a la SEQ ID NO: 400. En algunas modalidades, los nucleótidos 12 a 17 (US4-US9 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400. En algunas modalidades, los nucleótidos 11 a 18 (US3-US10 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400. En algunas modalidades, los nucleótidos 10 a 19 (US2-US11 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400. En algunas modalidades, los nucleótidos 9 a 20 (US1-US10 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400. En algunas modalidades, los nucleótidos 36-37 (N6-N7 de la región de nexo) se sustituyen por el segundo conector interno relativo a la SEQ ID NO: 400. En algunas modalidades, 2, 3 o 4 de los nucleótidos 53 a 56 (H1-5-H1-8 de la horquilla 1) se sustituyen por el tercer conector interno relativo a la SEQ ID NO: 400. En algunas modalidades, los nucleótidos 52 a 57 (H1-4-H1-9 de la horquilla 1) sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400. En algunas modalidades, los nucleótidos 51 a 58 (H1-3-H1-10 de la horquilla 1) sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400. En algunas modalidades, los nucleótidos 50 a 59 (H1-1-H1-12 de la horquilla 1) sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400. En algunas modalidades, se eliminan los nucleótidos 77 a 80 con respecto a la SEQ ID NO: 400. En algunas modalidades, todos los nucleótidos del tallo superior (US1-US12) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400. En algunas modalidades, todos los nucleótidos del tallo superior (US1-US12) se sustituyen con un nucleósido abásico con respecto a la SEQ ID NO: 400 en un ARNsg en donde los nucleótidos en otra porción del ARNsg se sustituyen por un conector interno, por ejemplo, en la región de nexo o preferiblemente en la región de la horquilla 1 como se proporciona anteriormente.

### G. ARN guía de NmeCas9 con una o más regiones acortadas que comprenden conectores internos

[00875] En el presente documento se proporcionan ARN guía (ARNg) que comprenden una o más regiones acortadas y uno o más conectores internos.

[00876] En algunas modalidades, un ARNg (por ejemplo, ARNsg, ARNdg o ARNcr) proporcionado en el presente documento comprende una región conservada que comprende una región rde repetición y antirrepetición , una región de horquilla 1 y una región de horquilla 2, en donde una o más de la región antirrepetición, la región de horquilla 1 y la región de horquilla 2 se acortan. En algunas modalidades, el ARNg es un ARNg de Cas9 de *N. meningitidis* (NmeCas9).

[00877] En algunas modalidades, la región conservada de un ARNg comprende:

una región de repetición y antirrepetición acortada, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 2 a 24 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 37 a 64 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 36 se enlaza con el nucleótido 65 mediante (i) un primer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos.

[00878] En algunas modalidades, la región conservada de un ARNg comprende:

una región de horquilla 1 acortada, en donde la horquilla 1 acortada carece de 2 a 10, opcionalmente, 2 a 8 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 82 a 95 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 81 se enlaza con el nucleótido 96 mediante (i) un segundo conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos.

[00879] En algunas modalidades, la región conservada de un ARNg comprende:

una región de horquilla 2 acortada, en donde la horquilla 2 acortada carece de 2 a 18, opcionalmente, 2 a 16 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 113 a 134 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 112 se enlaza con el nucleótido 135 b mediante (i) un tercer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos.

[00880] En algunas modalidades, la región conservada de un ARNg comprende:

(a) una región de repetición y antirrepetición acortada, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 2 a 24 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 37 a 64 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 36 se enlaza con el nucleótido 65 mediante (i) un primer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4; y

(b) una región de horquilla 1 acortada, en donde la horquilla 1 acortada carece de 2 a 10, opcionalmente, 2 a 8 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 82 a 95 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 81 se enlaza con el nucleótido 96 mediante (i) un segundo conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos.

[00881] En algunas modalidades, la región conservada de un ARNg comprende:

(a) una región de repetición y antirrepetición acortada, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 2 a 24 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 37 a 64 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 36 se enlaza con el nucleótido 65 mediante (i) un primer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4; y

(b) una región de horquilla 2 acortada, en donde la horquilla 2 acortada carece de 2 a 18, opcionalmente, 2 a 16 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 113 a 134 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 112 se enlaza con el nucleótido 135 b mediante (i) un tercer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos.

[00882] En algunas modalidades, la región conservada de un ARNg comprende:

(a) una región de horquilla 1 acortada, en donde la horquilla 1 acortada carece de 2 a 10, opcionalmente, 2 a 8 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 82 a 95 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 81 se enlaza con el nucleótido 96 mediante (i) un segundo conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4; y

(b) una región de horquilla 2 acortada, en donde la horquilla 2 acortada carece de 2 a 18, opcionalmente, 2 a 16 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 113 a 134 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 112 se enlaza con el nucleótido 135 mediante (i) un tercer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos.

[00883] En algunas modalidades, la región conservada de un ARNg comprende:

(a) una región de repetición y antirrepetición acortada, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 2 a 24 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 37 a 64 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 36 se enlaza con el nucleótido 65 mediante (i) un primer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4;

(b) una región de horquilla 1 acortada, en donde la horquilla 1 acortada carece de 2 a 10, opcionalmente, 2 a 8 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 82 a 95 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 81 se enlaza con el nucleótido 96 mediante (i) un segundo conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4; y

(c) una región de horquilla 2 acortada, en donde la horquilla 2 acortada carece de 2 a 18, opcionalmente, 2 a 16 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 113 a 134 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 112 se enlaza con el nucleótido 135 mediante (i) un tercer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos.

[00884] Las posiciones de nucleótidos en esta sección, incluidas las subsecciones A a E siguientes, están numeradas según la Fig. 10E, que proporciona un ARNsg de Nme a modo de ejemplo.

[00885] En algunas modalidades, se eliminan uno de los nucleótidos 144 y 145 o ambos opcionalmente en comparación con la SEQ ID NO: 500.

[00886] En algunas modalidades, el ARNg comprende al menos uno del primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[00887] En algunas modalidades, el ARNg comprende al menos dos del primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[00888] En algunas modalidades, el ARNg comprende el primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[00889] En algunas modalidades, la región guía tiene (i) una inserción de un nucleótido o una eliminación de 1 a 4 nucleótidos entre las posiciones 1 a 24 con respecto a la SEQ ID NO: 500, o (ii) una longitud de 24 nucleótidos.

[00890] En algunas modalidades, la región guía tiene una longitud de 25, 24, 23, 22, 21 o 20 nucleótidos, opcionalmente en donde la región guía tiene una longitud de 25, 24, 23 o 22 nucleótidos en las posiciones 1 a 24 de la SEQ ID NO: 500.

[00891] En algunas modalidades, la región guía tiene una longitud de 23 o 24 nucleótidos en las posiciones 1 a 24 de la SEQ ID NO: 500.

[00892] En algunas modalidades, al menos 10 nucleótidos de la porción conservada son nucleótidos modificados.

[00893] En algunas modalidades, una sustitución en una porción dúplex es una sustitución conservativa.

[00894] Dentro de cada región de repetición y antirrepetición, la región de horquilla 1 y la región de horquilla 2, las hebras de cada una de las porciones dúplex están unidas por un conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye a 4 nucleótidos, o al menos 4 nucleótidos. En el presente documento se proporcionan conectores internos que tienen varias longitudes de puente para permitir que un experto en la técnica una las cadenas de la porción dúplex con conectores internos o nucleótidos o una combinación de estos.

[00895] En algunas modalidades, una región de repetición y antirrepetición de un ARNg es una región de repetición y antirrepetición acortada que carece de 2 a 24 nucleótidos, por ejemplo, cualquiera de las regiones de repetición y antirrepetición

indicadas en las modalidades numeradas anteriores o en las Tablas 1 y 2 o descrita en otra parte del presente documento, que puede combinarse con cualquiera de las regiones de horquilla 1 acortada o región de horquilla 2 descritas en el presente documento, incluidas, entre otras, combinaciones indicadas en las modalidades numeradas anteriores y representadas en las secuencias de las Tablas 1 y 2 o descritas en otra parte del presente.

[00896] En algunas modalidades, el primer conector sustituye las posiciones 49 a 52 y el segundo conector interno sustituye las posiciones 87 a 90.

[00897] En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye las posiciones 87 a 90 y el tercer conector interno sustituye las posiciones 122 a 125.

[00898] En algunas modalidades, el primer conector sustituye las posiciones 49 a 52 y el tercer conector interno sustituye las posiciones 122 a 125.

[00899] En algunas modalidades, el primer conector sustituye 49 a 52, el segundo conector interno sustituye las posiciones 87 a 90 y el tercer conector interno sustituye las posiciones 122 a 125.

**Región de repetición y antirrepetición acortada**

[00900] En algunas modalidades, una porción conservada de un ARNg descrito en el presente documento comprende una región de repetición y antirrepetición acortada. En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición comprende una estructura de horquilla entre una primera porción y una segunda porción de la región de repetición y antirrepetición, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00901] En algunas modalidades, una porción conservada de un ARNg descrito en la presente comprende una región de tallo superior acortada de la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición comprende un bucle (por ejemplo, un tetrabucle).

[00902] En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 2 a 28 nucleótidos. En algunas modalidades, (i) uno o más de los nucleótidos 37 a 64 se eliminan y opcionalmente se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 1; y (ii) el nucleótido 36 está unido al nucleótido 65 mediante un primer conector interno.

[00903] En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición abreviada carece de 2 a 28 nucleótidos.

[00904] En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de 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 o 50 nucleótidos.

[00905] En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 12 a 28, opcionalmente, 18 a 24 nucleótidos. En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos. En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 nucleótidos. En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de aproximadamente 34 nucleótidos. En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de aproximadamente 35 nucleótidos. En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de aproximadamente 36 nucleótidos. En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de aproximadamente 37 nucleótidos. En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de aproximadamente 38 nucleótidos.

[00906] En algunas modalidades, se eliminan uno o más pares de bases del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición acortada. En algunas modalidades, el tallo superior de la región de repetición y antirrepetición acortada comprende no más de uno, dos, tres o cuatro pares de bases. Como se usa en el presente documento, «pares de bases» o «nucleótidos con emparejamiento de bases» o «nucleótidos con pares de Watson y Crick» incluyen cualquier par capaz de formar un par de bases de Watson y Crick, incluidos los pares A-T, A-U, T-A, U-A, C-G y G-C, y pares que incluyen versiones modificadas de cualquiera de los nucleótidos anteriores que tienen la misma preferencia de emparejamiento de bases. En algunas modalidades, los pares de bases o nucleótidos con emparejamiento de bases también incluyen pares de bases generados mediante apilamiento de bases, por ejemplo, los nucleótidos 25 y 76, 33 y 68, 34 y 67, y 37 y 64 en la región de repetición y antirrepetición; y los nucleótidos 78 y 100, y 83 y 94 en la región de horquilla 1.

[00907] En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye los nucleótidos 38 a 63 del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición acortada y une el nucleótido 37 al nucleótido 64. En algunas modalidades, el primer conector interno

sustituye los nucleótidos 37 a 64 del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición acortada y enlaza el nucleótido 36 al nucleótido 65.

[00908] En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una porción dúplex de 11 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud. En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una única porción dúplex. En algunas modalidades, las posiciones 25 y 76, las posiciones 33 y 68, las posiciones 34 y 67 y las posiciones 48 y 53 tienen interacciones de apilamiento de base y no constituyen una discontinuidad en la porción dúplex.

[00909] En algunas modalidades, se eliminan uno o más de los nucleótidos con emparejamiento de bases en la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, uno o más de nucleótidos con emparejamiento de bases se eligen de las posiciones 37 y 53, posiciones 38 y 54, posiciones 39 y 55, posiciones 40 y 56, posiciones 41 y 57, posiciones 43 y 58, posiciones 43 y 59, posiciones 44 y 60, posiciones 45 y 61, posiciones 46 y 62, posiciones 47 y 63, y posiciones 48 y 64.

[00910] En algunas modalidades, la región del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición comprende de 1 a 5 pares de bases.

[00911] En algunas modalidades, el tallo superior de la región de repetición y antirrepetición acortada incluye una o más sustituciones con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[00912] En algunas modalidades, una o más sustituciones se consideran sustituciones conservadoras mediante el intercambio de posiciones de nucleótidos con emparejamiento de bases de manera que se puedan mantener los pares de bases. Por ejemplo, un par G-C se convierte en un par C-G, un par A-U se convierte en un par U-A u otro emparejamiento de bases natural o modificado.

[00913] En algunas modalidades, el primer conector interno sustituye a los nucleótidos 49 a 52 con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[00914] En algunas modalidades, la región de repetición y antirrepetición acortada tiene de 8 a 22 nucleótidos modificados.

**Región de horquilla 1 acortada**

[00915] En algunas modalidades, una porción conservada de un ARNg descrito en la presente comprende una región de horquilla 1 acortada. En algunas modalidades, la región de horquilla 1 comprende una estructura de horquilla entre una primera porción y una

segunda porción de la región de horquilla 1, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00916] En algunas modalidades, una porción conservada de un ARNg descrito en la presente comprende una región de tallo superior acortada de la región de horquilla 1. En algunas modalidades, la horquilla 1 comprende un bucle (por ejemplo, un tetrabucle).

[00917] En algunas modalidades, la horquilla 1 acortada carece de 2 a 10 nucleótidos. En algunas modalidades, (i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 82 a 95 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y (ii) el nucleótido 81 se enlaza al nucleótido 96 mediante un segundo conector interno.

[00918] En algunas modalidades, la región de horquilla 1 acortada carece de 2 a 10 nucleótidos. En algunas modalidades, la región de horquilla 1 acortada tiene una longitud de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 nucleótidos. En algunas modalidades, en donde la región de horquilla 1 acortada tiene una porción dúplex de 4 a 8 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud. En algunas modalidades, en donde la región de horquilla 1 acortada tiene una porción dúplex de 7 a 8 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.

[00919] En algunas modalidades, la región de horquilla 1 acortada tiene una única porción dúplex. En algunas modalidades, en la región de horquilla 1 acortada, las posiciones 78 y 100, y las posiciones 83 y 94 tienen interacciones de apilamiento de base y no constituyen una discontinuidad en la porción dúplex.

[00920] En algunas modalidades, se eliminan uno o dos pares de bases de la región de horquilla 1 acortada. En algunas modalidades, el tallo de la región de horquilla 1 acortada comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho pares de bases. En algunas modalidades, el tallo de la región de horquilla 1 acortada tiene una longitud de siete u ocho nucleótidos con emparejamiento de bases.

[00921] En algunas modalidades, se eliminan una o más de las posiciones 85-86 y uno o más de los nucleótidos 91-92 de la región de horquilla 1 acortada. En algunas modalidades, los nucleótidos 86 y 91 de la región de horquilla 1 acortada están eliminados. En algunas modalidades, uno o más de los nucleótidos 82 a 95 de la región de horquilla 1 acortada se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[00922] En algunas modalidades, el segundo conector interno sustituye los nucleótidos 87 a 91 con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[00923] En algunas modalidades, la región de horquilla 1 acortada carece de 2 a 15 nucleótidos modificados.

**Región de horquilla 2 acortada**

[00924] En algunas modalidades, una porción conservada de un ARNg descrito en la presente comprende una región de horquilla 2 acortada. En algunas modalidades, la región de horquilla 2 acortada comprende una estructura de horquilla entre una primera porción y una segunda porción de la región de horquilla 2, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[00925] En algunas modalidades, la región de horquilla 2 acortada carece de 2 a 18 nucleótidos. En algunas modalidades, la región de horquilla 2 acortada carece de 2 a 16 nucleótidos. En algunas modalidades, (i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 113 a 121 y 126 a 134 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y (ii) el nucleótido 112 se enlaza al nucleótido 135 mediante un tercer conector interno.

[00926] En algunas modalidades, una porción conservada de un ARNg descrito en la presente comprende una región de tallo superior acortada de la región de horquilla 2. En algunas modalidades, la horquilla 1 comprende un bucle (por ejemplo, un tetrabucle). En algunas modalidades, la región de horquilla 2 acortada carece de 2 a 16 nucleótidos. En algunas modalidades, la región de horquilla 2 acortada tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos. En algunas modalidades, la región ed horquilla 2 acortada tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 nucleótidos. En algunas modalidades, se eliminan uno o más de los nucleótidos 113 a 121 y uno o más de los nucleótidos 126 a 134 de la región de horquilla 2 acortada.

[00927] En algunas modalidades, la región de horquilla 2 acortada comprende una región desapareada.

[00928] En algunas modalidades, la región de horquilla 2 acortada tiene dos porciones dúplex. En algunas modalidades, la región de horquilla 2 acortada tiene una porción dúplex de 4 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud. En algunas modalidades, la región de horquilla 2 acortada tiene una porción dúplex de 4 a 8 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud. En algunas modalidades, la región de horquilla 2 acortada tiene una porción dúplex de 4 a 6 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud. En algunas modalidades, el tallo superior de la región de horquilla 2 acortada comprende uno, dos, tres o cuatro pares de bases. En algunas modalidades, se

elimina al menos un par de nucleótidos 113 y 134, nucleótidos 114 y 133, nucleótidos 115 y 132, nucleótidos 116 y 131, nucleótidos 117 y 130, nucleótidos 118 y 129, los nucleótidos 119 y 128, los nucleótidos 120 y 127 y los nucleótidos 121 y 126. En algunas modalidades, se eliminan todas las posiciones 113 a 121 y 126 a 134 de la región de horquilla 2 acortada.

[00929] En algunas modalidades, uno o más de los nucleótidos 113 a 134 de la región de horquilla 2 acortada se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500. En algunas modalidades, el tercer conector interno sustituye los nucleótidos 122 a 125 con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[00930] En algunas modalidades, la región de horquilla 2 acortada tiene 2 a 15 nucleótidos modificados.

**Cola 3'**

[00931] En algunas modalidades, el ARNg comprende una cola 3'. En algunas modalidades, la cola 3' tiene una longitud de 1 a 20 nucleótidos y está unida mediante un enlace fosfodiéster o fosforotioato al extremo 3' de la región conservada de un ARNg. En algunas modalidades, la cola 3' comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' comprende 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' comprende 1 a 2 nucleótidos.

[00932] En algunas modalidades, la cola 3' tiene una longitud de 1 a 10 nucleótidos, 1 a 5 nucleótidos, 1 a 4 nucleótidos, 1 a 3 nucleótidos y 1-2 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' comprende alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' tiene una longitud de 1 nucleótido. En algunas modalidades, la cola 3' tiene una longitud de 2 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' tiene una longitud de 3 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' tiene una longitud de 4 nucleótidos. En algunas modalidades, la cola 3' tiene una longitud de 1 o 2 nucleótidos.

[00933] En algunas modalidades, la cola 3' termina con un nucleótido que comprende un uracilo o uracilo modificado. En algunas modalidades, la cola 3' tiene una longitud de 1 nucleótido. En algunas modalidades, la cola 3' consiste en un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado. En algunas modalidades, en donde la cola 3' comprende una modificación de uno cualquiera o más de los nucleótidos presentes en la cola 3'. En modalidades adicionales, en donde la modificación de la cola 3' es uno o más de

nucleótidos modificados con 2'-O-metilo (2'-OMe) y un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

[00934] En algunas modalidades, en donde la cola 3' está totalmente modificada.

[00935] En algunas modalidades, en donde el nucleótido 3' del ARNg es un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado.

[00936] En algunas modalidades, uno o más de los nucleótidos 144 y 145 están eliminados con respecto a la SEQ ID NO: 500. En algunas modalidades, se eliminan ambos nucleótidos 144 y 145 con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[00937] En algunas modalidades, el ARNg no comprende una cola 3'.

[00938] En algunas modalidades, el extremo 3' de la guía, que no comprende una cola 3', termina con un nucleótido que comprende un uracilo o uracilo modificado. En algunas modalidades, la cola 3' consiste en un nucleótido que comprende un uracilo o uracilo modificado. En algunas modalidades, el nucleótido terminal 3' es un nucleótido modificado. En algunas modalidades, la modificación del extremo 3' es uno o más de nucleótidos modificados con 2'-O-metilo (2'-OMe) y un enlace fosforotioato (PS) entre el nucleótido terminal y el penúltimo nucleótido.

[00939] En algunas modalidades, el extremo 3', es decir, el extremo de la horquilla 2 sin más cola o el extremo de la cola 3', comprende o comprende además una o más modificaciones, por ejemplo, un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado con 2'-OMe, un nucleótido modificado con 2'-O-moe, un nucleótido modificado con 2'-F o un nucleótido modificado abásico invertido, opcionalmente en donde el extremo 3' comprende al menos dos modificaciones seleccionadas independientemente de un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado con 2'-OMe, un nucleótido modificado con 2'-O-moe, un nucleótido modificado con 2'-F y un nucleótido modificado abásico invertido. En algunas modalidades, el extremo 3' comprende o comprende además una o más modificaciones, por ejemplo, un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado con 2'-OMe, un nucleótido modificado con 2'-F, opcionalmente en donde el extremo 3' comprende al menos dos modificaciones seleccionadas independientemente entre un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado con 2'-OMe y un nucleótido modificado con 2'-F. En algunas modalidades, el extremo 3' comprende un enlace fosforotioato (PS) entre los nucleótidos 141 y 142, y 142 y 143; un nucleótido modificado con 2'-OMe en cada una de las posiciones 142 y 143.

[00940] En algunas modalidades, el extremo 3', es decir, el extremo de la horquilla 2 sin más cola o el extremo de la cola 3', comprende o comprende además uno o más enlaces fosforotioato (PS) entre nucleótidos. En algunas modalidades, el extremo 3' comprende o comprende también uno o más nucleótidos modificados con 2'-OMe. En algunas modalidades, el extremo 3' comprende o comprende también uno o más nucleótidos modificados con 2'-O-moe. En algunas modalidades, el extremo 3' comprende o comprende también uno o más nucleótidos modificados con 2'-F. En algunas modalidades, el extremo 3' comprende o comprende también uno o más nucleótidos modificados abásicos invertidos. En algunas modalidades, el extremo 3' comprende o comprende también una o más modificaciones de extremo protectoras. En algunas modalidades, el extremo 3' comprende o comprende también una combinación de uno o más enlaces fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado con 2'-OMe, un nucleótido modificado con 2'-O-moe, un nucleótido modificado con 2'-F y un nucleótido modificado abásico invertido.

**Región guía**

[00941] En algunas modalidades, el ARNg también comprende una secuencia guía. En algunas modalidades, la secuencia guía comprende 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos, opcionalmente 22, 23, 24 o 25 nucleótidos desde 5' hasta el nucleótido más 5' con respecto a la región de repetición y antirrepetición. En algunas modalidades, la secuencia guía comprende 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia guía tiene una longitud de 24 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia guía tiene una longitud de 23 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia guía tiene una longitud de 22 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia guía tiene una longitud de 21 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia guía tiene una longitud de 20 nucleótidos.

[00942] En algunas modalidades, la región guía tiene (i) una inserción de un nucleótido o una eliminación de 1 a 4 nucleótidos entre las posiciones 1 a 24 con respecto a la SEQ ID NO: 500, o (ii) una longitud de 24 nucleótidos.

[00943] En algunas modalidades, la selección de la secuencia guía se determina en función de secuencias diana dentro del gen de interés para la edición. Por ejemplo, en algunas modalidades, el ARNg comprende una secuencia guía que es complementaria a las secuencias diana de un gen de interés.

[00944] En algunas modalidades, la secuencia diana en el gen de interés puede ser complementaria a la secuencia guía del ARNg. En algunas modalidades, el grado de complementariedad o identidad entre una secuencia guía de un ARNg y su correspondiente secuencia diana en el gen de interés puede ser aproximadamente 90 %, 95 % o 100 %. En algunas modalidades, la región guía de un ARNg y la región diana de un gen de interés pueden ser 100 % complementarias o idénticas. En otras modalidades, la secuencia guía de un ARNg y la secuencia diana de un gen de interés pueden contener al menos un emparejamiento incorrecto. Por ejemplo, la secuencia guía de un ARNg y la secuencia diana de un gen de interés pueden contener 1, opcionalmente, 2 o 3 emparejamientos incorrectos, donde la longitud total de la secuencia diana es al menos aproximadamente 22, 23, 24 o más nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia guía de un ARNg y la región diana de un gen de interés pueden contener 1, opcionalmente, 2 o 3 emparejamientos incorrectos donde la secuencia guía comprende aproximadamente 24 nucleótidos. En determinadas modalidades, la secuencia guía no contiene emparejamientos incorrectos, es decir, es completamente complementaria con la secuencia diana. El extremo 5' puede comprender nucleótidos que no se consideran regiones guía (es decir, no funcionan para dirigir una proteína Cas9 a un ácido nucleico diana).

[00945] En algunas modalidades, la región guía del ARN guía acortado comprende al menos un nucleótido modificado.

[00946] En algunas modalidades, la región guía del ARNg comprende al menos dos nucleótidos modificados, opcionalmente al menos cuatro nucleótidos modificados, en donde cada modificación, independientemente, comprende opcionalmente un nucleótido modificado seleccionado de nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-OMe), nucleótido modificado con 2'-O-(2-metoxietil) (2'-O-moe), un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado abásico invertido o combinaciones de estos.

[00947] En las Tablas 2A a 2C se proporcionan ejemplos de ARN guía acortado que comprenden conectores internos. Tal como se utilizan en la presente, «conector 1» o «L1» hacen referencia a un conector interno con una longitud de puente de alrededor de 15 a 21 átomos. Tal como se utilizan en la presente, «enlazador 2» o «L2» hacen referencia a un conector interno con una longitud de puente de alrededor de 6 a 12 átomos.

[00948] Las modificaciones de nucleótidos se indican en las Tablas 4A-4B como sigue: m: 2'-OMe; *: enlace PS; f: 2'-fluoro; (invd): abásico invertido; moe: 2'-moe; mi: ENA; d: desoxirribonucleótido (tenga en cuenta también que T es siempre un desoxirribonucleótido); x: UNA. En las secuencias modificadas de ARNsg, en determinadas modalidades, cada A, C, G, U y N es independientemente un azúcar ribosa (2'-OH). En determinadas modalidades, cada A, C, G, U y N es un azúcar ribosa (2'-OH). Así, por ejemplo, mA representa 2'-O-metil adenosina; xA representa un nucleótido UNA con una nucleobase adenina; eA representa un nucleótido ENA con una nucleobase adenina; y dA representa un desoxirribonucleótido de adenosina.

[00949] Como se usa en el presente documento, «N» puede ser cualquier nucleótido natural o no natural. Por ejemplo, en la presente se incluye la SEQ ID NO: 1001 en la Tabla 4A, donde las N se reemplazan con cualquiera de las secuencias guía descritas en la presente. Las modificaciones permanecen como se muestran en la SEQ ID NO: 1001 a pesar de la sustitución con N de los nucleótidos de una guía. Es decir, aunque los nucleótidos de la guía reemplazan las N, los primeros tres nucleótidos tienen modificaciones 2'-O-Me y existen enlaces fosforotioato entre el primer y segundo nucleótido, el segundo y tercer nucleótido y el tercer y cuarto nucleótido.

[00950] Las designaciones de ARNsg a veces se proporcionan con uno o más ceros iniciales inmediatamente después de la G. Esto no afecta al significado de la designación. Así, por ejemplo, G000282, G0282, G00282 y G282 se refieren al mismo ARNsg.

**Tabla 4A: Ejemplos de ARN guía de NmeCas9 que comprenden conectores**

| **SEQ ID NO:** | **Secuencia de ARNg** |
|---|---|
| **1000** | $(N)_{20-25}$ GUUGUAGCUCCCUUC**(L1)**GACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUC**(L1)**GAUGUGCCGCAACG CUCUGCC**(L1)**GGCAUCGUU |
| **1001** | mN*mN*mN*mNmNNNmNmNNmNNmNNNNNmNNNNmNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmU mUmC(**L1**)mGmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(**L1**)mGmAmUGUGC mCGmCAAmCGCUCUmGmCC(**L1**)GGCAUCG*mU*mU |
| **1002** | mN*mN*mN*mNmNNNmNmNNmNNmNNNNNmNNNNmNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmU (L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAm |

| SEQ ID NO: | Secuencia de ARNg |
|---|---|
| | CGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| **1003** | NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| **1004** | $(N)_{20-25}$ GUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| **1005** | $(N)_{20-25}$ GUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmG(L1)mCmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| **1006** | $(N)_{20-25}$ GUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmG(L1)mCmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| **1007** | $(N)_{20-25}$ GUUGmUmAmGmCUCCCmUmG(L1)mCmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| **1008** | $(N)_{20-25}$ GUUGmUmAmGmCUCCCmG(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| **1009** | $(N)_{20-25}$ GUUGmUmAmGmCUCCmG(L1)mCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| **1010** | $(N)_{20-25}$ GUUGmUmAmGmCUCC(L1)GUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| **1011** | $(N)_{20-25}$ GUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmG(L1)mCmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmU(L1)mAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| **1012** | $(N)_{20-25}$ GUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmG(L1)mCmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmU(L1)mAGGCAUCGmU*mU |

## Tabla 4B. Secuencias ejemplares de ARNg de NmeCas9

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| G021536 | 610 | CCAAGUGUCUUCCAGUAC | 710 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGU |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | GAUUUGGUUGUAGCUCC CUGAAACCGUUGCUACAA UAAGGCCGUCGAAAGAU GUGCCGCAACGCUCUGC CUUCUGGCAUCGUU | | AmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCC mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAA U*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCm UmUmCmUGGCAUCG*mU*mU |
| G021844 | 611 | CCAAGUGUCUUCCAGUAC GAUUUGGUUGUAGCUCC CUUCGACCGUUGCUACAA UAAGGCCGUCGAUGUGC CGCAACGCUCUGCCGGC AUCGUU | 711 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGU AmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCC mUmUmC(L1)mGmAmCmCGUUmGmCUAm CAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmU GUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)G GCAUCG*mU*mU |
| G021844 | 612 | CCAAGUGUCUUCCAGUAC GAUUUGGUUGUAGCUCC CUUCGACCGUUGCUACAA UAAGGCCGUCGAUGUGC CGCAACGCUCUGCCGGC AUCGUU | 712 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGU AmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCC mUmUmC(L1)mGmAmCmCGUUmGmCUAm CAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmU GUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)G GCAUCG*mU*mU |
| G021845 | 613 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUGAAACCGUUGCUACA AUAAGGCCGUCGAAAGAU GUGCCGCAACGCUCUGC CUUCUGGCAUCGUU | 713 | mC*mU*mU*mCmACCmAmGGmAGmAAGC CmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCC mUmGmAmAmAmCmCGUUmGmCUAmCAA U*AAGmGmCCmGmUmCmGmAmAmAmGm AmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCm UmUmCmUGGCAUCG*mU*mU |
| G021846 | 614 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUUCGACCGUUGCUAC AAUAAGGCCGUCGAUGU GCCGCAACGCUCUGCCG GCAUCGUU | 714 | mC*mU*mU*mCmACCmAmGGmAGmAAGC CmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCC mUmUmC(L1)mGmAmCmCGUUmGmCUAm CAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmU GUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)G GCAUCG*mU*mU |
| G023066 | 615 | CCAAGUGUCUUCCAGUAC GAUUUGGUUGUAGCUCC CUCCGUUGCUACAAUAAG GCCGUCGAUGUGCCGCA ACGCUCUGCCGGCAUCG UU | 715 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGU AmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCC mU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGm GmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGm CAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023067 | 616 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC | 716 | mC*mU*mU*mCmACCmAmGGmAGmAAGC CmGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCC |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | CCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | | mU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023069 | 617 | CUUCACCAGGAGAAGCCGUCACACGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 717 | CUUCACCAGGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023070 | 618 | CUUCACCAGGAGAAGCCGUCACACGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 718 | mC*mU*mU*CACCAGGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023071 | 619 | CUUCACCAGGAGAAGCCGUCACACGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 719 | mC*mU*mU*mCACCAGGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023072 | 620 | CUUCACCAGGAGAAGCCGUCACACGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 720 | mC*mU*mU*CmACCAGGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023073 | 621 | CUUCACCAGGAGAAGCCGUCACACGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 721 | mC*mU*mU*CACCAmGGAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023074 | 622 | CUUCACCAGGAGAAGCCGUCACACGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAA | 722 | mC*mU*mU*CACCAGGmAGAAGCCGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGm |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | GGCCGUCGAUGUGCCGC AACGCUCUGCCGGCAUC GUU | | UmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGC UCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023075 | 623 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUCCGUUGCUACAAUAA GGCCGUCGAUGUGCCGC AACGCUCUGCCGGCAUC GUU | 723 | mC*mU*mU*CACCAGGAGmAAGCCGUCAC ACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCm CGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGm UmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGC UCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023076 | 624 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUCCGUUGCUACAAUAA GGCCGUCGAUGUGCCGC AACGCUCUGCCGGCAUC GUU | 724 | mC*mU*mU*CACCAGGAGAAGCCmGUCAC ACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCm CGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGm UmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGC UCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023077 | 625 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUCCGUUGCUACAAUAA GGCCGUCGAUGUGCCGC AACGCUCUGCCGGCAUC GUU | 725 | mC*mU*mU*CACCAGGAGAAGCCGUCAmC ACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCm CGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGm UmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGC UCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023078 | 626 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUCCGUUGCUACAAUAA GGCCGUCGAUGUGCCGC AACGCUCUGCCGGCAUC GUU | 726 | mC*mU*mU*CmACCmAmGGmAGmAAGCC mGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCm U(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmG mCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmC AAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023079 | 627 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUCCGUUGCUACAAUAA GGCCGUCGAUGUGCCGC AACGCUCUGCCGGCAUC GUU | 727 | mC*mU*mU*mCACCmAmGGmAGmAAGCC mGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCm U(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmG mCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmC AAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023080 | 628 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUCCGUUGCUACAAUAA GGCCGUCGAUGUGCCGC | 728 | mC*mU*mU*mCmACCAmGGmAGmAAGCC mGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCm U(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmG mCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmC |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | AACGCUCUGCCGGCAUC GUU | | AAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023081 | 629 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUCCGUUGCUACAAUAA GGCCGUCGAUGUGCCGC AACGCUCUGCCGGCAUC GUU | 729 | mC*mU*mU*mCmACCmAGGmAGmAAGCC mGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCm U(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmG mCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmC AAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023082 | 630 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUCCGUUGCUACAAUAA GGCCGUCGAUGUGCCGC AACGCUCUGCCGGCAUC GUU | 730 | mC*mU*mU*mCmACCmAmGGAGmAAGCC mGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCm U(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmG mCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmC AAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023083 | 631 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUCCGUUGCUACAAUAA GGCCGUCGAUGUGCCGC AACGCUCUGCCGGCAUC GUU | 731 | mC*mU*mU*mCmACCmAmGGmAGAAGCC mGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCm U(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmG mCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmC AAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023084 | 632 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUCCGUUGCUACAAUAA GGCCGUCGAUGUGCCGC AACGCUCUGCCGGCAUC GUU | 732 | mC*mU*mU*mCmACCmAmGGmAGmAAGC CGUCAmCACmGUUGmUmAmGmCUCCCm U(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmG mCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmC AAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023085 | 633 | CUUCACCAGGAGAAGCC GUCACACGUUGUAGCUC CCUCCGUUGCUACAAUAA GGCCGUCGAUGUGCCGC AACGCUCUGCCGGCAUC GUU | 733 | mC*mU*mU*mCmACCmAmGGmAGmAAGC CmGUCACACmGUUGmUmAmGmCUCCCm U(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmG mCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmC AAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023103 | 634 | CCAAGUGUCUUCCAGUAC GAUUUGGUUGUAGCUCC CUCCGUUGCUACAAUAAG GCCGUCGAUGUGCCGCA ACGCUCUGCCGGCAUCG | 734 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGmGUU GmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmG mCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)m GmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmC C(L1)GGCAUCG*mU*mU |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | UU | | |
| G023104 | 635 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 735 | mC*mC*mA*AGUGUCUUCCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023105 | 636 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 736 | mC*mC*mA*mAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023106 | 637 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 737 | mC*mC*mA*AmGUGUCUUCCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023107 | 638 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 738 | mC*mC*mA*AGUGUmCUUCCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023108 | 639 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 739 | mC*mC*mA*AGUGUCUmUCCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023109 | 640 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 740 | mC*mC*mA*AGUGUCUUCmCAGUACGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| G023110 | 641 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 741 | mC*mC*mA*AGUGUCUUCCAGUAmCGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023111 | 642 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 742 | mC*mC*mA*AGUGUCUUCCAGUACGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023112 | 643 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 743 | mC*mC*mA*AmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023113 | 644 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 744 | mC*mC*mA*mAGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023114 | 645 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 745 | mC*mC*mA*mAmGUGUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023115 | 646 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 746 | mC*mC*mA*mAmGUGmUCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023116 | 647 | CCAAGUGUCUUCCAGUAC | 747 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUUCmCAGUA |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | GAUUUGGUUGUAGCUCC CUCCGUUGCUACAAUAAG GCCGUCGAUGUGCCGCA ACGCUCUGCCGGCAUCG UU | | mCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCC mU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGm GmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGm CAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023117 | 648 | CCAAGUGUCUUCCAGUAC GAUUUGGUUGUAGCUCC CUCCGUUGCUACAAUAAG GCCGUCGAUGUGCCGCA ACGCUCUGCCGGCAUCG UU | 748 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCCAGUA mCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCC mU(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGm GmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGm CAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023118 | 649 | CCAAGUGUCUUCCAGUAC GAUUUGGUUGUAGCUCC CUCCGUUGCUACAAUAAG GCCGUCGAUGUGCCGCA ACGCUCUGCCGGCAUCG UU | 749 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGU ACGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCm U(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmG mCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmC AAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023119 | 650 | CCAAGUGUCUUCCAGUAC GAUUUGGUUGUAGCUCC CUCCGUUGCUACAAUAAG GCCGUCGAUGUGCCGCA ACGCUCUGCCGGCAUCG UU | 750 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGU AmCGAUUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCm U(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmG mCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmC AAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU* mU |
| G023121 | 651 | CUUCACCAAGAGAAGCCG UCACACGUUGUAGCUCC CUCCGUUGCUACAAUAAG GCCGUCGAUGUGCCGCA ACGCUCUGCCGGCAUCG UU | 751 | mC*mU*mU*CACCmAAGAGAAGCCGUCAC ACmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCm CGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGm UmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGC UCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023122 | 652 | CCAAGUGUCUUCCAGUAC GAUUUGGUUGUAGCUCC CUCCGUUGCUACAAUAAG GCCGUCGAUGUGCCGCA ACGCUCUGCCGGCAUCG UU | 752 | mC*mC*mA*AGUGmUCUUCCAGUACGAUU UGmGUUGmUmAmGmCUCCCmU(L1)mCm CGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGm UmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGC UCUmGmCC(L1)GGCAUCG*mU*mU |
| G023413 | 653 | CCAAGUGUCUUCCAGUAC GAUUUGGUUGUAGCUCC | 753 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGU AmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCC |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | CUUGCACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | | mUmUmG(L1)mCmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| G023414 | 654 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUGCCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 754 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmG(L1)mCmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| G023415 | 655 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCGCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 755 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmG(L1)mCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| G023416 | 656 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCGCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 756 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCmG(L1)mCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| G023417 | 657 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 757 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCC(L1)GUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| G023418 | 658 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUUGCACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCGGCAUCGUU | 758 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmG(L1)mCmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmCmU(L1)mAmGmAmUGUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCC(L1)GGCAUCGmU*mU |
| G023419 | 659 | CCAAGUGUCUUCCAGUACGAUUUGGUUGUAGCUCCCUUGCACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCGAUGUGC | 759 | mC*mC*mA*mAmGUGmUmCUmUCmCAGUAmCGAUmUUGmGUUGmUmAmGmCUCCCmUmUmG(L1)mCmAmCmCGUUmGmCUAmCAAU*AAGmGmCCmGmUmC(L1)mGmAmU |

| ID de guía | SEQ ID NO | Secuencia sin modificar de ARNsg | SEQ ID NO | Secuencia modificada de ARNsg |
|---|---|---|---|---|
| | | CGCAACGCUCUGCCUAG GCAUCGUU | | GUGCmCGmCAAmCGCUCUmGmCCmU(L1 )mAGGCAUCGmU*mU |

## III. KITS Y COMPOSICIONES

[00951] Se incluyen composiciones que comprenden cualquiera de los ARNg (p. ej., ARNsg, ARNdg o ARNcr) descritos en el presente documento y un vehículo, excipiente, diluyente o similares. En algunos casos, el excipiente o diluyente es inerte. En algunos casos, el excipiente o diluyente no es inerte. En algunas modalidades, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de los ARNg (p. ej., ARNsg, ARNdg o ARNcr) descritos en el presente documento y un vehículo, excipiente, diluyente o similar farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende además una LNP. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende además una proteína Cas9 o un ARNm que codifica una proteína Cas9. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende uno cualquiera o más de los ARNg (por ejemplo, ARNsg, ARNdg o ARNcr), una LNP y una proteína Cas o ARNm que codifica una proteína Cas. En algunas modalidades, la proteína Cas es una proteína Cas monomérica, por ejemplo, una proteína Cas9. En algunas modalidades, la proteína Cas incluye múltiples subunidades.

[00952] También se proporcionan kits que comprenden uno o más ARNg (p. ej., ARNsg, ARNdg o ARNcr), composiciones o formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En algunas modalidades, un kit comprende además uno o más de un disolvente, solución, amortiguador, cada uno separado de la composición o formulación farmacéutica, instrucciones o desecante.

**Composiciones que comprenden un agente de unión a ADN guiado por ARN o un ácido nucleico que codifica un agente de unión a ADN guiado por ARN**

[00953] En algunas modalidades, se proporcionan composiciones o formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un ARNg (p. ej., ARNg, ARNdg o ARNcr) descrito en el presente documento y un agente de unión a ADN guiado por ARN o un ácido nucleico (por ejemplo, un ARNm) que codifica un agente de unión al ADN guiado al ARN. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN es una proteína Cas. En algunas modalidades, el ARNg junto con una proteína Cas o un ácido nucleico (p. ej., ARNm) que codifica la proteína Cas se denomina RNP Cas. En algunas modalidades, el

agente de unión a ADN guiado por ARN es uno que funciona con el ARNg para dirigir un agente de unión a ADN guiado por ARN a una secuencia de ácido nucleico diana. En algunas modalidades, el agente de unión al ADN guiado por ARN es una proteína Cas del sistema CRISPR/Cas de tipo II. En algunas modalidades, la proteína Cas es Cas9. En algunas modalidades, la proteína Cas9 es una Cas9 de tipo salvaje. En algunas modalidades, la proteína Cas9 se deriva de la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, por ejemplo, una Cas9 de S. *pyogenes* (SpyCas9). En algunas modalidades, se proporcionan composiciones que comprenden al menos un ARNg y una nucleasa o un ARNm que codifica una spyCas9. En algunas modalidades, la proteína Cas9 no se deriva de S. *pyogenes*, pero funciona de la misma manera que Cas9 de S. *pyogenes*, de modo que el ARNg que es específico de Cas9 de S. *pyogenes* dirigirá la proteína Cas9 que no es de Cas9 de S. *pyogenes* a su sitio objetivo. En algunas modalidades, la proteína Cas9 se deriva de la proteína Cas9 de *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, una SauCas9. En algunas modalidades, se proporcionan composiciones que comprenden al menos un ARNg y una nucleasa o un ARNm que codifica una SauCas9. En algunas modalidades, la proteína Cas9 se deriva de Cas9 de *Neisseria meningitidis* (NmeCas9). En algunas modalidades, se proporcionan composiciones que comprenden al menos un ARNg y una nucleasa o un ARNm que codifica una NmeCas9. En algunas modalidades, la proteína Cas9 no deriva de *N. meningitidis*. En algunas modalidades, se proporcionan composiciones que comprenden al menos un ARNg y una nucleasa o un ARNm que codifica una NmeCas9. En algunas modalidades, Cas induce una reuptura de doble cadena en el ADN diana. Los equivalentes de SpyCas9, SauCas9, NmeCas9 y otras proteínas Cas descritas en el presente documento están abarcados por las modalidades descritas en el presente documento.

[00954] Los agentes de unión al ADN guiados por ARN, incluido Cas9, abarcan modificaciones y variantes de estos. Las versiones modificadas que tienen un dominio catalítico, ya sea RuvC o HNH, que está inactivo se denominan «nickasas». Las nickasas cortan solo una cadena del ADN diana, creando así una ruptura monocatenaria. Una ruptura de una sola hebra también se puede conocer como «mella». En algunas modalidades, las composiciones y métodos comprenden nickasas. En algunas modalidades, las composiciones y métodos comprenden un agente de unión a ADN guiado por ARN de nickasa, tal como una nickasa Cas, por ejemplo, una nickasa Cas9, que induce una mella en lugar de una ruptura de doble cadena en el ADN diana.

[00955] En algunas modalidades, la nucleasa, por ejemplo, el agente de unión al ADN guiado por ARN, puede modificarse para contener solo un dominio de nucleasa funcional. Por ejemplo, el agente de unión a ADN guiado por ARN puede modificarse de modo que uno de los dominios de nucleasa mute o se elimine total o parcialmente para reducir su actividad de escisión de ácido nucleico. En algunas modalidades, se usa una nickasa Cas que tiene un dominio RuvC con actividad reducida. En algunas modalidades, se usa una nickasa Cas que tiene un dominio RuvC inactivo. En algunas modalidades, se utiliza una nickasa Cas que tiene un dominio HNH con actividad reducida. En algunas modalidades, se utiliza una nickasa Cas que tiene un dominio HNH inactivo.

[00956] En algunas modalidades, un aminoácido conservado dentro de un dominio de nucleasa del agente de unión al ADN guiado por ARN se sustituye para reducir o alterar la actividad de la nucleasa. En algunas modalidades, una proteína Cas puede comprender una sustitución de aminoácido en el dominio de nucleasa RuvC o similar a RuvC. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares en el dominio de nucleasa RuvC o similar a RuvC incluyen D10A (basado en la proteína Cas9 de *S. pyogenes* ) o H588A (basado en la proteína Cas9 de *N. meningitidis* ). En algunas modalidades, la proteína Cas puede comprender una sustitución de aminoácido en el dominio de nucleasa HNH o tipo HNH. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares en el dominio de nucleasa HNH o similar a HNH incluyen E762A, H840A, N863A, H983A y D986A (basadas en la proteína SpyCas9) o D16A (basadas en la proteína NmeCas9).

[00957] En algunas modalidades, el complejo RNP descrito en el presente documento comprende una nickasa o un ARNm que codifica una nickasa y un par de ARNg (uno o ambos pueden ser ARNsg) que son complementarios a las cadenas sentido y antisentido de la secuencia diana, respectivamente. En esta modalidad, los ARNg (p. ej., ARNsg) dirigen la nickasa a una secuencia diana e introducen una ruptura bicatenaria (DSB) que genera una mella en las hebras opuestas de la secuencia diana (es decir, doble mella). En algunas modalidades, el uso de doble mella puede mejorar la especificidad y reducir los efectos no deseados. En algunas modalidades, se usa un agente de unión a ADN guiado por ARN de nickasa junto con dos ARNg separados (por ejemplo, ARNsg) que se seleccionan muy próximos para producir una doble mella en el ADN diana.

[00958] En algunas modalidades, se usan proteínas Cas quiméricas, donde un dominio o región de la proteína se reemplaza por una porción de una proteína diferente. En algunas modalidades, un dominio de nucleasa Cas puede reemplazarse con un dominio de

una nucleasa diferente tal como Fok1. En algunas modalidades, una proteína Cas puede ser una nucleasa modificada.

[00959] En algunas modalidades, la nucleasa, por ejemplo, el agente de unión al ADN guiado por ARN, puede modificarse para inducir una mutación puntual o un cambio de base, por ejemplo, una desaminación.

[00960] En algunas modalidades, la proteína Cas comprende una proteína de fusión que comprende una nucleasa Cas (por ejemplo, Cas9), que es una nickasa o es catalíticamente inactiva, unida a un dominio funcional heterólogo. En algunas modalidades, la proteína Cas comprende una proteína de fusión que comprende una nucleasa Cas catalíticamente inactiva (por ejemplo, Cas9) unida a un dominio funcional heterólogo (ver, por ejemplo, WO2014152432). En algunas modalidades, la Cas9 catalíticamente inactiva proviene de *S. pyogenes*. En algunas modalidades, la Cas9 catalíticamente inactiva proviene de *N. meningitidis*. En algunas modalidades, la Cas catalíticamente inactiva comprende mutaciones que inactivan la Cas. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo es un dominio que modifica la expresión génica, histonas o ADN. En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo es un dominio de activación transcripcional o un dominio represor transcripcional. En algunas modalidades, la nucleasa es una nucleasa Cas catalíticamente inactiva, tal como dCas9.

[00961] En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo es una desaminasa, tal como una citidina desaminasa o una adenina desaminasa. En determinadas modalidades, el dominio funcional heterólogo es un convertidor de bases C a T (citidina desaminasa), tal como una enzima desaminasa de edición de ARNm de apolipoproteína B (APOBEC). Un dominio funcional heterólogo tal como una desaminasa puede ser parte de una proteína de fusión con una nucleasa Cas que tiene actividad nickasa o una nucleasa Cas que es catalíticamente inactiva.

[00962] En algunas modalidades, la secuencia diana puede ser adyacente a una PAM. En algunas modalidades, el PAM puede estar adyacente a o dentro de 1, 2, 3 o 4 nucleótidos del extremo 3' de la secuencia diana. La longitud y la secuencia de la PAM pueden depender de la proteína Cas utilizada. Por ejemplo, la PAM puede seleccionarse de un consenso o de una secuencia de PAM particular para una proteína Cas9 específica o un ortólogo de Cas9, incluidos los divulgados en la Figura 1 de Ran et ál., *Nature* 520:186-191 (2015). En algunas modalidades, la PAM puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud. Las secuencias PAM ejemplares no limitantes incluyen NCC,

NGG, NAG, NGA, NGAG, NGCG, NNGRRT, TTN, NGGNG, NG, NAAAAN, NNAAAAW, NNNNACA, GNNNCNNA y NNNNGATT (en las que N se define como cualquier nucleótido y W se define como como A o T, y R se define como A o G). En algunas modalidades, la secuencia PAM puede ser NGG. En algunas modalidades, la secuencia de PAM puede ser NGGNG. En algunas modalidades, la secuencia de PAM puede ser NNAAAAW.

[00963] Por ejemplo, la PAM puede seleccionarse de un consenso o de una secuencia de PAM particular para una proteína Nme Cas9 específica o un ortólogo de Nme Cas9 (Edraki et ál., *Mol. Cell* 73:714-726, 2019). En algunas modalidades, la PAM puede incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud. Las secuencias PAM ejemplares no limitantes incluyen NCC, N4GAYW, N4GYTT, N4GTCT, NNNNCC(a), NNNNCAAA, (en las que N se define como cualquier nucleótido, W se define como A o T, y R se define como A o G; y (a) es una A preferida, pero no obligatoria, después de la segunda C)). En algunas modalidades, la secuencia de PAM puede ser NCC.

[00964] En algunas modalidades, el dominio funcional heterólogo puede facilitar el transporte del agente de unión al ADN guiado por ARN al núcleo de una célula. Por ejemplo, el dominio funcional heterólogo puede ser una señal de localización nuclear (NLS). En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiado por ARN puede fusionarse con 1 a 10 NLS. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con 1 a 5 NLS. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con una NLS. Cuando se usa una NLS, la NLS puede fusionarse en el extremo N o en el extremo C de la secuencia del agente de unión al ADN guiado por ARN. También puede insertarse dentro de la secuencia del agente de unión al ADN guiado por ARN. En otras modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con más de una NLS. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con 2, 3, 4 o 5 NLS. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con dos NLS. En algunas modalidades, las NLS pueden fusionarse con el extremo N de la secuencia del agente de unión al ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, se pueden fusionar NLS solo al extremo N de la secuencia de agente de unión de ADN guiada por ARN. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiado por ARN puede no tener NLS insertada dentro de la secuencia del agente de unión a ADN guiado por ARN. En determinadas modalidades, puede no tener NLS de extremo C con respecto a la secuencia del agente de unión al ADN guiado por ARN.

[00965] En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con dos NLS. En determinadas circunstancias, los dos NLS pueden ser iguales (por ejemplo, dos NLS de SV40) o diferentes. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiado por ARN se fusiona con dos secuencias NLS (por ejemplo, SV40) en el extremo carboxi. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiado por ARN puede fusionarse con dos NLS, una en el extremo N y otra en el extremo C. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN puede fusionarse con 3 NLS. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiada por ARN no se fusiona con ninguna NLS. En algunas modalidades, la NLS puede ser una secuencia monopartita, tal como, por ejemplo, NLS de SV40, PKKKRKV (SEQ ID NO: 16) o PKKKRRV (SEQ ID NO: 17). En algunas modalidades, la NLS puede ser una secuencia bipartita, tal como la NLS de nucleoplasmina, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 18). En una modalidad específica, se puede fusionar una única NLS de PKKKRKV (SEQ ID NO: 19) en el extremo C del agente de unión a ADN guiado por ARN. Se incluyen opcionalmente uno o más enlazadores en el sitio de fusión.

[00966] En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiado por ARN comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 301 a 313 (como se muestra en la Tabla 5). En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiado por ARN comprende una secuencia con al menos un 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 301 a 313, 350 y 352 a 360. En algunas modalidades, cualquiera de los niveles de identidad anteriores es al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %.

[00967] En algunas modalidades, el ARNm que codifica el agente de unión a ADN guiado por ARN comprende una secuencia con al menos un 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 321 a 323, 361, 363 a 372 y 374 a 382 como se muestra en la Tabla 5.

## IV. MÉTODOS DE USO

[00968] En algunas modalidades, uno o más de los ARNg (p. ej., ARNsg, ARNdg o ARNcr), composiciones o formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento se utilizan en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto.

[00969] En algunas modalidades, la invención comprende un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto que comprende administrar uno cualquiera o más de los ARNg (por ejemplo, ARNsg, ARNdg o ARNcr), composiciones o formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento.

[00970] En algunas modalidades, la invención comprende un método o uso para modificar un ADN diana que comprende, administrar o entregar uno cualquiera o más de los ARNg (por ejemplo, ARNsg, ARNdg o ARNcr), composiciones o formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento.

[00971] En algunas modalidades, la invención comprende un método o uso para la modulación de un gen objetivo que comprende administrar o entregar cualesquiera uno o más de los ARNg (p. ej., ARNsg, ARNdg o ARNcr), composiciones o formulaciones farmacéuticas descritas en la presente. En algunas modalidades, la modulación es la edición del gen diana. En algunas modalidades, la modulación es un cambio en la expresión de la proteína codificada por el gen diana. Como se usa en el presente documento, una «edición del genoma» o «modificación genética» es un cambio a nivel del ADN, por ejemplo, inducido por un complejo ARNg/Cas. Una edición del genoma o modificación genética puede comprender una inserción, eliminación o sustitución (sustitución de bases, por ejemplo, C por T o mutación puntual), típicamente dentro de una secuencia definida o locus genómico. Una modificación genética cambia la secuencia de ácidos nucleicos del ADN. Una modificación genética puede realizarse en una única posición de nucleótido. Una modificación genética puede realizarse en múltiples nucleótidos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más nucleótidos, típicamente muy próximos entre sí, por ejemplo, nucleótidos contiguos.

[00972] En algunas modalidades, el método o uso da como resultado la edición de genomas. En algunas modalidades, el método o uso da como resultado una ruptura de doble cadena dentro del gen diana. En algunas modalidades, el método o uso da como resultado la formación de mutaciones indel durante la unión de extremos no homólogos de la DSB. En algunas modalidades, el método o uso da como resultado una inserción o eliminación de nucleótidos en un gen diana. En algunas modalidades, la inserción o eliminación de nucleótidos en un gen diana conduce a una mutación por desplazamiento del marco de lectura o un codón de parada prematuro que da como resultado una proteína no funcional. En algunas modalidades, la inserción o eliminación de nucleótidos en un gen diana conduce a una reducción o eliminación de la expresión del gen diana. En algunas

modalidades, el método o uso comprende la reparación dirigida por homología de una DSB. En algunas modalidades, el método o uso comprende además administrar a la célula una plantilla, en donde al menos una parte de la plantilla se incorpora a un ADN diana en o cerca de un sitio de ruptura de doble cadena inducida por la nucleasa. En algunas modalidades, el método o uso tiene como consecuencia una ruptura monocatenaria en el gen objetivo. En algunas modalidades, el método o uso da como resultado un cambio de base, por ejemplo, mediante desaminación, dentro del gen diana. La edición de genes normalmente ocurre dentro o adyacente a la porción del gen diana con la que la secuencia espaciadora forma un dúplex.

[00973] En algunas modalidades, el método o uso da como resultado la modulación genética. En algunas modalidades, la modulación genética es un aumento o disminución de la expresión génica, un cambio en el estado de metilación del ADN o una modificación de una subunidad de histona. En algunas modalidades, el método o uso da como resultado una expresión aumentada o disminuida de la proteína codificada por el gen diana.

[00974] La eficacia de los ARNg (p. ej., ARNsg, ARNdg o ARNcr) se puede probar *in vitro* e *in vivo*. En algunas modalidades, la invención comprende uno o más de los ARNg (por ejemplo, ARNsg, ARNdg o ARNcr), composiciones o formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento, en donde el ARNg da como resultado una modulación genética cuando se proporciona a una célula junto con una nucleasa Cas, por ejemplo, Cas9 o ARNm que codifica Cas9. En algunas modalidades, la eficacia del ARNg se puede medir *in vitro* o *in vivo*.

[00975] En algunas modalidades, la actividad de una RNP Cas que comprende un ARNg se compara con la actividad de una RNP Cas que comprende un ARNsg no modificado o un ARNsg de referencia que carece de modificaciones presentes en el ARNg, tal como uno o más conectores internos, regiones acortadas o sustituciones de sitios YA.

[00976] En algunas modalidades, la eficacia de un ARNg para aumentar o disminuir la expresión de la proteína diana se determina midiendo la cantidad de proteína diana.

[00977] En algunas modalidades, la eficacia de la edición con ARNg específicos está determinada por la edición presente en la ubicación diana en el genoma después de la administración de una nucleasa Cas y el ARNg. En algunas modalidades, la eficacia de la edición con ARNg específicos se mide mediante secuenciación de próxima generación. En algunas modalidades, se determina el porcentaje de edición de la región de interés diana. En algunas modalidades, el número total de lecturas de secuencia con alteraciones de

secuencia, por ejemplo, inserciones o eliminaciones (indeles), o cambios de bases sin inserción o eliminación, de nucleótidos en la región diana de interés sobre el número total de lecturas de secuencia se mide siguiendo la entrega de un ARNg y una nucleasa Cas.

[00978] En algunas modalidades, la eficacia de la edición con ARNg específicos se mide por la presencia de alteraciones de secuencia, por ejemplo, inserciones o eliminaciones, o sustitución de bases, o mutación puntual de nucleótidos introducida mediante una edición de genoma exitosa. En algunas modalidades, la actividad de una nucleasa Cas y ARNg se prueba en ensayos bioquímicos. En algunas modalidades, la actividad de una nucleasa Cas y ARNg se prueba en un ensayo de escisión libre de células. En algunas modalidades, la actividad de una nucleasa Cas y ARNg se prueba en células Neuro2A. En algunas modalidades, la actividad de una nucleasa Cas y ARNg se prueba en células primarias, por ejemplo, hepatocitos primarios.

[00979] En algunas modalidades, la actividad de los ARNg modificados se mide después de la dosificación *in vivo* de LNP que comprenden ARNg modificados y proteína Cas o ARNm que codifica la proteína Cas.

[00980] En algunas modalidades, la eficacia *in vivo* de un ARNg o una composición proporcionada en el presente documento se determina editando la eficacia medida en ADN extraído de tejido (por ejemplo, tejido hepático) después de la administración de ARNg y una nucleasa Cas.

[00981] En algunas modalidades, la activación de la respuesta inmunitaria del sujeto se mide mediante concentraciones séricas de citocina(s) después de la dosificación *in vivo* de ARNsg junto con ARNm o proteína de nucleasa Cas (por ejemplo, formulada en una LNP). En algunas modalidades, la citocina es interferón alfa (IFN-alfa), interleucina 6 (IL-6), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa).

[00982] En algunas modalidades, la administración de ARNm de RNP Cas o nucleasa Cas junto con el ARNg modificado (por ejemplo, ARNsg o ARNdg) produce concentraciones séricas más bajas de citocinas inmunitarias en comparación con la administración de ARNsg no modificado. En algunas modalidades, la invención comprende métodos que comprenden administrar cualquiera de los ARNg descritos en el presente documento a un sujeto, en donde el ARNg provoca una concentración más baja de citocinas inmunitarias en el suero del sujeto en comparación con un ARNg de control que no está modificado de manera similar.

## V. ENTREGA DE ARN GUÍA

[00983] En algunas modalidades, las composiciones de ARNg, las composiciones o las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento, solas o codificadas en uno o más vectores, se formulan o se administran a través de una nanopartícula lipídica; véase, por ejemplo, WO2017/173054, cuyo contenido se incorpora en el presente documento mediante esta referencia en su totalidad.

**Lípidos; formulación; entrega**

[00984] Se divulgan en el presente documento diversas modalidades que utilizan composiciones de ensamblaje de ácido nucleico lipídico que comprenden ácidos nucleicos o composiciones descritas en el presente documento. En algunas modalidades, la composición de ensamblaje de ácido nucleico lipídico comprende un ácido nucleico descrito en el presente documento (por ejemplo, un ARNg que comprende un conector interno).

[00985] Como se usa en el presente documento, una «composición de ensamblaje de ácido nucleico lipídico» se refiere a composiciones de administración basadas en lípidos, que incluyen nanopartículas lipídicas (LNP) y lipoplejos. LNP se refiere a nanopartículas lipídicas <100 nm. Las LNP se forman mezclando con precisión un componente lipídico (p. ej., en etanol) con un componente de ácido nucleico acuoso y los LNP son de tamaño uniforme. Los lipoplejos son partículas formadas mezclando en masa los componentes de lípidos y ácidos nucleicos y tienen un tamaño de entre aproximadamente 100 nm y 1 micra. En determinadas modalidades, los conjuntos de ácidos nucleicos lipídicos son LNP. Como se usa en el presente documento, un «ensamblaje de ácido nucleico lipídico» comprende una pluralidad (es decir, más de una) de moléculas lipídicas asociadas físicamente entre sí mediante fuerzas intermoleculares. Un conjunto de ácido nucleico lipídico puede comprender un lípido biodisponible que tiene un valor de pKa de <7,5 o <7. Los conjuntos de ácidos nucleicos lipídicos se forman mezclando una solución acuosa que contiene ácido nucleico con una solución lipídica basada en un disolvente orgánico, por ejemplo, etanol al 100 %. Las soluciones o solventes adecuados incluyen o pueden contener: agua, PBS, amortiguador Tris, NaCl, amortiguador de citrato, etanol, cloroformo, dietiléter, ciclohexano, tetrahidrofurano, metanol, isopropanol. Opcionalmente, un amortiguador farmacéuticamente aceptable puede estar comprendido en una formulación farmacéutica que comprende los conjuntos de ácidos nucleicos lipídicos, por ejemplo, para una terapia *ex vivo*. En algunas modalidades, la solución acuosa comprende un ARNg descrito en el

presente documento. En algunas modalidades, la solución acuosa comprende además un ARNm que codifica un agente de unión a ADN guiado por ARN, tal como Cas9.

[00986] Como se usa en el presente documento, nanopartícula lipídica (LNP) se refiere a una partícula que comprende una pluralidad de (es decir, más de una) moléculas lipídicas asociadas físicamente entre sí mediante fuerzas intermoleculares. Las LNP pueden ser, por ejemplo, microesferas (incluidas vesículas unilaminares y multilaminares, por ejemplo, «liposomas» (bicapas lipídicas de fase laminar que, en algunas modalidades, son sustancialmente esféricas) y, en modalidades más particulares, pueden comprender un núcleo acuoso, por ejemplo, que comprende una porción sustancial de moléculas de ARN), una fase dispersa en una emulsión, micelas o una fase interna en una suspensión. Las emulsiones, micelas y suspensiones pueden ser composiciones adecuadas para administración local y/o tópica. Véase también, por ejemplo, WO2017173054A1, cuyo contenido se incorpora en el presente documento mediante esta referencia en su totalidad. Cualquier LNP conocida por los expertos en la técnica como capaz de administrar nucleótidos a sujetos puede utilizarse con los ARN guía descritos en el presente documento.

[00987] En algunas modalidades, la solución acuosa comprende un ARNg descrito aquí. Una formulación farmacéutica que comprende la composición de ensamblaje de ácido nucleico lipídico puede comprender opcionalmente un amortiguador farmacéuticamente aceptable.

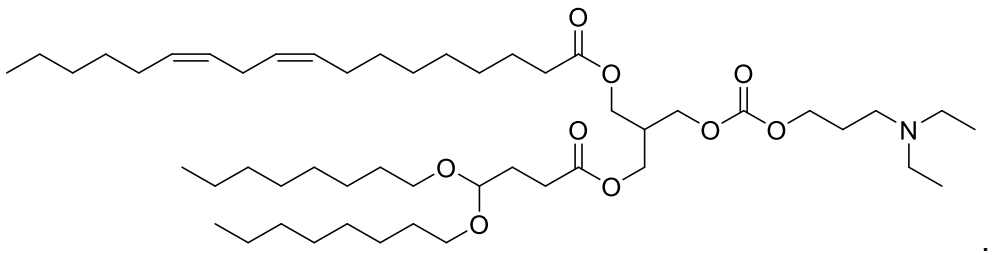
[00988] En algunas modalidades, las composiciones de ensamblaje de ácido nucleico lipídico incluyen un «lípido amina» (a veces descrito en el presente documento o en otro lugar como un «lípido ionizable» o un «lípido biodegradable»), junto con un «lípido auxiliar» opcional, un «lípido neutro» y un lípido oculto tal como un lípido de polietilenglicol. En algunas modalidades, los lípidos de amina o los lípidos ionizables son catiónicos dependiendo del pH.

***Lípidos de amina***

[00989] En algunas modalidades, las composiciones de ensamblaje de ácido nucleico lipídico comprenden un «lípido de amina», que es, por ejemplo, un lípido ionizable tal como el lípido A o sus equivalentes, incluidos análogos de acetal del lípido A.

[00990] En algunas modalidades, el lípido de amina es el lípido A, que es octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo, también llamado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-

dienoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo. El lípido A se puede representar como:



.

[00991] El lípido A se puede sintetizar según el documento WO2015/095340 (p. ej., págs. 84 a 86). En algunas modalidades, el lípido de amina es un equivalente al lípido A.

[00992] En algunas modalidades, un lípido de amina es un análogo del lípido A. En algunas modalidades, un análogo del lípido A es un análogo acetal del lípido A. En composiciones de ensamblaje de ácido nucleico lipídico particulares, el análogo acetal es un compuesto análogo de acetal C4-C12. En algunas modalidades, el análogo de acetal es un análogo de acetal C5-C12. En modalidades adicionales, el análogo de acetal es un análogo de acetal C5-C10. En modalidades adicionales, el análogo de acetal se elige entre un análogo de acetal C4, C5, C6, C7, C9, C10, C11 y C12.

[00993] Los lípidos de amina y otros «lípidos biodegradables» adecuados para su uso en los conjuntos de ácidos nucleicos lipídicos descritos en el presente documento son biodegradables *in vivo* o *ex vivo*. Los lípidos de amina tienen baja toxicidad (p. ej., se toleran en modelos animales sin efectos adversos en cantidades mayores o iguales a 10 mg/kg). En algunas modalidades, los ensamblajes de ácido nucleico lipídico que comprenden un lípido de amina incluyen aquellos en los que al menos el 75 % del lípido de amina se elimina del plasma o de la célula modificada en 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7 o 10 días. En algunas modalidades, los conjuntos de ácido nucleico lipídico que comprenden un lípido de amina incluyen aquellos en los que al menos el 50 % del ácido nucleico, p. ej., ARNm o ARNg, se elimina del plasma en 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7 o 10 días.ensamblajes En algunas modalidades, los ensamblajes de ácido nucleico lipídico que comprenden un lípido de amina incluyen aquellos en los que al menos el 50 % del conjunto de ácido nucleico lipídico se elimina del plasma en 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7 o 10 días, por ejemplo midiendo un lípido (p. ej., un lípido de amina), ácido nucleico, p. ej., ARN/ARNm u otro componente. En algunas modalidades, se mide el componente de ácido nucleico, ARN o lípido encapsulado en lípido frente a libre del conjunto de ácido nucleico lipídico.

[00994] Los lípidos biodegradables incluyen, por ejemplo, los lípidos biodegradables de los documentos WO/2020/219876, WO/2020/118041, WO/2020/072605, WO/2019/067992, WO/2017/173054, WO2015/095340 y WO2014/136086, y las LNP incluyen composiciones de LNP descritas en estos, cuyos lípidos y composiciones se incorporan en la presente mediante esta referencia.

[00995] El aclaramiento de lípidos se puede medir como se describe en la bibliografía. *Véase* Maier, MA, et ál. «Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics». *Mol. Ther.* 2013, 21(8), 1570-78 (*Maier*). Por ejemplo, en *Maier*, se administraron 0,3 mg/kg de sistemas LNP-ARNip que contienen ARNip dirigidos a luciferasas a ratones C57Bl/6 machos de seis a ocho semanas de edad mediante inyección intravenosa en bolo *a través de* la vena lateral de la cola. Se recogieron muestras de sangre, hígado y bazo 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 y 168 horas después de la dosis. Se perfundió a los ratones con solución salina antes de la recolección de tejido y se procesaron muestras de sangre para obtener plasma. Todas las muestras fueron procesadas y analizadas por LC-MS. Además, *Maier* describe un procedimiento para evaluar la toxicidad después de la administración de formulaciones de LNP-ARNip. Por ejemplo, se administraron 0, 1, 3, 5 y 10 mg/kg de un ARNip dirigido a luciferasa (5 animales/grupo) mediante una única inyección intravenosa en bolo en un volumen de dosis de 5 ml/kg a ratas Sprague-Dawley macho. Después de 24 horas, se obtuvo aproximadamente 1 ml de sangre de la vena yugular de animales conscientes y se aisló el suero. Tras 72 horas desde la dosis, todos los animales fueron sacrificados para una necropsia. Se realizaron evaluaciones de signos clínicos, peso corporal, química sérica, peso de órganos e histopatología. Aunque *Maier* describe métodos para evaluar formulaciones de ARNip-LNP, estos métodos pueden aplicarse para evaluar la eliminación, la farmacocinética y la toxicidad de la administración de composiciones de ensamblaje de ácido nucleico lipídico de la presente divulgación.

[00996] Son adecuados los lípidos ionizables y biodisponibles para la administración de ácidos nucleicos por LNP conocidos en la técnica. Los lípidos pueden ser ionizables dependiendo del pH del medio en el que se encuentran. Por ejemplo, en un medio ligeramente ácido, el lípido, como un lípido de amina, puede estar protonado y por tanto tener una carga positiva. Por el contrario, en un medio ligeramente básico, tal como, por ejemplo, sangre donde el pH es aproximadamente 7,35, el lípido, tal como un lípido de amina, puede no estar protonado y, por lo tanto, no llevar carga.

[00997] La capacidad de un lípido para soportar una carga está relacionada con su pKa intrínseco. En algunas modalidades, cada uno de los lípidos de amina de la presente divulgación puede tener, independientemente, un pKa en el intervalo de aproximadamente 5,1 a aproximadamente 7,4. En algunas modalidades, los lípidos biodisponibles de la presente divulgación pueden tener cada uno, independientemente, un pKa en el rango de aproximadamente 5,1 a aproximadamente 7,4, tal como de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,6, de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,4, de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2, o desde aproximadamente 5,8 hasta aproximadamente 6,5. Por ejemplo, cada uno de los lípidos de amina de la presente descripción pueden tener independientemente una pKa en el independientemente de alrededor de 5,8 a alrededor de 6,5. Los lípidos con un pKa que oscila entre aproximadamente 5,1 y aproximadamente 7,4 son eficaces para la administración de carga *in vivo*, p. ej., al hígado. Además, se ha descubierto que los lípidos con un pKa que oscila entre aproximadamente 5,3 y aproximadamente 6,4 son eficaces para su administración *in vivo*, p. ej., a tumores. Véase, por ejemplo, WO2014/136086.

***Lípidos adicionales***

[00998] Los «lípidos neutros» adecuados para su uso en una composición de ensamblaje de ácido nucleico lipídico de la divulgación incluyen, por ejemplo, una variedad de lípidos neutros, no cargados o zwitteriónicos. Los ejemplos de fosfolípidos neutros adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen, entre otros, 5-heptadecilbenceno-1,3-diol (resorcinol), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), pofosfocolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), fosfatidilcolina (PLPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), dilauriloilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 1-miristoil-2 -palmitoil fosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitoil-2-miristoil fosfatidilcolina (PMPC), 1-palmitoil-2-estearoil fosfatidilcolina (PSPC), 1,2-diaraquidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DBPC), 1- estearoil-2-palmitoil fosfatidilcolina (SPPC), 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC), palmitoiloleoil fosfatidilcolina (POPC), lisofosfatidilcolina, dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), dilinoleoilfosfatidilcolina distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), palmitoiloleoil fosfatidiletanolamina (POPE), lisofosfatidiletanolamina y combinaciones de estos. En una modalidad, el fosfolípido neutro se puede seleccionar del grupo que consiste

en distearoilfosfatidilcolina (DSPC) y dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE). En otra modalidad, el fosfolípido neutro puede ser distearoilfosfatidilcolina (DSPC).

[00999] Los «lípidos auxiliares» incluyen esteroides, esteroles y alquil resorcinoles. Los lípidos auxiliares adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen, entre otros, colesterol, 5-heptadecilresorcinol y hemisuccinato de colesterol. En una modalidad, el lípido auxiliar puede ser colesterol. En una modalidad, el lípido auxiliar puede ser hemisuccinato de colesterol.

[001000] Los «lípidos ocultos» son lípidos que alteran el tiempo que las nanopartículas pueden existir *in vivo* (p. ej., en la sangre). Los lípidos ocultos pueden ayudar en el proceso de formulación, por ejemplo, reduciendo la agregación de partículas y controlando el tamaño de las partículas. Los lípidos ocultos utilizados en este documento pueden modular las propiedades farmacocinéticas del ensamblaje de ácido nucleico lipídico o ayudar en la estabilidad de la nanopartícula *ex vivo*. Los lípidos ocultos adecuados para su uso en una composición de ensamblaje de ácido nucleico lipídico de la divulgación incluyen, entre otros, lípidos ocultos que tienen un grupo principal hidrófilo unido a un resto lipídico. Los lípidos ocultos adecuados para su uso en una composición de ensamblaje de ácido nucleico lipídico de la presente divulgación y la información sobre la bioquímica de dichos lípidos se pueden encontrar en Romberg et ál., *Pharmaceutical Research*, vol. 25, núm. 1, 2008, pág. 55-71 y Hoekstra et ál., *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52. Se describen lípidos de polietilenglicol adicionales adecuados, p. ej., en el documento WO 2006/007712.

[001001] En una modalidad, el grupo principal hidrófilo de lípido oculto comprende un resto polimérico seleccionado de polímeros basados en polietilenglicol. Los lípidos ocultos pueden comprender un resto lipídico. En algunas modalidades, el lípido oculto es un lípido con polietilenglicol.

[001002] En una modalidad, un lípido oculto comprende un resto polimérico seleccionado de polímeros basados en polietilenglicol (a veces denominado poli(óxido de etileno)), poli(oxazolina), poli(alcohol vinílico), poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poliaminoácidos y poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida].

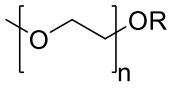
[001003] En una modalidad, el lípido con polietilenglicol comprende un resto polimérico basado en polietilenglicol (a veces denominado poli(óxido de etileno)).

[001004] El lípido con polietilenglicol comprende además un resto lipídico. En algunas modalidades, el resto lipídico puede derivarse de diacilglicerol o diacilglicamida, incluidos

aquellos que comprenden un grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida que tienen una longitud de cadena alquílica que comprende independientemente de alrededor de C4 a alrededor de C40 átomos de carbono saturados o insaturados, en donde la cadena puede comprender uno o más grupos funcionales como, por ejemplo, una amida o un éster. En algunas modalidades, la longitud de la cadena alquílica comprende aproximadamente C10 a C20. El grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida puede comprender además uno o más grupos alquilo sustituidos. Las longitudes de cadena pueden ser simétricas o asimétricas.

[001005] A menos que se indique lo contrario, el término «polietilenglicol», tal como se usa en el presente documento, significa cualquier polietilenglicol u otro polímero de éter de polialquileno. En una modalidad, el. polietilenglicol es un polímero lineal o ramificado opcionalmente sustituido con etilenglicol u óxido de etileno. En una modalidad, el polietilenglicol no está sustituido. En una modalidad, el polietilenglicol está sustituido, p. ej., con uno o más grupos alquilo, alcoxi, acilo, hidroxi o arilo. En una modalidad, el término incluye copolímeros de polietilenglicol tales como PEG-poliuretano o PEG-polipropileno (véase, por ejemplo, J. Milton Harris, *Poly(etilenglicol) chemistry: biotechnical and biomedical apps* (1992)); en otra modalidad, el término no incluye copolímeros de polietilenglicol. En una modalidad, el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 130 a aproximadamente 50 000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 30 000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 20 000, en una submodalidad de aproximadamente 150 a aproximadamente 15 000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 10 000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 6000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 5000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 4000, en una submodalidad, de aproximadamente 150 a aproximadamente 3000, en una submodalidad, de aproximadamente 300 a aproximadamente 3000, en una submodalidad, de aproximadamente 1000 a aproximadamente 3000, y en una submodalidad, de aproximadamente 1500 a aproximadamente 2500.

[001006] En algunas modalidades, el polietilenglicol (por ejemplo, conjugado con un resto lipídico o lípido, tal como un lípido oculto), es un «PEG-2K», también denominado «PEG2k» o «PEG 2000», que tiene un peso molecular promedio de unos 2000 dalton. PEG-2K se representa en el presente documento mediante la siguiente fórmula (I), en

donde n es 45, lo que significa que el grado de polimerización promediado en número comprende aproximadamente 45 subunidades  (I). Sin embargo, se pueden usar otras modalidades de polietilenglicol conocidas en la técnica, incluidas, *por ejemplo*, aquellas en las que el grado de polimerización promediado en número comprende aproximadamente 23 subunidades (n=23) y/o 68 subunidades (n=68). En algunas modalidades, n puede oscilar entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60. En una modalidad, n puede variar de alrededor de 35 a alrededor de 55. En algunas modalidades, n puede variar de alrededor de 40 a alrededor de 50. En algunas modalidades, n puede variar de alrededor de 42 a alrededor de 48. En algunas modalidades, n puede ser 45. En algunas modalidades, R puede seleccionarse de H, alquilo sustituido y alquilo no sustituido. En algunas modalidades, R puede ser alquilo no sustituido. En algunas modalidades, R puede ser metilo.

[001007] En cualquiera de las modalidades descritas en el presente documento, el lípido PEG se puede seleccionar entre PEG-dilauroilglicerol, PEG-dimiristoilglicerol (PEG-DMG) (p. ej., 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metilpolioxietilenglicol 2000 (PEG2k-DMG) o PEG-DMG (n.º de catálogo GM-020 de NOF, Tokio, Japón)), PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-diestearoilglicerol (PEG-DSPE) (n.º de catálogo DSPE-020CN, NOF, Tokio, Japón), PEG-dilaurilglicerol, PEG-dimiristilglucamida, PEG-dipalmitoilglucamida y PEG-diestearoilglucamida, PEG-colesterol (1-[8'-(Colest-5-en-3[beta]-oxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil-[omega]-metil-poli(etilenglicol), PEG-DMB (éter de 3,4-ditetradecoxibencil-[omega]-metil-poli(etilenglicol), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N- [metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DMG) (n.° de cat. 880150P de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EE.UU.), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi( polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DSPE) (n.º de cat. 880120C de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EE.UU.), 1,2-diestearoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol (PEG2k-DSG; GS-020, NOF Tokio, Japón), poli(etilenglicol)-2000-dimetacrilato (PEG2k-DMA) y 1,2-diestеariloxipropil-3-amina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k- DSA). En una modalidad, el lípido con polietilenglicol puede ser 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metilpolioxietilenglicol 2000 (PEG2k-DMG). En una modalidad, el lípido con polietilenglicol puede ser PEG2k-DMG. En algunas modalidades, el lípido con polietilenglicol puede ser PEG2k-DSG. En una modalidad, el lípido pegilado puede ser PEG2k-DSPE. En una modalidad, el lípido pegilado puede ser PEG2k-DMA. En una

modalidad, el lípido de PEG puede ser PEG2k-C-DMA. En una modalidad, el lípido con polietilenglicol puede ser el compuesto S027, divulgado en el documento WO2016/010840 (párrafos [00240] a [00244]). En una modalidad, el lípido pegilado puede ser PEG2k-DSA. En una modalidad, el lípido pegilado puede ser PEG2k-C11. En algunas modalidades, el lípido pegilado puede ser PEG2k-C14. En algunas modalidades, el lípido pegilado puede ser PEG2k-C16. En algunas modalidades, el lípido pegilado puede ser PEG2k-C18.

**Entrega de LNP de ARNg**

[001008] Las nanopartículas lipídicas (LNP) son un medio conocido para la administración de carga de nucleótidos y proteínas, y pueden usarse para la administración de ARNg (p. ej., ARNsg, ARNdg o ARNcr), composiciones o formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En algunas modalidades, las LNP administran ácido nucleico, proteína o ácido nucleico junto con proteína. Como se usa en el presente documento, nanopartícula lipídica (LNP) se refiere a una partícula que comprende una pluralidad de (es decir, más de una) moléculas lipídicas asociadas físicamente entre sí mediante fuerzas intermoleculares. Las LNP pueden ser, por ejemplo, microesferas (que incluyen vesículas unilamelares y multilamelares, por ejemplo, «liposomas», capas dobles de lípidos en fase lamelar que, en algunas modalidades, son sustancialmente esféricas y, en modalidades más particulares, pueden comprender un núcleo acuoso, por ejemplo, que comprende una parte sustancial de moléculas de ARN), una fase dispersa en una emulsión, micelas o una fase interna en una suspensión (vea, p. ej., WO2017173054, cuyo contenido se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad). Puede utilizarse cualquier LNP conocida por los expertos en la técnica como capaz de administrar nucleótidos a los sujetos.

[001009] En algunas modalidades, la invención comprende un método para administrar cualquiera de los ARNg (p. ej., ARNsg, ARNdg o ARNcr) descritos en el presente documento a un sujeto, en donde el ARNg está asociado con una LNP. En algunas modalidades, el ARNg/LNP también está asociado con una nucleasa Cas o un polinucleótido (por ejemplo, ARNm o ADN) que codifica una nucleasa Cas.

[001010] En algunas modalidades, la invención comprende una composición que comprende cualquiera de los ARNg divulgados y una LNP. En algunas modalidades, la composición comprende además una Cas9 o un polinucleótido (por ejemplo, ARNm o ADN) que codifica Cas9.

[001011] En algunas modalidades, se proporciona en el presente documento un método para administrar cualquiera de los ARN guía descritos en el presente documento a una célula o una población de células o un sujeto, incluyendo a una célula o población de células en un sujeto *in vivo*, en donde uno o más de los componentes están asociados con una LNP. En algunas modalidades, el método comprende además un agente de unión a ADN guiado por ARN (por ejemplo, Cas9 o un polinucleótido (por ejemplo, ARNm o ADN) que codifica Cas9).

[001012] En algunas modalidades, en el presente documento se proporciona una composición que comprende cualquiera de los ARN guía descritos en el presente documento o la construcción donante divulgada en el presente documento, solo o en combinación, con una LNP. En algunas modalidades, la composición comprende también un agente de unión a ADN guiado por ARN (por ejemplo, Cas9 o un polinucleótido (p. ej., ARNm o ADN) que codifica Cas9).

[001013] En algunas modalidades, las LNP comprenden lípidos catiónicos. En algunas modalidades, las LNP comprenden octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo, también llamado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo. En algunas modalidades, las LNP comprenden relaciones molares de un lípido de amina catiónico a ARN fosfato (N:P) de aproximadamente 4,5. En algunas modalidades, las LNP comprenden 8-((7,7-bis(octiloxi)heptil)(2-hidroxietil)amino)octanoato de nonilo. En algunas modalidades, las LNP comprenden relaciones molares de un lípido de amina catiónico a ARN fosfato (N:P) de aproximadamente 4,5 a 6,5. En algunas modalidades, las LNP comprenden relaciones molares de un lípido de amina catiónico a ARN fosfato (N:P) de aproximadamente 4,5. En algunas modalidades, las LNP comprenden relaciones molares de una amina lipídica catiónica con respecto a fosfato de ARN (N:P) de alrededor de 6,0.

[001014] En algunas modalidades, las LNP asociadas con los ARNg divulgados en el presente documento se utilizan en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno.

[001015] La electroporación es un medio conocido para la entrega de carga y se puede usar cualquier metodología de electroporación para la entrega de cualquiera de los ARNg descritos en el presente documento. En algunas modalidades, se puede usar

electroporación para administrar cualquiera de los ARNg descritos en el presente documento y Cas9 o un polinucleótido (por ejemplo, ARNm o ADN) que codifica Cas9.

[001016] En algunas modalidades, la invención comprende un método para administrar cualquiera de los ARNg descritos en el presente documento a una célula ex vivo, en donde el ARNg está asociado con una LNP o no está asociado con una LNP. En algunas modalidades, el ARNg/LNP o ARNg también está asociado con una Cas9 o un polinucleótido (por ejemplo, ARNm o ADN) que codifica Cas9. Véase, por ejemplo, WO2021222287, incorporado en el presente documento mediante esta referencia.

[001017] En algunas modalidades, el vector comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un ARNm que codifica una ADN nucleasa guiada por ARN, que puede ser una nucleasa Cas, tal como Cas9 o Cpf1. En algunas modalidades, el vector comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un ARNcr, un ARNtr y un ARNm que codifica una nucleasa de ADN guiada por ARN, que puede ser una proteína Cas, tal como Cas9. En una modalidad, el Cas9 es de Spy Cas9 o NmeCas9. En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica el ARNcr, ARNtr o ARNcr y ARNtr (que puede ser un ARNsg) comprende o consiste en una secuencia guía flanqueada por toda o una parte de una secuencia repetida de un sistema CRISPR/Cas de origen natural. El ácido nucleico que comprende o consiste en ARNcr, ARNtr o ARNcr y ARNtr puede comprender además una secuencia de vector en donde la secuencia de vector comprende o consiste en ácidos nucleicos que no se encuentran naturalmente junto con ARNcr, ARNtr o ARNcr y ARNtr.

[001018] En algunas modalidades, los componentes pueden introducirse como ácido nucleico desnudo, como ácido nucleico en complejo con un agente tal como un liposoma o poloxámero, o pueden administrarse mediante vectores virales (por ejemplo, adenovirus, AAV, herpesvirus, retrovirus, lentivirus). Los métodos y composiciones para la administración no viral de ácidos nucleicos incluyen electroporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, LNP, polication o conjugados de lípido:ácido nucleico, ácido nucleico desnudo (por ejemplo, ADN/ARN desnudo), viriones artificiales. y absorción de ADN mejorada por agentes. También se puede utilizar la sonoporación utilizando, por ejemplo, el sistema Sonitron 2000 (Rich-Mar) para la administración de ácidos nucleicos.

***

[001019] Esta descripción y modalidades ejemplares no deben tomarse como limitativas. Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades, porcentajes o proporciones, y otros valores numéricos utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, deben entenderse modificados en todos los casos por «alrededor de» o «aproximadamente», en la medida en que no estén ya modificados así.

**Tabla 5. Tabla de secuencias**

| Descripción | SEQ ID NO: | Secuencia |
|---|---|---|
| Secuencia de aminoácidos de SpyCas9 | 301 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNE<br>MAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS<br>DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD<br>TYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGY<br>AGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPY<br>YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKP<br>AFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDR<br>EMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQG<br>DSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQL<br>QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLIT<br>QRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYH<br>HAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV<br>WDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSV<br>KELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPE<br>DNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKE<br>VLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV |
| secuencia de aminoácidos de SauCas9 | 302 | MALEAPKKKRKVGSDYKDDDDKKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRV<br>KKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLE<br>RLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEE<br>LRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDI<br>TARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVD |

| | | |
|---|---|---|
| | | LSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKI<br>KLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAK<br>GKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHH<br>AEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTR<br>KDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIK<br>YYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYNND<br>LIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG |
| Secuencia de aminoácidos de CdiCas9 | 303 | MKYHVGIDVGTFSVGLAAIEVDDAGMPIKTLSLVSHIHDSGLDPDKIKSAVTRLASSGIARRTRRLYRRKRRRLQQLDKFIQRQGWPVI<br>ELEDYSDPLYPWKVRAELAASYIADEKERGEKLSVALRHIARHRGWRNPYAKVSSLYLPDEPSDAFKAIREEIKRASGQPVPETATVG<br>QMVTLCELGTLKLRGEGGVLSARLQQSDHAREIQEICRMQEIGQELYRKIIDVVFAAESPKGSASSRVGKDPLQPGKNRALKASDAF<br>QRYRIAALIGNLRVRVDGEKRILSVEEKNLVFDHLVNLAPKKEPEWVTIAEILGIDRGQLIGTATMTDDGERAGARPPTHDTNRSIVNSR<br>IAPLVDWWKTASALEQHAMVKALSNAEVDDFDSPEGAKVQAFFADLDDDVHAKLDSLHLPVGRAAYSEDTLVRLTRRMLADGVDLY<br>TARLQEFGIEPSWTPPAPRIGEPVGNPAVDRVLKTVSRWLESATKTWGAPERVIIEHVREGFVTEKRARAREMDGDMRRRAARNAKLF<br>QEMQEKLNVQGKPSRADLWRYQSVQRQNCQCAYCGSPITFSNSEMDHIVPRAGQGSTNTRENLVAVCHRCNQSKGNTPFAIWAK<br>NTSIEGVSVKEAVERTRHWVTDTGMRSTDFKKFTKAVVERFQRATMDEEIDARSMESVAWMANELRSRVAQHFASHGTTVRVYRG<br>SLTAEARRASGISGKLEFLDGVGKSRLDRRHHAIDAAVIAFTSDYVAETLAVRSNLKQSQAHRQEAPQWREFTGKDAEHRAAWRVW<br>CQKMEKLSALLTEDLRDDRVVVMSNVRLRLGNGSAHEETIGKLSKVKLGSQLSVSDIDKASSEALWCALTREPDFDPKDGLPANPER<br>HIRVNGTHVYAGDNIGLFPVSAGSIALRGGYA<br>ELGSSFHHARVYKITSGKKPAFAMLRVYTIDLLPYRNQDLFSVELKPQTMSMRQAEKKLRDALATGNAEYLGWLVVDDELVVDTSKIA<br>TDQVKAVEAELGTIRRWRVDGFFGDTRLRLRPLQMSKEGIKKESAPELSKIIDRPGWLPAVNKLFSEGNVTVVRRDSLGRVRLESTA<br>HLPVTWKVQPKKKRKV |
| secuencia de aminoácidos de St1Cas9 | 304 | MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQGRRLTRRKK<br>HRIVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFIALKNMVKHRGISY<br>LDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLERYQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRL<br>INVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEFINRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGR |

| | | |
|---|---|---|
| | | YRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEFRAAKASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQ<br>KNQIINYVKNEKAMGPAKLFKYIAKLLSCDVADIKEYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLE<br>TLDIEQMDRETLDKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIF<br>GKGWHNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIYNP<br>VVAKSVRQAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKANKDEKDAAMLK<br>AANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYTGKTISIHDLINNSNQFEVDHI<br>LPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKK<br>KEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLVDTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTS<br>QLRRHWGIEKTRDTYHHHAVDALIIAASIQLNLWKKQKNTLVSYSEDQLLDIETGELISD<br>DEYKESVFKAPYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYATRQAKVGKDKA<br>DETYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPNKQINE<br>KGKEVPVNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLGNHIDITPKDSNNKVVLQ<br>SVSPWRADVYFNKTTGKYEILGLKYADLQFEKGTGTYKISQEKYNDIKKKEGVDSDSEFK<br>FTLYKNDLLLVKDTETKEQQLFRFLSRTMPKQKHYVELKPYDKQKFEGGEALIKVLGNVA<br>NSGQCKKGLGKSNISIYKVRTDVLGNQHIIKNEGDKPKLDF |
| | 305 | No se utiliza |
| Secuencia de aminoácidos AceCas9 | 306 | MSLQLIIKGVEYGRGADPTMGGSEVGTVPVTWRLGVDVGERSIGLAAVSYEEDKPKEILA<br>AVSWIHDGGVGDERSGASRLALRGMARRARRLRRFRRARLRDLDMLLSELGWTPLPDKNV<br>SPVDAWLARKRLAEEYVVDETERRRLLGYAVSHMARHRGWRNPWTTIKDLKNLPQPSDSW<br>ERTRESLEARYSVSLEPGTVGQWAGYLLQRAPGIRLNPTQQSAGRRAELSNATAFETRLR<br>QEDVLWELRCIADVQGLPEDVVSNVIDAVFCQKRPSVPAERIGRDPLDPSQLRASRACLE<br>FQEYRIVAAVANLRIRDGSGSRPLSLEERNAVIEALLAQTERSLTWSDIALEILKLPNES<br>DLTSVPEEDGPSSLAYSQFAPFDETSARIAEFIAKNRRKIPTFAQWWQEQDRTSRSDLVA<br>ADNSIAGEEEQELLVHLPDAELEALEGLALPSGRVAYSRLTLSGLTRVMRDDGVDVHNAR<br>KTCFGVDDNWRPPLPALHEATGHPVVDRNLAILRKFLSSATMRWGPPQSIVVELARGASE |

| | | |
|---|---|---|
| | | SRERQAEEEAARRAHRKANDRIRAELRASGLSDPSPADLVRARLLELYDCHCMYCGAPIS<br>WENSELDHIVPRTDGGSNRHENLAITCGACNKEKGRRPFASWAETSNRVQLRDVIDRVQK<br>LKYSGNMYWTRDEFSRYKKSVVARLKRRTSDPEVIQSIESTGYAAVALRDRLLSYGEKNG<br>VAQVAVFRGGVTAEARRWLDISIERLFSRVAIFAQSTSTKRLDRRHHAVDAVVLTTLTPG<br>VAKTLADARSRRVSAEFWRRPSDVNRHSTEEPQSPAYRQWKESCSGLGDLLISTAARDSI<br>AVAAPLRLRPTGALHEETLRAFSEHTVGAAWKGAELRRIVEPEVYAAFLALTDPGGRFLK<br>VSPSEDVLPADENRHIVLSDRVLGPRDRVKLFPDDRGSIRVRGGAAYIASFHHARVFRWG<br>SSHSPSFALLRVSLADLAVAGLLRDGVDVFTAELPPWTPAWRYASIALVKAVESGDAKQV<br>GWLVPGDELDFGPEGVTTAAGDLSMFLKYFPERHWVVTGFEDDKRINLKPAFLSAEQAEV<br>LRTERSDRPDTLTEAGEILAQFFPRCWRATVAKVLCHPGLTVIRRTALGQPRWRRGHLPY<br>SWRPWSADPWSGGTP |
| secuencia de aminoácidos de CjeCas9 | 307 | MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKAENPKTGESLALPRRLARSARKRLAR<br>RKARLNHLKHLIANEFKLNYEDYQSFDESLAKAYKGSLISPYELRFRALNELLSKQDFAR<br>VILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYQSVGEYLYKEYFQKFKENSKE<br>FTNVRNKKESYERCIAQSFLKDELKLIFKKQREFGFSFSKKFEEEVLSVAFYKRALKDFS<br>HLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRIINLLNNLKNTEGILYTKDDLNALLNEVLK<br>NGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKGTYFIEFKKYKEFIKALGDHSLSQDDLNEIAKDIT<br>LIKDEIKLKKALAKYDLNQNQIDSLSKLEFKDHLNISFKALKLITPLMLEGKKYDEACNE<br>LNLKVAINEDKKDFLPAFNETYYKDEVTNPVVLRAIKEYRKVLNALLKKYGKVHKINIEL<br>AREVGKNYSQRAKIEKEQNENYKAKKDAELECEKLGLKINSKNILKLRLFKEQKEFCAYS<br>GEKIKISDLQDEKMLEIDHIYPYSRSFDDSYMNKVLVFTKQNQEKLNQTPFEAFGNDSAK<br>WQKIEVLAKNLPTKKQKRILDKNYKDKEQKDFKDRNLNDTRYIARLVLNYTKDYLDFLPL<br>SDDENTKLNDTQKGSKVHVEAKSGMLTSALRHTWGFSAKDRNNHLHHAIDAVIIAYANNS<br>IVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELDYKNKRKFFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPER<br>KKPSGALHEETFRKEEEFYQSYGGKEGVLKALELGKIRKVNGKIVKNGDMFRVDIFKHKK |

| | | |
|---|---|---|
| | | TNKFYAVPIYTMDFALKVLPNKAVARSKKGEIKDWILMDENYEFCFSLYKDSLILIQTKD<br>MQEPEFVYYNAFTSSTVSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKVF<br>EKYIVSALGEVTKAEFRQREDFKK |
| secuencia de aminoácidos de FnoCas9 | 308 | MNFKILPIAIDLGVKNTGVFSAFYQKGTSLERLDNKNGKVYELSKDSYTLLMNNRTARRH<br>QRRGIDRKQLVKRLFKLIWTEQLNLEWDKDTQQAISFLFNRRGFSFITDGYSPEYLNIVP<br>EQVKAILMDIFDDYNGEDDLDSYLKLATEQESKISEIYNKLMQKILEFKLMKLCTDIKDD<br>KVSTKTLKEITSYEFELLADYLANYSESLKTQKFSYTDKQGNLKELSYYHHDKYNIQEFL<br>KRHATINDRILDTLLTDDLDIWNFNFEKFDFDKNEEKLQNQEDKDHIQAHLHHFVFAVNK<br>IKSEMASGGRHRSQYFQEITNVLDENNHQEGYLKNFCENLHNKKYSNLSVKNLVNLIGNL<br>SNLELKPLRKYFNDKIHAKADHWDEQKFTETYCHWILGEWRVGVKDQDKKDGAKYSYKDL<br>CNELKQKVTKAGLVDFLLELDPCRTIPPYLDNNNRKPPKCQSLILNPKFLDNQYPNWQQY<br>LQELKKLQSIQNYLDSFETDLKVLKSSKDQPYFVEYKSSNQQIASGQRDYKDLDARILQF<br>IFDRVKASDELLLNEIYFQAKKLKQKASSELEKLESSKKLDEVIANSQLSQILKSQHTNG<br>IFEQGTFLHLVCKYYKQRQRARDSRLYIMPEYRYDKKLHKYNNTGRFDDDNQLLTYCNHK<br>PRQKRYQLLNDLAGVLQVSPNFLKDKIGSDDDLFISKWLVEHIRGFKKACEDSLKIQKDN<br>RGLLNHKINIARNTKGKCEKEIFNLICKIEGSEDKKGNYKHGLAYELGVLLFGEPNEASK<br>PEFDRKIKKFNSIYSFAQIQQIAFAERKGNANTCAVCSADNAHRMQQIKITEPVEDNKDK<br>IILSAKAQRLPAIPTRIVDGAVKKMATILAKNIVDDNWQNIKQVLSAKHQLHIPIITESN<br>AFEFEPALADVKGKSLKDRRKKALERISPENIFKDKNNRIKEFAKGISAYSGANLTDGDF<br>DGAKEELDHIIPRSHKKYGTLNDEANLICVTRGDNKNKGNRIFCLRDLADNYKLKQFETT<br>DDLEIEKKIADTIWDANKKDFKFGNYRSFINLTPQEQKAFRHALFLADENPIKQAVIRAI<br>NNRNRTFVNGTQRYFAEVLANNIYLRAKKENLNTDKISFDYFGIPTIGNGRGIAEIRQLY<br>EKVDSDIQAYAKGDKPQASYSHLIDAMLAFCIAADEHRNDGSIGLEIDKNYSLYPLDKNT<br>GEVFTKDIFSQIKITDNEFSDKKLVRKKAIEGFNTHRQMTRDGIYAENYLPILIHKELNE<br>VRKGYTWKNSEEIKIFKGKKYDIQQLNNLVYCLKFVDKPISIDIQISTLEELRNILTTNN |

| | | |
|---|---|---|
| | | IAATAEYYYINLKTQKLHEYYIENYNTALGYKKYSKEMEFLRSLAYRSERVKIKSIDDVK<br>QVLDKDSNFIIGKITLPFKKEWQRLYREWQNTTIKDDYEFLKSFFNVKSITKLHKKVRKD<br>FSLPISTNEGKFLVKRKTWDNNFIYQILNDSDSRVDGTKPFIPAFDISKNEIVEAIIDSF<br>TSKNIFWLPKNIELQKVDNKNIFAIDTSKWFEVETPSDLRDIGVATIQYKIDNNSRPKVR<br>VKLDYVIDDDSKINYFTNHSLLKSRYPDKVLEILKQSTTIEFESSGFNKTIKEMLGMTLA<br>GIYNETSNN |
| Secuencia de aminoácidos AsCpf1 | 309 | MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKT<br>YADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDA<br>INKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVF<br>SAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEV<br>FSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPH<br>RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSID<br>LTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINL<br>QEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHL<br>LDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTL<br>ASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPD<br>AAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYA<br>KKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYH<br>ISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIK<br>LNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSD<br>EARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHP<br>ETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSV<br>VGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLI<br>DKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFV<br>DPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVF |

| | | |
|---|---|---|
| | | EKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNIL<br>PKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPM<br>DADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN |
| Secuencia de aminoácidos EsCas13d | 310 | MAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAM<br>ARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDR<br>KLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAEL<br>ALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLM<br>TQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDT<br>ERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRAL<br>EKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKF<br>VQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRA<br>LSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREY<br>FPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSF<br>NNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDED<br>GFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAEND<br>RHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFA<br>QEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSG<br>AHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYG<br>GNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKV<br>DKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVE<br>FAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPP<br>VR |
| secuencia de aminoácidos de RruCas9 | 311 | MRPIEPWILGLDIGTDSLGWAVFSCEEKGPPTAKELLGGGVRLFDSGRDAKDHTSRQAER<br>GAFRRARRQTRTWPWRRDRLIALFQAAGLTPPAAETRQIALALRREAVSRPLAPDALWAA<br>LLHLAHHRGFRSNRIDKRERAAAKALAKAKPAKATAKATAPAKEADDEAGFWEGAEAALR |

| | | |
|---|---|---|
| | | QRMAASGAPTVGALLADDLDRGQPVRMRYNQSDRDGVVAPTRALIAEELAEIVARQSSAY<br>PGLDWPAVTRLVLDQRPLRSKGAGPCAFLPGEDRALRALPTVQDFIIRQTLANLRLPSTS<br>ADEPRPLTDEEHAKALALLSTARFVEWPALRRALGLKRGVKFTAETERNGAKQAARGTAG<br>NLTEAILAPLIPGWSGWDLDRKDRVFSDLWAARQDRSALLALIGDPRGPTRVTEDETAEA<br>VADAIQIVLPTGRASLSAKAARAIAQAMAPGIGYDEAVTLALGLHHSHRPRQERLARLPY<br>YAAALPDVGLDGDPVGPPPAEDDGAAAEAYYGRIGNISVHIALNETRKIVNALLHRHGPI<br>LRLVMVETTRELKAGADERKRMIAEQAERERENAEIDVELRKSDRWMANARERRQRVRLA<br>RRQNNLCPYTSTPIGHADLLGDAYDIDHVIPLARGGRDSLDNMVLCQSDANKTKGDKTPW<br>EAFHDKPGWIAQRDDFLARLDPQTAKALAWRFADDAGERVARKSAEDEDQGFLPRQLTDT<br>GYIARVALRYLSLVTNEPNAVVATNGRLTGLLRLAWDITPGPAPRDLLPTPRDALRDDTA<br>ARRFLDGLTPPPLAKAVEGAVQARLAALGRSRVADAGLADALGLTLASLGGGGKNRADHR<br>HHFIDAAMIAVTTRGLINQINQASGAGRILDLRKWPRTNFEPPYPTFRAEVMKQWDHIHP<br>SIRPAHRDGGSLHAATVFGVRNRPDARVLVQRKPVEKLFLDANAKPLPADKIAEIIDGFA<br>SPRMAKRFKALLARYQAAHPEVPPALAALAVARDPAFGPRGMTANTVIAGRSDGDGEDAG<br>LITPFRANPKAAVRTMGNAVYEVWEIQVKGRPRWTHRVLTRFDRTQPAPPPPPENARLVM<br>RLRRGDLVYWPLESGDRLFLVKKMAVDGRLALWPARLATGKATALYAQLSCPNINLNGDQ<br>GYCVQSAEGIRKEKIRTTSCTALGRLRLSKKAT |
| secuencia de aminoácidos de RpaCas9 | 312 | MLERHPQRYRLGLDLGSNSLGWFVTNLQQRGDRFEPVGLGPGGVRIFPDGRDPQSKASNA<br>VDRRMARGARKRRDRFVQRRSQLMDALVRHGLMPEEAAARKALAGLDPYQLRARALVDRL<br>PAHHVGRALFHLNQRRGFLSNRKTDNKKNSEDGAIKQAASRLRDSMASQGAETLGEFFAG<br>RRHSDTYAERQTAIRAELQRIGKDHLTGNARKKAWAKVRKRLFGDDVLDPAMAPEGVRAR<br>AIITGTKASYDFYPTRDLLLQEFHAIWRAQAPHHSTMTESACREIERIIFYQRPLKDPIV<br>GKCSLDPATRPFKEDPEGYRAPWAHPLAQRFRILSEARNLEIRETGRGSRKLTKAQSDVV<br>ALALLGSKEVKFDKLRTLLKLPAESKFNLESDRRAALDGDATAARLSDKNGFGKAWRGFP<br>LERQVAIVERLMTVEVEAELVDWLEQECGLGPEAAARVANTSLPEGHCRLGLRAIKKIVP |

| | | |
|---|---|---|
| | | VMQNEVGDDGVSGAGYYEAAKRIGYDHAKLPTGGDLDYLPYYGKWLADAVVGSGDARDGK<br>ERQFGQFPNPTVHIGLGQLRRLVNELIRAYGPPTEISIEFTRALRLSEDQKAQVQREQRK<br>NQDRNRARAAELEQLGFPANPRNLLKMRLWEELNLRDPLDRKCVYTGEQISIERLLSEEV<br>DIDHILPVAMTLDDSAANKIVCMRYANRHKRKQTPFEAFGSSPLVQGRRYAWDDIATRAA<br>ALPRNKRWRFDADAREQFDKRGGFLARQLNETGWLARLAKEYLGAVTDPNRIWVVPGRLT<br>GLLRGKWGLNALLPDHNYAGVQDKAEAFLASTDDMEFSGVKNRADHRHHAIDGLVAALTD<br>RSLLWKMANAYDDEREKFVVELPWPTMRDDLKAALDKMVVSHKPDHGVQGKLHEDSAYGL<br>LDRPEPVEDDDREPANLVYRKAVETLSENEIGRIRDRRLRDLVRDHVDAAKRNGVALADA<br>LRQLTEPSDNPHFRHGLRHVRLLKKEKTDYLVPVVDRATGRPYKAYSAGENFCVEVFETA<br>DGKWSGEAVRRFDANRSNCGPKTPHVPRWRTESAGARLVMRIHKGDLIRLEHEGRTRIMV<br>VHRLDAAAGRFKLAAHNETGNLDKRHATDNDIDPFRWLMASYGTLKKMAAVPVRVDELGR<br>VWRIDPR |
| secuencia de aminoácidos de AnaCas9 | 313 | MWYASLMSAHHLRVGIDVGTHSVGLATLRVDDHGTPIELLSALSHIHDSGVGKEGKKDHD<br>TRKKLSGIARRARRLLHHRRTQLQQLDEVLRDLGFPIPTPGEFLDLNEQTDPYRVWRVRA<br>RLVEEKLPEELRGPAISMAVRHIARHRGWRNPYSKVESLLSPAEESPFMKALRERILATT<br>GEVLDDGITPGQAMAQVALTHNISMRGPEGILGKLHQSDNANEIRKICARQGVSPDVCKQ<br>LLRAVFKADSPRGSAVSRVAPDPLPGQGSFRRAPKCDPEFQRFRIISIVANLRISETKGE<br>NRPLTADERRHVVTFLTEDSQADLTWVDVAEKLGVHRRDLRGTAVHTDDGERSAARPPID<br>ATDRIMRQTKISSLKTWWEEADSEQRGAMIRYLYEDPTDSECAEIIAELPEEDQAKLDSL<br>HLPAGRAAYSRESLTALSDHMLATTDDLHEARKRLFGVDDSWAPPAEAINAPVGNPSVDR<br>TLKIVGRYLSAVESMWGTPEVIHVEHVRDGFTSERMADERDKANRRRYNDNQEAMKKIQR<br>DYGKEGYISRGDIVRLDALELQGCACLYCGTTIGYHTCQLDHIVPQAGPGSNNRRGNLVA<br>VCERCNRSKSNTPFAVWAQKCGIPHVGVKEAIGRVRGWRKQTPNTSSEDLTRLKKEVIAR<br>LRRTQEDPEIDERSMESVAWMANELHHRIAAAYPETTVMVYRGSITAAARKAAGIDSRIN<br>LIGEKGRKDRIDRRHHAVDASVVALMEASVAKTLAERSSLRGEQRLTGKEQTWKQYTGST |

| | | |
|---|---|---|
| | | VGAREHFEMWRGHMLHLTELFNERLAEDKVYVTQNIRLRLSDGNAHTVNPSKLVSHRLGD<br>GLTVQQIDRACTPALWCALTREKDFDEKNGLPAREDRAIRVHGHEIKSSDYIQVFSKRKK<br>TDSDRDETPFGAIAVRGGFVEIGPSIHHARIYRVEGKKPVYAMLRVFTHDLLSQRHGDLF<br>SAVIPPQSISMRCAEPKLRKAITTGNATYLGWVVVGDELEINVDSFTKYAIGRFLEDFPN<br>TTRWRICGYDTNSKLTLKPIVLAAEGLENPSSAVNEIVELKGWRVAINVLTKVHPTVVRR<br>DALGRPRYSSRSNLPTSWTIE |
| | 316-320 | No se utiliza |
| secuencia de ARNm de SpyCas9 con ORF | 321 | AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUC<br>CCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGAC<br>AGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACC<br>UGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAG<br>AAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUA<br>CCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAA<br>GUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCA<br>GACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAG<br>CAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACU<br>GAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUA<br>CGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCG<br>ACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAU<br>ACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCU<br>UCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGA<br>UCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCG<br>ACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCC<br>UGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA<br>GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGC<br>UGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGA<br>GCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACU<br>ACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACC<br>ACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGA<br>CACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGA<br>AGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCG<br>GAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGA<br>CAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAA<br>GCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCG<br>GAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAA<br>UCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGC<br>UGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACG<br>UCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG<br>GAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGA<br>UCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGA<br>GACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAA<br>CGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUA<br>CAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAG<br>UACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAG<br>GAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACG<br>GAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAA<br>CAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAA<br>GCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAAC<br>UGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAG<br>UCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCG<br>CAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAAA<br>AGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCG<br>AACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACA<br>GAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCA<br>AGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAU<br>CACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGU<br>CUAG |
| secuencia de ARNm de SpyCas9 con ORF | 322 | AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGU<br>GCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCG<br>ACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUG<br>CUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGG<br>UGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCC<br>ACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCCA<br>CAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCC<br>AGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCC<br>GCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAA<br>CCUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGU<br>CCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGCC<br>AAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUC<br>CAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGU<br>ACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUAC<br>AAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCG |

| | | |
|---|---|---|
| | | GAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGG<br>AGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGC<br>CCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGA<br>GGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGG<br>UGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGC<br>AUGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGAC<br>CGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGU<br>UCAACGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGG<br>ACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCC<br>CACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGA<br>UCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUC<br>AUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCU<br>GCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGC<br>UGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGC<br>CAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCC<br>CGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGG<br>AGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGACUCCAUCGAC<br>AACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAUGAA<br>GAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCG<br>GCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAG<br>AUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCC<br>AAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCC<br>UACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAA<br>GGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCA<br>ACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCG |

| | | |
|---|---|---|
| | | AGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAU<br>CGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCG<br>CCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCC<br>AAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCUU<br>CGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUA<br>CUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCC<br>CUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCA<br>GAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGA<br>UCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAG<br>AACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAG<br>CGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGA<br>CCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUGA |
| Secuencia de ARNm de SpyCas9 con ORF con etiqueta Hibit | 323 | AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGU<br>GCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCG<br>ACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUG<br>CUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGG<br>UGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCC<br>ACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCCA<br>CAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCC<br>AGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCC<br>GCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAA<br>CCUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGU<br>CCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGCC<br>AAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUC<br>CAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGU |

| | | |
|---|---|---|
| | | ACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUAC<br>AAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCG<br>GAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGG<br>AGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGC<br>CCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGA<br>GGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGG<br>UGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGC<br>AUGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGAC<br>CGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGU<br>UCAACGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGG<br>ACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCC<br>CACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGA<br>UCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUC<br>AUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCU<br>GCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGC<br>UGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGC<br>CAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCC<br>CGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGG<br>AGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGACUCCAUCGAC<br>AACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAUGAA<br>GAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCG<br>GCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAG<br>AUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCC<br>AAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCC<br>UACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCA<br>ACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCG<br>AGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAU<br>CGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCG<br>CCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCC<br>AAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCUU<br>CGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUA<br>CUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCC<br>CUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCA<br>GAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGA<br>UCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAG<br>AACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAG<br>CGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGA<br>CCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCC<br>GUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAGAUCUCCUGA |
| Secuencia de aminoácidos para Nme2Cas9 codificada por ARNm C | 350 | MTGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLK<br>REGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDF<br>RTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEP<br>AEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEM<br>KAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRY<br>DEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDR<br>EKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQ<br>TPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITN<br>LLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGK<br>PDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMV |

| | | |
|---|---|---|
| | | NYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKG<br>KNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQ<br>NLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTADGSEFESPKKKRKVE* |
| Secuencia de aminoácidos para UGI codificada por ARNm G | 351 | MTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKR<br>TADGSEFESPKKKRKVE** |
| secuencia de aminoácidos para Nme2Cas9 codificado por ARNm I | 352 | MVPKKKRKVAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLR<br>ARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHAL<br>QTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLG<br>HCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEA<br>STLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLM<br>EQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQE<br>ENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSEN<br>QNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFA<br>SNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEV<br>MIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKL<br>ADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVF<br>CKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQ<br>QFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRYPYDVPDYAAAPAAKKKKLD* |
| secuencia de aminoácidos para Nme2Cas9 | 353 | MAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKRE<br>GVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRT<br>PAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAE<br>PKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKA |

| | | |
|---|---|---|
| codificado por ARNm J | | YHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDE ACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKA AAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPY EYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLR GFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDG KPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYK NGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQ YFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVL IQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVR |
| secuencia de aminoácidos para Nme2Cas9 codificado por ARNm M | 354 | MDGSGGGSPKKKRKVGGSGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSV RRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKEL GALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQR PALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAF FKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFV QISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGK SFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDS FNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHI LLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHF PQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKI SVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIA DNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFY LAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSESATPESVSGWRLFKKIS* |
| secuencia de aminoácidos para | 355 | MDGSGGGSPKKKRKVGGSGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSV RRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKEL GALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQR |

| | | |
|---|---|---|
| Nme2Cas9 codificado por ARNm N | | PALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAF<br>FKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFV<br>QISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGK<br>SFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDS<br>FNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHI<br>LLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHF<br>PQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKI<br>SVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIA<br>DNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFY<br>LAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSGKRTADGSGGGSPAAKKKKLD* |
| secuencia de aminoácidos para Nme2Cas9 codificado por ARNm O | 356 | MDGSGGGSPKKKRKVEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAE<br>VPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHR<br>GYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNP<br>HVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKS<br>KLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDR<br>VQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVR<br>RYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEK<br>GYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNL<br>NDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAF<br>DGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSG<br>AHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRV<br>EKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEK<br>SKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVR |
| secuencia de aminoácidos | 357 | MDGSGGGSPKKKRKVEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAE<br>VPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHR |

| | | |
|---|---|---|
| para Nme2Cas9 codificado por ARNm P | | GYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNP<br>HVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKS<br>KLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDR<br>VQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVR<br>RYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEK<br>GYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNL<br>NDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAF<br>DGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSG<br>AHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRV<br>EKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEK<br>SKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVRSESATPESVSGWRLFKKIS |
| secuencia de aminoácidos para Nme2Cas9 codificado por ARNm Q | 358 | MDGSGGGSEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDS<br>LAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQR<br>KNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGL<br>KEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQ<br>ARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEIL<br>EALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSP<br>ARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEID<br>HALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRY<br>VNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTID<br>KETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTL<br>RSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQES<br>GVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFA<br>YYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVR |
| Secuencia de | 359 | MDGSGGGSPKKKRKVEDKRPAATKKAGQAKKKKGGSGGGEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNGTSVK |

| | | |
|---|---|---|
| aminoácidos para editor de bases Nme2Cas9 codificado por ARNm S | | MDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFISWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDP<br>LYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESATPESAAFK<br>PNPINYILGLAIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQA<br>ADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELAL<br>NKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAK<br>NTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAIS<br>RALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEI<br>YGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKF<br>REYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFN<br>GKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFW<br>GLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPE<br>FEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGR<br>EIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIV<br>PIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQK<br>YQVNELGKEIRPCRLKKRPPVR* |
| Secuencia de aminoácidos para el editor base BC22n SpyCas9 codificado por ARNm E | 360 | MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNGTSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLDP<br>AQIYRVTWFISWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPF<br>QPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNL<br>IGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYH<br>LRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ<br>LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSA<br>SMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG<br>SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNF<br>DKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRF<br>NASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGK |

| | | |
|---|---|---|
| | | TILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAREN<br>QTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNK<br>VLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKY<br>DENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKAT<br>AKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARK<br>KDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR<br>MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKP<br>IREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV* |
| ARNm C que codifica Nme2Cas9 | 361 | GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGACCGGUGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACU<br>ACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCG<br>GCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGG<br>CUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGACCCGGCGGCGGGCCCACCGGCUGCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAG<br>GGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGC<br>CGCCCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCC<br>CAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCACGCCCU<br>GCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGC<br>GGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUC<br>GGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCG<br>ACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUACACCGCCGAG<br>CGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCG<br>GGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACA<br>CCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCC<br>AUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAU<br>CGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGG<br>AGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUG |

| | | |
|---|---|---|
| | | GAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAU<br>CUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCCGUGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCA<br>ACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGGAUCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGA<br>CCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCC<br>CCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGCAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUAC<br>UCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGAC<br>CUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUA<br>CUUCAACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCCGGUCCAAGA<br>AGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGC<br>UUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAU<br>CACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUG<br>GUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGG<br>CAAGACCAUCGACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGG<br>AGGUGAUGAUCCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGACC<br>CUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCA<br>ACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGACACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUG<br>AAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCU<br>GUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCU<br>ACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAGAAGAAC<br>GCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUA<br>CUUCAUCGUGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACG<br>ACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCCUGCACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCG<br>CCUACUACAUCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUC<br>CGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCU<br>GAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUCCGGAAAGCGGACCGCCGACGGCUCCGAGUUCGAGUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGG |

| | | |
|---|---|---|
| | | UGGAGUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUU<br>GUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAUGG<br>AAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAA<br>CGUAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAA<br>AAAAACGCAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAACGAAA<br>AAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAA |
| ARNm G que codifica UGI | 362 | GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGACCAACCUGUCCGACAUCAUCGAGAAGGAGACCG<br>GCAAGCAGCUGGUGAUCCAGGAGUCCAUCCUGAUGCUGCCCGAGGAGGUGGAGGAGGUGAUCGGCAACAAGCCCGAGUCC<br>GACAUCCUGGUGCACACCGCCUACGACGAGUCCACCGACGAGAACGUGAUGCUGCUGACCUCCGACGCCCCCGAGUACAA<br>GCCCUGGGCCCUGGUGAUCCAGGACUCCAACGGCGAGAACAAGAUCAAGAUGCUGUCCGGCGGCUCCAAGCGGACCGCCG<br>ACGGCUCCGAGUUCGAGUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGAGUGAUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGA<br>GUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAA<br>AAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAA<br>AUAUAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAAA<br>AAAACCUAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAUGCAAA<br>AAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAUAG<br>AAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAUCUAG |
| ARNm I que codifica Nme2Cas9 | 363 | GGGaagctcagaataaacgctcaactttggccggatctgccacCATGGTGCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGCCGCCTTCAAGCCCAACCCCAT<br>CAACTACATCCTGGGCCTGGACATCGGCATCGCCTCCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGAGGAGGAGAACCCCATC<br>CGGCTGATCGACCTGGGCGTGCGGGTGTTCGAGCGGGCCGAGGTGCCCAAGACCGGCGACTCCCTGGCCATGGCCCGGCG<br>GCTGGCCCGGTCCGTGCGGCGGCTGACCCGGCGGCGGGCCCACCGGCTGCTGCGGGCCCGGCGGCTGCTGAAGCGGGAG<br>GGCGTGCTGCAGGCCGCCGACTTCGACGAGAACGGCCTGATCAAGTCCCTGCCCAACACCCCCTGGCAGCTGCGGGCCGCC<br>GCCCTGGACCGGAAGCTGACCCCCCTGGAGTGGTCCGCCGTGCTGCTGCACCTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGTCCCAG<br>CGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCTGGGCGCCCTGCTGAAGGGCGTGGCCAACAACGCCCACGCCCTGCA<br>GACCGGCGACTTCCGGACCCCCGCCGAGCTGGCCCTGAACAAGTTCGAGAAGGAGTCCGGCCACATCCGGAACCAGCGGGG |

| | | |
|---|---|---|
| | | CGACTACTCCCACACCTTCTCCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCTGTTCGAGAAGCAGAAGGAGTTCGGCAAC<br>CCCCACGTGTCCGGCGGCCTGAAGGAGGGCATCGAGACCCTGCTGATGACCCAGCGGCCCGCCCTGTCCGGCGACGCCGTG<br>CAGAAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGTTCATCT<br>GGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGCTCCGAGCGGCCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCCTGA<br>TGGACGAGCCCTACCGGAAGTCCAAGCTGACCTACGCCCAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCCTGGAGGACACCGCCTTCTTCAA<br>GGGCCTGCGGTACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCTCCACCCTGATGGAGATGAAGGCCTACCACGCCATCTCCCGGGCCCT<br>GGAGAAGGAGGGCCTGAAGGACAAGAAGTCCCCCCTGAACCTGTCCTCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCACCGCCTTCTCC<br>CTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGGCCGGCTGAAGGACCGGGTGCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCAC<br>ATCTCCTTCGACAAGTTCGTGCAGATCTCCCTGAAGGCCCTGCGGCGGATCGTGCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACG<br>ACGAGGCCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGATCTACCTGCCCCCCATCCCCGC<br>CGACGAGATCCGGAACCCCGTGGTGCTGCGGGCCCTGTCCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTGGTGCGGCGGTACGG<br>CTCCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCGCCCGGGAGGTGGGCAAGTCCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAGCGGCA<br>GGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCGAGCCCAAGTC<br>CAAGGACATCCTGAAGCTGCGGCTGTACGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCCTGTACTCCGGCAAGGAGATCAACCTGGTGCGG<br>CTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGATCGACCACGCCCTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTCCTTCAACAACAAGGTGC<br>TGGTGCTGGGCTCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAACTCCCGGGAGTG<br>GCAGGAGTTCAAGGCCCGGGTGGAGACCTCCCGGTTCCCCCGGTCCAAGAAGCAGCGGATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGA<br>GGACGGCTTCAAGGAGTGCAACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACCGGTTCCTGTGCCAGTTCGTGGCCGACCACATCCTG<br>CTGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGTGTTCGCCTCCAACGGCCAGATCACCAACCTGCTGCGGGGCTTCTGGGGCCTGCGG<br>AAGGTGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCTGGACGCCGTGGTGGTGGCCTGCTCCACCGTGGCCATGCAGCAGAAG<br>ATCACCCGGTTCGTGCGGTACAAGGAGATGAACGCCTTCGACGGCAAGACCATCGACAAGGAGACCGGCAAGGTGCTGCACC<br>AGAAGACCCACTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGGTGATGATCCGGGTGTTCGGCAAGCCCGACGGCAAGCC<br>CGAGTTCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCTGCGGACCCTGCTGGCCGAGAAGCTGTCCTCCCGGCCCGAGGCCGTGCA<br>CGAGTACGTGACCCCCCTGTTCGTGTCCCGGGCCCCCAACCGGAAGATGTCCGGCGCCCACAAGGACACCCTGCGGTCCGC<br>CAAGCGGTTCGTGAAGCACAACGAGAAGATCTCCGTGAAGCGGGTGTGGCTGACCGAGATCAAGCTGGCCGACCTGGAGAAC |

| | | |
|---|---|---|
| | | ATGGTGAACTACAAGAACGGCCGGGAGATCGAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAGGCCTACGGCGGCAACGCC<br>AAGCAGGCCTTCGACCCCAAGGACAACCCCTTCTACAAGAAGGGCGGCCAGCTGGTGAAGGCCGTGCGGGTGGAGAAGACC<br>CAGGAGTCCGGCGTGCTGCTGAACAAGAAGAACGCCTACACCATCGCCGACAACGGCGACATGGTGCGGGTGGACGTGTTCT<br>GCAAGGTGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGTACTTCATCGTGCCCATCTACGCCTGGCAGGTGGCCGAGAACATCCTGCCCGA<br>CATCGACTGCAAGGGCTACCGGATCGACGACTCCTACACCTTCTGCTTCTCCCTGCACAAGTACGACCTGATCGCCTTCCAGA<br>AGGACGAGAAGTCCAAGGTGGAGTTCGCCTACTACATCAACTGCGACTCCTCCAACGGCCGGTTCTACCTGGCCTGGCACGAC<br>AAGGGCTCCAAGGAGCAGCAGTTCCGGATCTCCACCCAGAACCTGGTGCTGATCCAGAAGTACCAGGTGAACGAGCTGGGCA<br>AGGAGATCCGGCCCTGCCGGCTGAAGAAGCGGCCCCCCGTGCGGTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCGCCGCCCCCG<br>CCGCCAAGAAGAAGAAGCTGGACTAGCTAGCaccagcctcaagaacacccgaatggagtctctaagctacataataccaacttacactttacaaaatgttgtccccc<br>aaaatgtagccattcgtatctgctcctaataaaaagaaagtttcttcacattctCTCGAGAAAAAAAAAAAATGGAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAG<br>GTAAAAAAAAAAAATATAAAAAAAAAAAACATAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGTAAAAAAAAAAAACTCAAAAAAAAAAA<br>AGATAAAAAAAAAAAACCTAAAAAAAAAAAATGTAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAACACAAAAAAA<br>AAAAATGCAAAAAAAAAAAATCGAAAAAAAAAAAAATCTAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAGACAAAA<br>AAAAAAAATAGAAAAAAAAAAAAGTTAAAAAAAAAAAACTGAAAAAAAAAAAATTTAAAAAAAAAAAAT |
| ARNm J que codifica Nme2Cas9 | 364 | GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGUGCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGAGGACAAG<br>CGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGAUGGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACUACAUC<br>CUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCGGCUGA<br>UCGACCUGGGCGUGCGGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGC<br>CCGGUCCGUGCGGCGGCUGACCCGGCGGCGGGCCCACCGGCUGCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGGCGU<br>GCUGCAGGCCGCCGACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCC<br>UGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCG<br>GAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCACGCCCUGCAGA<br>CCGGCGACUUCCGGACCCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGC<br>GACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAA<br>CCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGACGCC |

| | | |
|---|---|---|
| | | GUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGUU<br>CAUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGGCCA<br>CCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCC<br>UUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCAUCUC<br>CCGGGCCCUGGAGAAGGAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCA<br>CCGCCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCC<br>CUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCA<br>GGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACC<br>UGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCCGUGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGG<br>CGUGGUGCGGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGGAUCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGG<br>AAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAA<br>CUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGCAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCG<br>GCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGG<br>GACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUC<br>AACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCCGGUCCAAGAAGCA<br>GCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGGUUCC<br>UGUGCCAGUUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACC<br>AACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGG<br>UGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAG<br>ACCAUCGACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGU<br>GAUGAUCCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGC<br>UGGCCGAGAAGCUGUCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCAACCG<br>GAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGACACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGC<br>GGGUGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUAC<br>GAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GAAGGGCGGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAGAAGAACGCC<br>UACACCAUCGCCGACAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUU<br>CAUCGUGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACU<br>CCUACACCUUCUGCUUCUCCCUGCACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCC<br>UACUACAUCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCG<br>GAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGA<br>AGAAGCGGCCCCCCGUGCGGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGUACCCC<br>UACGACGUGCCCGACUACGCCGGCUACCCCUACGACGUGCCCGACUACGCCGGCUCCUACCCCUACGACGUGCCCGACUA<br>CGCCGCCGCCCCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGCUGGACUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGC<br>UACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUU<br>UCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAA<br>AAAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAACCUAAA<br>AAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAU<br>CGAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAA<br>AAGUUAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAUCUAG |
| ARNm M que codifica Nme2Cas9 | 365 | GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAG<br>CGGAAGGUGGGCGGCUCCGGCGGCGGCGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAU<br>CGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGUG<br>UUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGA<br>CCCGGCGGCGGGCCCACCGGCUGCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCG<br>ACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCCUGGACCGGAAGCUGACCCCC<br>CUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCG<br>CCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCC<br>GCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUC<br>CCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCC |

| | | |
|---|---|---|
| | | UGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCA<br>CUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGA<br>ACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUAC<br>CGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUA<br>CGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGG<br>GCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAG<br>ACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUU<br>CGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAG<br>GCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGAC<br>GAGAUCCGGAACCCCGUGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCU<br>CCCCCGCCCGGAUCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAG<br>GAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUC<br>CAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGCAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGC<br>GGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAG<br>GUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCG<br>GGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCCGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAG<br>UUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGA<br>CCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCU<br>GGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGC<br>CAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCG<br>GCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGAUCCGGGUGUUCGGC<br>AAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCUC<br>CCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACA<br>AGGACACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAUC<br>AAGCUGGCCGACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCU |

| | | |
|---|---|---|
| | | GGAGGCCUACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGA<br>AGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGC<br>GACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCCUG<br>GCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCC<br>UGCACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUACAUCAACUGCGACUCCU<br>CCAACGGCCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUG<br>CUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUC<br>CGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAGAUCUCCUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACAC<br>CCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGC<br>UCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAGGUAA<br>AAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAGA<br>UAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAA<br>AAAUGCAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAGACAAAAA<br>AAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAUCUAG |
| ARNm N que codifica Nme2Cas9 | 366 | GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAG<br>CGGAAGGUGGGCGGCUCCGGCGGCGGCGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAU<br>CGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGUG<br>UUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGA<br>CCCGGCGGCGGGCCCACCGGCUGCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCG<br>ACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCCUGGACCGGAAGCUGACCCCC<br>CUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCG<br>CCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCC<br>GCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUC<br>CCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCC<br>UGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCA |

| | | |
|---|---|---|
| | | CUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGA<br>ACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUAC<br>CGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUA<br>CGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGG<br>GCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAG<br>ACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUU<br>CGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAG<br>GCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGAC<br>GAGAUCCGGAACCCCGUGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCU<br>CCCCCGCCCGGAUCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAG<br>GAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUC<br>CAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGCAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGC<br>GGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAG<br>GUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCG<br>GGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCCGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAG<br>UUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGA<br>CCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCU<br>GGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGC<br>CAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCG<br>GCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGAUCCGGGUGUUCGGC<br>AAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCUC<br>CCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACA<br>AGGACACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAUC<br>AAGCUGGCCGACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCU<br>GGAGGCCUACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGA |

| | | |
|---|---|---|
| | | AGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGC<br>GACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCCUG<br>GCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCC<br>UGCACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUACAUCAACUGCGACUCCU<br>CCAACGGCCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUG<br>CUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUC<br>CGGAAAGCGGACCGCCGACGGCUCCGGAGGAGGAAGCCCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGCUGGACUAGCUAGCACCAGCCU<br>CAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUU<br>CGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAA<br>AAAAAGGUAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAACUCAAAA<br>AAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAACAC<br>AAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAA<br>GACAAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAUCUAG |
| ARNm O que codifica Nme2Cas9 | 367 | GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAG<br>CGGAAGGUGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCGGCUCCGGCGGCG<br>GCGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUG<br>GAGAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGA<br>CCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGACCCGGCGGCGGGCCCACCGGCUGC<br>UGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCU<br>GCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUG<br>CACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCU<br>GAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCG<br>AGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUG<br>AUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCU<br>GAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCA |

| | | |
|---|---|---|
| | | AGGCCGCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGC<br>UCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCA<br>GGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCC<br>ACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCU<br>GAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGC<br>UGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUG<br>AAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACC<br>ACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCCGUGGUGCUG<br>CGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGGAUCCACAUCGAGA<br>CCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGA<br>GAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGC<br>UGUACGAGCAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUG<br>GAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAA<br>CCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCG<br>GGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCCGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGU<br>GCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGC<br>AAGCGGCGGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCG<br>AGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUC<br>GUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCA<br>CUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGAUCCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUC<br>GAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGU<br>ACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGACACCCUGCGGUCCGCCAAG<br>CGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAACAU<br>GGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGGCGGCAACGCCA<br>AGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACC |

| | | |
|---|---|---|
| | | CAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUGUU<br>CUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGC<br>CCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCCUGCACAAGUACGACCUGAUCGCCU<br>UCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUACAUCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCGGUUCUACCUGGCC<br>UGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAA<br>CGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACAC<br>CCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGC<br>UCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAGGUAA<br>AAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAGAU<br>AAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAA<br>AUGCAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAA<br>AAAAAUAGAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAUCUAG |
| ARNm P que codifica Nme2Cas9 | 368 | GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAG<br>CGGAAGGUGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCGGCUCCGGCGGCG<br>GCGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAUCGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUG<br>GAGAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGA<br>CCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGACCCGGCGGCGGGCCCACCGGCUGC<br>UGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCU<br>GCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUG<br>CACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCU<br>GAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCG<br>AGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUG<br>AUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCU<br>GAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCA<br>AGGCCGCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGC |

| | | |
|---|---|---|
| | | UCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCA<br>GGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCC<br>ACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCU<br>GAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGC<br>UGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUG<br>AAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACC<br>ACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCCGUGGUGCUG<br>CGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGGAUCCACAUCGAGA<br>CCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGA<br>GAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGC<br>UGUACGAGCAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGGCUACGUG<br>GAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAA<br>CCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCG<br>GGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCCGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGU<br>GCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGC<br>AAGCGGCGGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCG<br>AGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUC<br>GUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCA<br>CUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGAUCCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUC<br>GAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGU<br>ACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGACACCCUGCGGUCCGCCAAG<br>CGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAACAU<br>GGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGGCGGCAACGCCA<br>AGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACC<br>CAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUGUU |

| | | |
|---|---|---|
| | | CUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGC<br>CCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCCUGCACAAGUACGACCUGAUCGCCU<br>UCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUACAUCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCGGUUCUACCUGGCC<br>UGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAA<br>CGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCC<br>GUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAGAUCUCCUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACA<br>UAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUU<br>CACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAA<br>ACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAA<br>AAAAUGUAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAUCGAAA<br>AAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAGUU<br>AAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAUCUAG |
| ARNm Q que codifica Nme2Cas9 | 369 | GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAG<br>CGGAAGGUGGGCGGCUCCGGCGGCGGCGCCGCCUUCAAGCCCAACCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAU<br>CGCCUCCGUGGGCUGGGCCAUGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGUG<br>UUCGAGCGGGCCGAGGUGCCCAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGA<br>CCCGGCGGCGGGCCCACCGGCUGCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCG<br>ACGAGAACGGCCUGAUCAAGUCCCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCCUGGACCGGAAGCUGACCCCC<br>CUGGAGUGGUCCGCCGUGCUGCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCG<br>CCGACAAGGAGCUGGGCGCCCUGCUGAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCC<br>GCCGAGCUGGCCCUGAACAAGUUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUC<br>CCGGAAGGACCUGCAGGCCGAGCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCC<br>UGAAGGAGGGCAUCGAGACCCUGCUGAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCA<br>CUGCACCUUCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGA<br>ACAACCUGCGGAUCCUGGAGCAGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUAC |

| | | |
|---|---|---|
| | | CGGAAGUCCAAGCUGACCUACGCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUA<br>CGGCAAGGACAACGCCGAGGCCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGG<br>GCCUGAAGGACAAGAAGUCCCCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAG<br>ACCGACGAGGACAUCACCGGCCGGCUGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUU<br>CGACAAGUUCGUGCAGAUCUCCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAG<br>GCCUGCGCCGAGAUCUACGGCGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGAC<br>GAGAUCCGGAACCCCGUGGUGCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCU<br>CCCCCGCCCGGAUCCACAUCGAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAG<br>GAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUC<br>CAAGGACAUCCUGAAGCUGCGGCUGUACGAGCAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGC<br>GGCUGAACGAGAAGGGCUACGUGGAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAG<br>GUGCUGGUGCUGGGCUCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCG<br>GGAGUGGCAGGAGUUCAAGGCCCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCCGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAG<br>UUCGACGAGGACGGCUUCAAGGAGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGGUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGA<br>CCACAUCCUGCUGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCU<br>GGGGCCUGCGGAAGGUGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGC<br>CAUGCAGCAGAAGAUCACCCGGUUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCG<br>GCAAGGUGCUGCACCAGAAGACCCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGAUCCGGGUGUUCGGC<br>AAGCCCGACGGCAAGCCCGAGUUCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCUC<br>CCGGCCCGAGGCCGUGCACGAGUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACA<br>AGGACACCCUGCGGUCCGCCAAGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAUC<br>AAGCUGGCCGACCUGGAGAACAUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCU<br>GGAGGCCUACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGA<br>AGGCCGUGCGGGUGGAGAAGACCCAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGC<br>GACAUGGUGCGGGUGGACGUGUUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCCUG |

| | | |
|---|---|---|
| | | GCAGGUGGCCGAGAACAUCCUGCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCC<br>UGCACAAGUACGACCUGAUCGCCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUACAUCAACUGCGACUCCU<br>CCAACGGCCGGUUCUACCUGGCCUGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUG<br>CUGAUCCAGAAGUACCAGGUGAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUA<br>GCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCC<br>AAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAA<br>AAAACGGAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAACGUAAAA<br>AAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAACGC<br>AAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAA<br>CCCAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAA<br>AAAAUCUAG |
| ARNm S que codifica editor de base Nme2Cas9 | 370 | GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACGGCUCCGGCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAG<br>CGGAAGGUGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCGGCUCCGGCGGCG<br>GCGAGGCCUCCCCCGCCUCCGGCCCCCGGCACCUGAUGGACCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUCAACAACGGCAUCGGC<br>CGGCACAAGACCUACCUGUGCUACGAGGUGGAGCGGCUGGACAACGGCACCUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGGGGCUU<br>CCUGCACAACCAGGCCAAGAACCUGCUGUGCGGCUUCUACGGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUCCUGGACCUGGUGCCCU<br>CCCUGCAGCUGGACCCCGCCCAGAUCUACCGGGUGACCUGGUUCAUCUCCUGGUCCCCCUGCUUCUCCUGGGGCUGCGC<br>CGGCGAGGUGCGGGCCUUCCUGCAGGAGAACACCCACGUGCGGCUGCGGAUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGACUACGAC<br>CCCCUGUACAAGGAGGCCCUGCAGAUGCUGCGGGACGCCGGCGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCUACGACGAGUUCAAGCA<br>CUGCUGGGACACCUUCGUGGACCACCAGGGCUGCCCCUUCCAGCCCUGGGACGGCCUGGACGAGCACUCCCAGGCCCUG<br>UCCGGCCGGCUGCGGGCCAUCCUGCAGAACCAGGGCAACUCCGGCUCCGAGACCCCCGGCACCUCCGAGUCCGCCACCCC<br>CGAGUCCGCAGCGUUCAAACCAAAUCCCAUCAACUACAUCCUGGGCCUGGCCAUCGGCAUCGCCUCCGUGGGCUGGGCCA<br>UGGUGGAGAUCGACGAGGAGGAGAACCCCAUCCGGCUGAUCGACCUGGGCGUGCGGGUGUUCGAGCGGGCCGAGGUGCC<br>CAAGACCGGCGACUCCCUGGCCAUGGCCCGGCGGCUGGCCCGGUCCGUGCGGCGGCUGACCCGGCGGCGGGCCCACCGG<br>CUGCUGCGGGCCCGGCGGCUGCUGAAGCGGGAGGGCGUGCUGCAGGCCGCCGACUUCGACGAGAACGGCCUGAUCAAGU |

| | | |
|---|---|---|
| | | CCCUGCCCAACACCCCCUGGCAGCUGCGGGCCGCCGCCCUGGACCGGAAGCUGACCCCCCUGGAGUGGUCCGCCGUGCU<br>GCUGCACCUGAUCAAGCACCGGGGCUACCUGUCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCUGGGCGCCC<br>UGCUGAAGGGCGUGGCCAACAACGCCCACGCCCUGCAGACCGGCGACUUCCGGACCCCCGCCGAGCUGGCCCUGAACAAG<br>UUCGAGAAGGAGUCCGGCCACAUCCGGAACCAGCGGGGCGACUACUCCCACACCUUCUCCCGGAAGGACCUGCAGGCCGA<br>GCUGAUCCUGCUGUUCGAGAAGCAGAAGGAGUUCGGCAACCCCCACGUGUCCGGCGGCCUGAAGGAGGGCAUCGAGACCC<br>UGCUGAUGACCCAGCGGCCCGCCCUGUCCGGCGACGCCGUGCAGAAGAUGCUGGGCCACUGCACCUUCGAGCCCGCCGA<br>GCCCAAGGCCGCCAAGAACACCUACACCGCCGAGCGGUUCAUCUGGCUGACCAAGCUGAACAACCUGCGGAUCCUGGAGC<br>AGGGCUCCGAGCGGCCCCUGACCGACACCGAGCGGGCCACCCUGAUGGACGAGCCCUACCGGAAGUCCAAGCUGACCUAC<br>GCCCAGGCCCGGAAGCUGCUGGGCCUGGAGGACACCGCCUUCUUCAAGGGCCUGCGGUACGGCAAGGACAACGCCGAGG<br>CCUCCACCCUGAUGGAGAUGAAGGCCUACCACGCCAUCUCCCGGGCCCUGGAGAAGGAGGGCCUGAAGGACAAGAAGUCC<br>CCCCUGAACCUGUCCUCCGAGCUGCAGGACGAGAUCGGCACCGCCUUCUCCCUGUUCAAGACCGACGAGGACAUCACCGG<br>CCGGCUGAAGGACCGGGUGCAGCCCGAGAUCCUGGAGGCCCUGCUGAAGCACAUCUCCUUCGACAAGUUCGUGCAGAUCU<br>CCCUGAAGGCCCUGCGGCGGAUCGUGCCCCUGAUGGAGCAGGGCAAGCGGUACGACGAGGCCUGCGCCGAGAUCUACGG<br>CGACCACUACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGAUCUACCUGCCCCCCAUCCCCGCCGACGAGAUCCGGAACCCCGUGGU<br>GCUGCGGGCCCUGUCCCAGGCCCGGAAGGUGAUCAACGGCGUGGUGCGGCGGUACGGCUCCCCCGCCCGGAUCCACAUC<br>GAGACCGCCCGGGAGGUGGGCAAGUCCUUCAAGGACCGGAAGGAGAUCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCG<br>GGAGAAGGCCGCCGCCAAGUUCCGGGAGUACUUCCCCAACUUCGUGGGCGAGCCCAAGUCCAAGGACAUCCUGAAGCUGC<br>GGCUGUACGAGCAGCAGCACGGCAAGUGCCUGUACUCCGGCAAGGAGAUCAACCUGGUGCGGCUGAACGAGAAGGGCUAC<br>GUGGAGAUCGACCACGCCCUGCCCUUCUCCCGGACCUGGGACGACUCCUUCAACAACAAGGUGCUGGUGCUGGGCUCCGA<br>GAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCUACGAGUACUUCAACGGCAAGGACAACUCCCGGGAGUGGCAGGAGUUCAAGGC<br>CCGGGUGGAGACCUCCCGGUUCCCCCGGUCCAAGAAGCAGCGGAUCCUGCUGCAGAAGUUCGACGAGGACGGCUUCAAGG<br>AGUGCAACCUGAACGACACCCGGUACGUGAACCGCUUCCUGUGCCAGUUCGUGGCCGACCACAUCCUGCUGACCGGCAAG<br>GGCAAGCGGCGGGUGUUCGCCUCCAACGGCCAGAUCACCAACCUGCUGCGGGGCUUCUGGGGCCUGCGGAAGGUGCGGG<br>CCGAGAACGACCGGCACCACGCCCUGGACGCCGUGGUGGUGGCCUGCUCCACCGUGGCCAUGCAGCAGAAGAUCACCCGG<br>UUCGUGCGGUACAAGGAGAUGAACGCCUUCGACGGCAAGACCAUCGACAAGGAGACCGGCAAGGUGCUGCACCAGAAGAC |

| | | |
|---|---|---|
| | | CCACUUCCCCCAGCCCUGGGAGUUCUUCGCCCAGGAGGUGAUGAUCCGGGUGUUCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGU<br>UCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCUGCGGACCCUGCUGGCCGAGAAGCUGUCCUCCCGGCCCGAGGCCGUGCACGA<br>GUACGUGACCCCCCUGUUCGUGUCCCGGGCCCCCAACCGGAAGAUGUCCGGCGCCCACAAGGACACCCUGCGGUCCGCCA<br>AGCGGUUCGUGAAGCACAACGAGAAGAUCUCCGUGAAGCGGGUGUGGCUGACCGAGAUCAAGCUGGCCGACCUGGAGAAC<br>AUGGUGAACUACAAGAACGGCCGGGAGAUCGAGCUGUACGAGGCCCUGAAGGCCCGGCUGGAGGCCUACGGCGGCAACGC<br>CAAGCAGGCCUUCGACCCCAAGGACAACCCCUUCUACAAGAAGGGCGGCCAGCUGGUGAAGGCCGUGCGGGUGGAGAAGA<br>CCCAGGAGUCCGGCGUGCUGCUGAACAAGAAGAACGCCUACACCAUCGCCGACAACGGCGACAUGGUGCGGGUGGACGUG<br>UUCUGCAAGGUGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGUACUUCAUCGUGCCCAUCUACGCCUGGCAGGUGGCCGAGAACAUCCU<br>GCCCGACAUCGACUGCAAGGGCUACCGGAUCGACGACUCCUACACCUUCUGCUUCUCCCUGCACAAGUACGACCUGAUCG<br>CCUUCCAGAAGGACGAGAAGUCCAAGGUGGAGUUCGCCUACUACAUCAACUGCGACUCCUCCAACGGCCGGUUCUACCUG<br>GCCUGGCACGACAAGGGCUCCAAGGAGCAGCAGUUCCGGAUCUCCACCCAGAACCUGGUGCUGAUCCAGAAGUACCAGGU<br>GAACGAGCUGGGCAAGGAGAUCCGGCCCUGCCGGCUGAAGAAGCGGCCCCCCGUGCGGUAGUGACUAGCACCAGCCUCAA<br>GAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGU<br>AUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAA<br>AGGUAAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAA<br>AAGAUAAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAACACAAAAAA<br>AAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAGACAA<br>AAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAUCUAG |
| ARNm E que codifica editor de base BC22n SpyCas9 | 371 | GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGAGGCCUCCCCCGCCUCCGGCCCCCGGCACCUG<br>AUGGACCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUCAACAACGGCAUCGGCCGGCACAAGACCUACCUGUGCUACGAGGUGGAGCGG<br>CUGGACAACGGCACCUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGGGGCUUCCUGCACAACCAGGCCAAGAACCUGCUGUGCGGCUU<br>CUACGGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUCCUGGACCUGGUGCCCUCCCUGCAGCUGGACCCCGCCCAGAUCUACCGGGUG<br>ACCUGGUUCAUCUCCUGGUCCCCCUGCUUCUCCUGGGGCUGCGCCGGCGAGGUGCGGGCCUUCCUGCAGGAGAACACCC<br>ACGUGCGGCUGCGGAUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGACUACGACCCCCUGUACAAGGAGGCCCUGCAGAUGCUGCGGGAC<br>GCCGGCGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCUACGACGAGUUCAAGCACUGCUGGGACACCUUCGUGGACCACCAGGGCUGCCC |

| | | |
|---|---|---|
| | | CUUCCAGCCCUGGGACGGCCUGGACGAGCACUCCCAGGCCCUGUCCGGCCGGCUGCGGGCCAUCCUGCAGAACCAGGGC<br>AACUCCGGCUCCGAGACCCCCGGCACCUCCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGCCAU<br>CGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACA<br>CCGACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUG<br>AAGCGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGC<br>CAAGGUGGACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCA<br>UCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGAC<br>UCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCCACAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGA<br>GGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGG<br>AGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAAC<br>CUGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAA<br>CUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCU<br>GCUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACA<br>UCCUGCGGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGAC<br>CUGACCCUGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGG<br>CUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACG<br>GCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCC<br>CACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGA<br>GAAGAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGA<br>UGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUC<br>AUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUC<br>ACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAA<br>GAAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGA<br>UCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUG<br>AAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUG |

| | | |
|---|---|---|
| | | UUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAA<br>GCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACC<br>AUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUCAAG<br>GAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGC<br>CAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACA<br>UCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAG<br>GAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUA<br>CCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGG<br>ACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCA<br>AGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUC<br>ACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCG<br>GCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGA<br>ACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUC<br>UACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAA<br>GAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCG<br>AGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUCACCCUGG<br>CCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGAC<br>UUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCUC<br>CAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCG<br>GCUUCGACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCC<br>GUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUGGAGGCCAAGGG<br>CUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGA<br>UGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCCUGUACCUGGCC<br>UCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCU<br>GGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCG |

| | | |
|---|---|---|
| | | CCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCG<br>CCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACC<br>CUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACGGCGGCGGCUCCCC<br>CAAGAAGAAGCGGAAGGUGUGACUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACA<br>CUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGA<br>AAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAA<br>CGAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAA<br>AAAAGGGAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAUCUAAA<br>AAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAACU<br>GAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAUCUAG |
| Marco abierto de lectura para Nme2Cas9 codificado por ARNm C | 372 | atgaccggtgccgccttcaagcccaaccccatcaactacatcctgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggctgggccatggtggagatcgacgaggaggagaaccccatccggc<br>tgatcgacctgggcgtgcgggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagaccggcgactccctggccatggcccggcggctggcccggtccgtgcggcggctgacccggcggcgggcc<br>caccggctgctgcgggcccggcggctgctgaagcgggagggcgtgctgcaggccgccgacttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgcccaacacccccctggcagctgcgggc<br>cgccgccctggaccggaagctgacccccctggagtggtccgccgtgctgctgcacctgatcaagcaccggggctacctgtcccagcggaagaacgaggcgagaccgccgacaag<br>gagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaacaacgcccacgccctgcagaccggcgacttccggacccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaaggagtccggccaca<br>tccggaaccagcggggcgactactcccacaccttctcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaaccccccacgtgtccggcggcct<br>gaaggagggcatcgagaccctgctgatgacccagcggcccgccctgtccggcgacgccgtgcagaagatgctgggccactgcaccttcgagcccgccgagcccaaggccgccaag<br>aacacctacaccgccgagcggttcatctggctgaccaagctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagcggcccctgaccgacaccgagcgggccaccctgatggacga<br>gccctaccggaagtccaagctgacctacgcccaggcccggaagctgctgggcctggaggacaccgccttcttcaagggcctgcggtacggcaaggacaacgccgaggcctccaccct<br>gatggagatgaaggcctaccacgccatctcccgggccctggagaaggagggcctgaaggacaagaagtccccccctgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatcggcaccgcct<br>tctccctgttcaagaccgacgaggacatcaccggccggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggaggccctgctgaagcacatctccttcgacaagttcgtgcagatctccctga<br>aggccctgcggcggatcgtgcccctgatggagcagggcaagcggtacgacgaggcctgcgccgagatctacggcgaccactacggcaagaagaacaccgaggagaagatctacct<br>gccccccatccccgccgacgagatccggaaccccgtggtgctgcgggccctgtcccaggcccggaaggtgatcaacggcgtggtgcggcggtacggctcccccgcccggatccacat<br>cgagaccgcccgggaggtgggcaagtccttcaaggaccggaaggagatcgagaagcggcaggaggagaaccggaaggaccgggagaaggccgccgccaagttccgggagta<br>cttccccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcagcacggcaagtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaac |

| | | |
|---|---|---|
| | | gagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgcccttctcccggacctgggacgactccttcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaaccagaacaagggcaaccagac<br>cccctacgagtacttcaacggcaaggacaactcccgggagtggcaggagttcaaggcccgggtggagacctcccggttcccccggtccaagaagcagcggatcctgctgcagaagtt<br>cgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaacgacacccggtacgtgaaccgcttcctgtgccagttcgtggccgaccacatcctgctgaccggcaagggcaagcggcgggtgttc<br>gcctccaacggccagatcaccaacctgctgcggggcttctggggcctgcggaaggtgcgggccgagaacgaccggcaccacgccctggacgccgtggtggtggcctgctccaccgtg<br>gccatgcagcagaagatcacccggttcgtgcggtacaaggagatgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccggcaaggtgctgcaccagaagacccacttccccc<br>agccctgggagttcttcgcccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagcccgacggcaagcccgagttcgaggaggccgacacccccgagaagctgcggaccctgctggccgag<br>aagctgtcctcccggcccgaggccgtgcacgagtacgtgacccccctgttcgtgtcccgggcccccaaccggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggtccgccaagcgg<br>ttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaacatggtgaactacaagaacggccgggagatcgagctgtacga<br>ggccctgaaggcccggctggaggcctacggcggcaacgccaagcaggccttcgaccccaaggacaacccccttctacaagaagggcggccagctggtgaaggccgtgcgggtgga<br>gaagacccaggagtccggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggtggacgtgttctgcaaggtggacaagaagggcaagaac<br>cagtacttcatcgtgcccatctacgcctggcaggtggccgagaacatcctgcccgacatcgactgcaagggctaccggatcgacgactcctacaccttctgcttctccctgcacaagtacga<br>cctgatcgccttccagaaggacgagaagtccaaggtggagttcgcctactacatcaactgcgactcctccaacggccggttctacctggcctggcacgacaagggctccaaggagcagc<br>agttccggatctccacccagaacctggtgctgatccagaagtaccaggtgaacgagctgggcaaggagatccggccctgccggctgaagaagcggccccccgtgcggtccggaaag<br>cggaccgccgacggctccgagttcgagtccccaagaagaagcggaaggtggagtag |
| Marco abierto de lectura para UGI codificado por ARNm G | 373 | ATGACCAACCTGTCCGACATCATCGAGAAGGAGACCGGCAAGCAGCTGGTGATCCAGGAGTCCATCCTGATGCTGCCCGAGG<br>AGGTGGAGGAGGTGATCGGCAACAAGCCCGAGTCCGACATCCTGGTGCACACCGCCTACGACGAGTCCACCGACGAGAACGT<br>GATGCTGCTGACCTCCGACGCCCCCGAGTACAAGCCCTGGGCCCTGGTGATCCAGGACTCCAACGGCGAGAACAAGATCAAG<br>ATGCTGTCCGGCGGCTCCAAGCGGACCGCCGACGGCTCCGAGTTCGAGTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGAGTGATAG |
| marco abierto de lectura para Nme2Cas9 codificado por ARNm I | 374 | ATGGTGCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGCCGCCTTCAAGCCCAACCCCATCAACTACATCCTGGGCCTGGACATCGGCATCG<br>CCTCCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGAGGAGGAGAACCCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTGCGGGTGTTCG<br>AGCGGGCCGAGGTGCCCAAGACCGGCGACTCCCTGGCCATGGCCCGGCGGCTGGCCCGGTCCGTGCGGCGGCTGACCCGG<br>CGGCGGGCCCACCGGCTGCTGCGGGCCCGGCGGCTGCTGAAGCGGGAGGGCGTGCTGCAGGCCGCCGACTTCGACGAGAA<br>CGGCCTGATCAAGTCCCTGCCCAACACCCCCTGGCAGCTGCGGGCCGCCGCCCTGGACCGGAAGCTGACCCCCCTGGAGTG<br>GTCCGCCGTGCTGCTGCACCTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGTCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GCTGGGCGCCCTGCTGAAGGGCGTGGCCAACAACGCCCACGCCCTGCAGACCGGCGACTTCCGGACCCCCGCCGAGCTGGC<br>CCTGAACAAGTTCGAGAAGGAGTCCGGCCACATCCGGAACCAGCGGGGCGACTACTCCCACACCTTCTCCCGGAAGGACCTG<br>CAGGCCGAGCTGATCCTGCTGTTCGAGAAGCAGAAGGAGTTCGGCAACCCCCACGTGTCCGGCGGCCTGAAGGAGGGCATC<br>GAGACCCTGCTGATGACCCAGCGGCCCGCCCTGTCCGGCGACGCCGTGCAGAAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGAGCCC<br>GCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGTTCATCTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGG<br>AGCAGGGCTCCGAGCGGCCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCCTGATGGACGAGCCCTACCGGAAGTCCAAGCTGACCT<br>ACGCCCAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCCTGGAGGACACCGCCTTCTTCAAGGGCCTGCGGTACGGCAAGGACAACGCCGAGG<br>CCTCCACCCTGATGGAGATGAAGGCCTACCACGCCATCTCCCGGGCCCTGGAGAAGGAGGGCCTGAAGGACAAGAAGTCCCC<br>CCTGAACCTGTCCTCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCACCGCCTTCTCCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGGCCGG<br>CTGAAGGACCGGGTGCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCACATCTCCTTCGACAAGTTCGTGCAGATCTCCCTGAA<br>GGCCCTGCGGCGGATCGTGCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGGCCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCACTA<br>CGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGATCTACCTGCCCCCCATCCCCGCCGACGAGATCCGGAACCCCGTGGTGCTGCGGGC<br>CCTGTCCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTGGTGCGGCGGTACGGCTCCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCGCCCG<br>GGAGGTGGGCAAGTCCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCG<br>CCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCGAGCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGCTGTACGAGCA<br>GCAGCACGGCAAGTGCCTGTACTCCGGCAAGGAGATCAACCTGGTGCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGATCGACCAC<br>GCCCTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTCCTTCAACAACAAGGTGCTGGTGCTGGGCTCCGAGAACCAGAACAAGGGCA<br>ACCAGACCCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAACTCCCGGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGGGTGGAGACCTCCCG<br>GTTCCCCCGGTCCAAGAAGCAGCGGATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGTGCAACCTGAACGACACC<br>CGGTACGTGAACCGGTTCCTGTGCCAGTTCGTGGCCGACCACATCCTGCTGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGTGTTCGCCT<br>CCAACGGCCAGATCACCAACCTGCTGCGGGGCTTCTGGGGCCTGCGGAAGGTGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCC<br>TGGACGCCGTGGTGGTGGCCTGCTCCACCGTGGCCATGCAGCAGAAGATCACCCGGTTCGTGCGGTACAAGGAGATGAACGC<br>CTTCGACGGCAAGACCATCGACAAGGAGACCGGCAAGGTGCTGCACCAGAAGACCCACTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTC<br>GCCCAGGAGGTGATGATCCGGGTGTTCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCTG<br>CGGACCCTGCTGGCCGAGAAGCTGTCCTCCCGGCCCGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCCCTGTTCGTGTCCCGGGCC |

| | | |
|---|---|---|
| | | CCCAACCGGAAGATGTCCGGCGCCCACAAGGACACCCTGCGGTCCGCCAAGCGGTTCGTGAAGCACAACGAGAAGATCTCCG<br>TGAAGCGGGTGTGGCTGACCGAGATCAAGCTGGCCGACCTGGAGAACATGGTGAACTACAAGAACGGCCGGGAGATCGAGCT<br>GTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAGGCCTACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCTTCGACCCCAAGGACAACCCCTTCTA<br>CAAGAAGGGCGGCCAGCTGGTGAAGGCCGTGCGGGTGGAGAAGACCCAGGAGTCCGGCGTGCTGCTGAACAAGAAGAACGC<br>CTACACCATCGCCGACAACGGCGACATGGTGCGGGTGGACGTGTTCTGCAAGGTGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGTACTTC<br>ATCGTGCCCATCTACGCCTGGCAGGTGGCCGAGAACATCCTGCCCGACATCGACTGCAAGGGCTACCGGATCGACGACTCCT<br>ACACCTTCTGCTTCTCCCTGCACAAGTACGACCTGATCGCCTTCCAGAAGGACGAGAAGTCCAAGGTGGAGTTCGCCTACTAC<br>ATCAACTGCGACTCCTCCAACGGCCGGTTCTACCTGGCCTGGCACGACAAGGGCTCCAAGGAGCAGCAGTTCCGGATCTCCA<br>CCCAGAACCTGGTGCTGATCCAGAAGTACCAGGTGAACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCCGGCTGAAGAAGCGGC<br>CCCCCGTGCGGTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCGCCGCCCCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGCTGGACTAG |
| marco abierto de lectura para Nme2Cas9 codificado por ARNm J | 375 | ATGGCCGCCTTCAAGCCCAACCCCATCAACTACATCCTGGGCCTGGACATCGGCATCGCCTCCGTGGGCTGGGCCATGGTGG<br>AGATCGACGAGGAGGAGAACCCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTGCGGGTGTTCGAGCGGGCCGAGGTGCCCAAGACCG<br>GCGACTCCCTGGCCATGGCCCGGCGGCTGGCCCGGTCCGTGCGGCGGCTGACCCGGCGGCGGGCCCACCGGCTGCTGCGG<br>GCCCGGCGGCTGCTGAAGCGGGAGGGCGTGCTGCAGGCCGCCGACTTCGACGAGAACGGCCTGATCAAGTCCCTGCCCAAC<br>ACCCCCTGGCAGCTGCGGGCCGCCGCCCTGGACCGGAAGCTGACCCCCCTGGAGTGGTCCGCCGTGCTGCTGCACCTGATC<br>AAGCACCGGGGCTACCTGTCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCTGGGCGCCCTGCTGAAGGGCGT<br>GGCCAACAACGCCCACGCCCTGCAGACCGGCGACTTCCGGACCCCCGCCGAGCTGGCCCTGAACAAGTTCGAGAAGGAGTC<br>CGGCCACATCCGGAACCAGCGGGGCGACTACTCCCACACCTTCTCCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCTGTTC<br>GAGAAGCAGAAGGAGTTCGGCAACCCCCACGTGTCCGGCGGCCTGAAGGAGGGCATCGAGACCCTGCTGATGACCCAGCGG<br>CCCGCCCTGTCCGGCGACGCCGTGCAGAAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAAC<br>ACCTACACCGCCGAGCGGTTCATCTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGCTCCGAGCGGCCCCTGA<br>CCGACACCGAGCGGGCCACCCTGATGGACGAGCCCTACCGGAAGTCCAAGCTGACCTACGCCCAGGCCCGGAAGCTGCTGG<br>GCCTGGAGGACACCGCCTTCTTCAAGGGCCTGCGGTACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCTCCACCCTGATGGAGATGAAGG<br>CCTACCACGCCATCTCCCGGGCCCTGGAGAAGGAGGGCCTGAAGGACAAGAAGTCCCCCCTGAACCTGTCCTCCGAGCTGCA<br>GGACGAGATCGGCACCGCCTTCTCCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGGCCGGCTGAAGGACCGGGTGCAGCCCGA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCACATCTCCTTCGACAAGTTCGTGCAGATCTCCCTGAAGGCCCTGCGGCGGATCGTGCCC<br>CTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGGCCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAGAACACCGAGGAG<br>AAGATCTACCTGCCCCCCATCCCCGCCGACGAGATCCGGAACCCCGTGGTGCTGCGGGCCCTGTCCCAGGCCCGGAAGGTG<br>ATCAACGGCGTGGTGCGGCGGTACGGCTCCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCGCCCGGGAGGTGGGCAAGTCCTTCAAG<br>GACCGGAAGGAGATCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTC<br>CCCAACTTCGTGGGCGAGCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGCTGTACGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCCTGTACT<br>CCGGCAAGGAGATCAACCTGGTGCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGATCGACCACGCCCTGCCCTTCTCCCGGACCTG<br>GGACGACTCCTTCAACAACAAGGTGCTGGTGCTGGGCTCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCTACGAGTACTTCA<br>ACGGCAAGGACAACTCCCGGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGGGTGGAGACCTCCCGGTTCCCCCGGTCCAAGAAGCAGC<br>GGATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGTGCAACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACCGGTTCCTGTG<br>CCAGTTCGTGGCCGACCACATCCTGCTGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGTGTTCGCCTCCAACGGCCAGATCACCAACCTG<br>CTGCGGGGCTTCTGGGGCCTGCGGAAGGTGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCTGGACGCCGTGGTGGTGGCCTG<br>CTCCACCGTGGCCATGCAGCAGAAGATCACCCGGTTCGTGCGGTACAAGGAGATGAACGCCTTCGACGGCAAGACCATCGAC<br>AAGGAGACCGGCAAGGTGCTGCACCAGAAGACCCACTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGGTGATGATCCGGG<br>TGTTCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCTGCGGACCCTGCTGGCCGAGAAGC<br>TGTCCTCCCGGCCCGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCCCTGTTCGTGTCCCGGGCCCCCAACCGGAAGATGTCCGGCG<br>CCCACAAGGACACCCTGCGGTCCGCCAAGCGGTTCGTGAAGCACAACGAGAAGATCTCCGTGAAGCGGGTGTGGCTGACCGA<br>GATCAAGCTGGCCGACCTGGAGAACATGGTGAACTACAAGAACGGCCGGGAGATCGAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCG<br>GCTGGAGGCCTACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCTTCGACCCCAAGGACAACCCCTTCTACAAGAAGGGCGGCCAGCTGGT<br>GAAGGCCGTGCGGGTGGAGAAGACCCAGGAGTCCGGCGTGCTGCTGAACAAGAAGAACGCCTACACCATCGCCGACAACGG<br>CGACATGGTGCGGGTGGACGTGTTCTGCAAGGTGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGTACTTCATCGTGCCCATCTACGCCTGG<br>CAGGTGGCCGAGAACATCCTGCCCGACATCGACTGCAAGGGCTACCGGATCGACGACTCCTACACCTTCTGCTTCTCCCTGCA<br>CAAGTACGACCTGATCGCCTTCCAGAAGGACGAGAAGTCCAAGGTGGAGTTCGCCTACTACATCAACTGCGACTCCTCCAACG<br>GCCGGTTCTACCTGGCCTGGCACGACAAGGGCTCCAAGGAGCAGCAGTTCCGGATCTCCACCCAGAACCTGGTGCTGATCCA<br>GAAGTACCAGGTGAACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCCGGCTGAAGAAGCGGCCCCCCGTGCGG |

| | | |
|---|---|---|
| marco abierto de lectura para Nme2Cas9 codificado por ARNm M | 376 | ATGGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCGGCTCCGGCGGCGGCGCCGCCTTCAAGCCCAA<br>CCCCATCAACTACATCCTGGGCCTGGACATCGGCATCGCCTCCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGAGGAGGAGAAC<br>CCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTGCGGGTGTTCGAGCGGGCCGAGGTGCCCAAGACCGGCGACTCCCTGGCCATGGCC<br>CGGCGGCTGGCCCGGTCCGTGCGGCGGCTGACCCGGCGGCGGGCCCACCGGCTGCTGCGGGCCCGGCGGCTGCTGAAGC<br>GGGAGGGCGTGCTGCAGGCCGCCGACTTCGACGAGAACGGCCTGATCAAGTCCCTGCCCAACACCCCCTGGCAGCTGCGGG<br>CCGCCGCCCTGGACCGGAAGCTGACCCCCCTGGAGTGGTCCGCCGTGCTGCTGCACCTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGT<br>CCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCTGGGCGCCCTGCTGAAGGGCGTGGCCAACAACGCCCACGCC<br>CTGCAGACCGGCGACTTCCGGACCCCCGCCGAGCTGGCCCTGAACAAGTTCGAGAAGGAGTCCGGCCACATCCGGAACCAG<br>CGGGGCGACTACTCCCACACCTTCTCCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCTGTTCGAGAAGCAGAAGGAGTTCG<br>GCAACCCCCACGTGTCCGGCGGCCTGAAGGAGGGCATCGAGACCCTGCTGATGACCCAGCGGCCCGCCCTGTCCGGCGACG<br>CCGTGCAGAAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGT<br>TCATCTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGCTCCGAGCGGCCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCA<br>CCCTGATGGACGAGCCCTACCGGAAGTCCAAGCTGACCTACGCCCAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCCTGGAGGACACCGCCT<br>TCTTCAAGGGCCTGCGGTACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCTCCACCCTGATGGAGATGAAGGCCTACCACGCCATCTCCCG<br>GGCCCTGGAGAAGGAGGGCCTGAAGGACAAGAAGTCCCCCCTGAACCTGTCCTCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCACCGC<br>CTTCTCCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGGCCGGCTGAAGGACCGGGTGCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTG<br>AAGCACATCTCCTTCGACAAGTTCGTGCAGATCTCCCTGAAGGCCCTGCGGCGGATCGTGCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGC<br>GGTACGACGAGGCCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGATCTACCTGCCCCCCAT<br>CCCCGCCGACGAGATCCGGAACCCCGTGGTGCTGCGGGCCCTGTCCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTGGTGCGGC<br>GGTACGGCTCCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCGCCCGGGAGGTGGGCAAGTCCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGA<br>AGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAGGCCGCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCGAGC<br>CCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGCTGTACGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCCTGTACTCCGGCAAGGAGATCAACCT<br>GGTGCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGATCGACCACGCCCTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTCCTTCAACAAC<br>AAGGTGCTGGTGCTGGGCTCCGAGAACCAGAACAAGGGCAACCAGACCCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAACTCCC<br>GGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGGGTGGAGACCTCCCGGTTCCCCCGGTCCAAGAAGCAGCGGATCCTGCTGCAGAAGT |

| | | |
|---|---|---|
| | | TCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGTGCAACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACCGGTTCCTGTGCCAGTTCGTGGCCGACCA<br>CATCCTGCTGACCGGCAAGGGCAAGCGGCGGGTGTTCGCCTCCAACGGCCAGATCACCAACCTGCTGCGGGGCTTCTGGGG<br>CCTGCGGAAGGTGCGGGCCGAGAACGACCGGCACCACGCCCTGGACGCCGTGGTGGTGGCCTGCTCCACCGTGGCCATGCA<br>GCAGAAGATCACCCGGTTCGTGCGGTACAAGGAGATGAACGCCTTCGACGGCAAGACCATCGACAAGGAGACCGGCAAGGTG<br>CTGCACCAGAAGACCCACTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGGTGATGATCCGGGTGTTCGGCAAGCCCGACG<br>GCAAGCCCGAGTTCGAGGAGGCCGACACCCCCGAGAAGCTGCGGACCCTGCTGGCCGAGAAGCTGTCCTCCCGGCCCGAGG<br>CCGTGCACGAGTACGTGACCCCCCTGTTCGTGTCCCGGGCCCCCAACCGGAAGATGTCCGGCGCCCACAAGGACACCCTGC<br>GGTCCGCCAAGCGGTTCGTGAAGCACAACGAGAAGATCTCCGTGAAGCGGGTGTGGCTGACCGAGATCAAGCTGGCCGACCT<br>GGAGAACATGGTGAACTACAAGAACGGCCGGGAGATCGAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAGGCCTACGGCGG<br>CAACGCCAAGCAGGCCTTCGACCCCAAGGACAACCCCTTCTACAAGAAGGGCGGCCAGCTGGTGAAGGCCGTGCGGGTGGA<br>GAAGACCCAGGAGTCCGGCGTGCTGCTGAACAAGAAGAACGCCTACACCATCGCCGACAACGGCGACATGGTGCGGGTGGA<br>CGTGTTCTGCAAGGTGGACAAGAAGGGCAAGAACCAGTACTTCATCGTGCCCATCTACGCCTGGCAGGTGGCCGAGAACATCC<br>TGCCCGACATCGACTGCAAGGGCTACCGGATCGACGACTCCTACACCTTCTGCTTCTCCCTGCACAAGTACGACCTGATCGCC<br>TTCCAGAAGGACGAGAAGTCCAAGGTGGAGTTCGCCTACTACATCAACTGCGACTCCTCCAACGGCCGGTTCTACCTGGCCTG<br>GCACGACAAGGGCTCCAAGGAGCAGCAGTTCCGGATCTCCACCCAGAACCTGGTGCTGATCCAGAAGTACCAGGTGAACGAG<br>CTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCCGGCTGAAGAAGCGGCCCCCCGTGCGGTCCGAGTCCGCCACCCCCGAGTCCGTGTCC<br>GGCTGGCGGCTGTTCAAGAAGATCTCCTAG |
| marco abierto de lectura para Nme2Cas9 codificado por ARNm N | 377 | atgGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCGGCTCCGGCGGCGGCgccgccttcaagcccaaccccatcaa<br>ctacatcctgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggctgggccatggtggagatcgacgaggaggagaaccccatccggctgatcgacctgggcgtgcgggtgttcgagcgggcc<br>gaggtgcccaagaccggcgactccctggccatggcccggcggctggcccggtccgtgcggcggctgacccggcggcgggcccaccggctgctgcgggcccggcggctgctgaagc<br>gggagggcgtgctgcaggccgccgacttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgcccaacacccccctggcagctgcgggccgccgccctggaccggaagctgacccccctggag<br>tggtccgccgtgctgctgcacctgatcaagcaccggggctacctgtcccagcggaagaacgagggcgagaccgccgacaaggagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaaca<br>acgcccacgccctgcagaccggcgacttccggacccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaaggagtccggccacatccggaaccagcggggcgactactcccacaccttc<br>tcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaacccccacgtgtccggcggcctgaaggagggcatcgagaccctgctgatgacccag<br>cggcccgccctgtccggcgacgccgtgcagaagatgctgggccactgcaccttcgagcccgccgagcccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgac |

| | | |
|---|---|---|
| | | caagctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagcggcccctgaccgacaccgagcgggccaccctgatggacgagccctaccggaagtccaagctgacctacgcccag<br>gcccggaagctgctgggcctggaggacaccgccttcttcaagggcctgcggtacggcaaggacaacgccgaggcctccaccctgatggagatgaaggcctaccacgccatctcccgg<br>gccctggagaaggagggcctgaaggacaagaagtccccccctgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatcggcaccgccttctccctgttcaagaccgacgaggacatcaccggc<br>cggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggaggccctgctgaagcacatctccttcgacaagttcgtgcagatctccctgaaggccctgcggcggatcgtgcccctgatggagca<br>gggcaagcggtacgacgaggcctgcgccgagatctacggcgaccactacggcaagaagaacaccgaggagaagatctacctgccccccatccccgccgacgagatccggaaccc<br>cgtggtgctgcgggccctgtcccaggcccggaaggtgatcaacggcgtggtgcggcggtacggctcccccgcccggatccacatcgagaccgcccgggaggtgggcaagtccttcaa<br>ggaccggaaggagatcgagaagcggcaggaggagaaccggaaggaccgggagaaggccgccgccaagttccgggagtacttccccaacttcgtgggcgagccaagtccaagg<br>acatcctgaagctgcggctgtacgagcagcagcacggcaagtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgc<br>ccttctcccggacctgggacgactccttcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaaccagaacaagggcaaccagacccccctacgagtacttcaacggcaaggacaactccc<br>gggagtggcaggagttcaaggcccgggtggagacctcccggttcccccggtccaagaagcagcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaac<br>gacacccggtacgtgaaccggttcctgtgccagttcgtggccgaccacatcctgctgaccggcaagggcaagcggcgggtgttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctgcggg<br>gcttctggggcctgcggaaggtgcgggccgagaacgaccggcaccacgccctggacgccgtggtggtggcctgctccaccgtggccatgcagcagaagatcacccggttcgtgcggt<br>acaaggagatgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccggcaaggtgctgcaccagaagacccacttccccccagccctgggagttcttcgcccaggaggtgatgatc<br>cgggtgttcggcaagcccgacggcaagcccgagttcgaggaggccgacacccccgagaagctgcggaccctgctggccgagaagctgtcctcccggcccgaggccgtgcacgagt<br>acgtgaccccccctgttcgtgtcccgggcccccaaccggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggtccgccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagc<br>gggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaacatggtgaactacaagaacggccgggagatcgagctgtacgaggccctgaaggcccggctggaggcctacggcgg<br>caacgccaagcaggccttcgaccccaaggacaacccccttctacaagaagggcggccagctggtgaaggccgtgcgggtggagaagacccaggagtccggcgtgctgctgaacaag<br>aagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggtggacgtgttctgcaaggtggacaagaagggcaagaaccagtacttcatcgtgcccatctacgcctggcaggtg<br>gccgagaacatcctgcccgacatcgactgcaagggctaccggatcgacgactcctacaccttctgcttctccctgcacaagtacgacctgatcgccttccagaaggacgagaagtccaa<br>ggtggagttcgcctactacatcaactgcgactcctccaacggccggttctacctggcctggcacgacaagggctccaaggagcagcagttccggatctccacccagaacctggtgctgat<br>ccagaagtaccaggtgaacgagctgggcaaggagatccggccctgccggctgaagaagcggccccccgtgcggTCCGGAAAGCGGACCGCCGACGGCTCCGG<br>AGGAGGAAGCCCCGCCGCCAAGAAGAAGAAGCTGGACtag |
| marco abierto de lectura para | 378 | atgGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGC<br>CAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCGGCTCCGGCGGCGGCgccgccttcaagcccaaccccatcaactacatcctgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggc<br>tgggccatggtggagatcgacgaggaggagaaccccatccggctgatcgacctgggcgtgcgggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagaccggcgactccctggccatggcccg |

| | | |
|---|---|---|
| Nme2Cas9 codificado por ARNm O | | gcggctggcccggtccgtgcggcggctgacccggcggcgggcccaccggctgctgcgggcccggcggctgctgaagcgggagggcgtgctgcaggccgccgacttcgacgagaac<br>ggcctgatcaagtccctgcccaacacccccctggcagctgcgggccgccgccctggaccggaagctgacccccctggagtggtccgccgtgctgctgcacctgatcaagcaccggggct<br>acctgtcccagcggaagaacgagggcgagaccgccgacaaggagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaacaacgcccacgccctgcagaccggcgacttccggacccccc<br>gccgagctggccctgaacaagttcgagaaggagtccggccacatccggaaccagcggggcgactactcccacaccttctcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcg<br>agaagcagaaggagttcggcaacccccacgtgtccggcggcctgaaggagggcatcgagaccctgctgatgacccagcggcccgccctgtccggcgacgccgtgcagaagatgct<br>gggccactgcaccttcgagcccgccgagcccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgaccaagctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccg<br>agcggcccctgaccgacaccgagcgggccaccctgatggacgagccctaccggaagtccaagctgacctacgcccaggcccggaagctgctgggcctggaggacaccgccttcttc<br>aagggcctgcggtacggcaaggacaacgccgaggcctccaccctgatggagatgaaggcctaccacgccatctcccgggccctggagaaggagggcctgaaggacaagaagtcc<br>cccctgaacctgtcctccgagctgcaggacgagatcggcaccgccttctccctgttcaagaccgacgaggacatcaccggccggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggag<br>gccctgctgaagcacatctccttcgacaagttcgtgcagatctccctgaaggccctgcggcggatcgtgcccctgatggagcagggcaagcggtacgacgaggcctgcgccgagatcta<br>cggcgaccactacggcaagaagaacaccgaggagaagatctacctgccccccatccccgccgacgagatccggaaccccgtggtgctgcgggccctgtcccaggcccggaaggtg<br>atcaacggcgtggtgcggcggtacggctcccccgcccggatccacatcgagaccgcccgggaggtgggcaagtccttcaaggaccggaaggagatcgagaagcggcaggaggag<br>aaccggaaggaccgggagaaggccgccgccaagttccgggagtacttccccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcagcacg<br>gcaagtgcctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgcccttctcccggacctgggacgactccttcaacaacaa<br>ggtgctggtgctgggctccgagaaccagaacaagggcaaccagacccccctacgagtacttcaacggcaaggacaactcccgggagtggcaggagttcaaggcccgggtggagacc<br>tcccggttcccccggtccaagaagcagcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaacgacacccggtacgtgaaccggttcctgtgccagttcgt<br>ggccgaccacatcctgctgaccggcaagggcaagcggcgggtgttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctgcggggcttctggggcctgcggaaggtgcgggccgagaacg<br>accggcaccacgccctggacgccgtggtggtggcctgctccaccgtggccatgcagcagaagatcacccggttcgtgcggtacaaggagatgaacgccttcgacggcaagaccatcg<br>acaaggagaccggcaaggtgctgcaccagaagacccacttcccccagccctgggagttcttcgcccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagcccgacggcaagcccgagttcg<br>aggaggccgacacccccgagaagctgcggaccctgctggccgagaagctgtcctcccggcccgaggccgtgcacgagtacgtgacccccctgttcgtgtcccgggccccaaccgg<br>aagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcggtccgccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctgga<br>gaacatggtgaactacaagaacggccgggagatcgagctgtacgaggccctgaaggcccggctggaggcctacggcggcaacgccaagcaggccttcgaccccaaggacaaccc<br>cttctacaagaagggcggccagctggtgaaggccgtgcgggtggagaagacccaggagtccggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatg<br>gtgcgggtggacgtgttctgcaaggtggacaagaagggcaagaaccagtacttcatcgtgcccatctacgcctggcaggtggccgagaacatcctgcccgacatcgactgcaagggct<br>accggatcgacgactcctacaccttctgcttctccctgcacaagtacgacctgatcgccttccagaaggacgagaagtccaaggtggagttcgcctactacatcaactgcgactcctccaa |

| | | |
|---|---|---|
| | | cggccggttctacctggcctggcacgacaagggctccaaggagcagcagttccggatctccacccagaacctggtgctgatccagaagtaccaggtgaacgagctgggcaaggagat ccggccctgccggctgaagaagcggccccccgtgcggtag |
| marco abierto de lectura para Nme2Cas9 codificado por ARNm P | 379 | atgGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGC<br>CAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCGGCTCCGGCGGCGGCGCCGCCTTCAAGCCCAACCCCATCAACTACATCCTGGGCCTGGAC<br>ATCGGCATCGCCTCCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGAGGAGGAGAACCCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTG<br>CGGGTGTTCGAGCGGGCCGAGGTGCCCAAGACCGGCGACTCCCTGGCCATGGCCCGGCGGCTGGCCCGGTCCGTGCGGCG<br>GCTGACCCGGCGGCGGGCCCACCGGCTGCTGCGGGCCCGGCGGCTGCTGAAGCGGGAGGGCGTGCTGCAGGCCGCCGAC<br>TTCGACGAGAACGGCCTGATCAAGTCCCTGCCCAACACCCCCTGGCAGCTGCGGGCCGCCGCCCTGGACCGGAAGCTGACC<br>CCCCTGGAGTGGTCCGCCGTGCTGCTGCACCTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGTCCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACC<br>GCCGACAAGGAGCTGGGCGCCCTGCTGAAGGGCGTGGCCAACAACGCCCACGCCCTGCAGACCGGCGACTTCCGGACCCCC<br>GCCGAGCTGGCCCTGAACAAGTTCGAGAAGGAGTCCGGCCACATCCGGAACCAGCGGGGCGACTACTCCCACACCTTCTCCC<br>GGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCTGTTCGAGAAGCAGAAGGAGTTCGGCAACCCCCACGTGTCCGGCGGCCTGAA<br>GGAGGGCATCGAGACCCTGCTGATGACCCAGCGGCCCGCCCTGTCCGGCGACGCCGTGCAGAAGATGCTGGGCCACTGCAC<br>CTTCGAGCCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGTTCATCTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTG<br>CGGATCCTGGAGCAGGGCTCCGAGCGGCCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCCTGATGGACGAGCCCTACCGGAAGTCC<br>AAGCTGACCTACGCCCAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCCTGGAGGACACCGCCTTCTTCAAGGGCCTGCGGTACGGCAAGGAC<br>AACGCCGAGGCCTCCACCCTGATGGAGATGAAGGCCTACCACGCCATCTCCCGGGCCCTGGAGAAGGAGGGCCTGAAGGAC<br>AAGAAGTCCCCCCTGAACCTGTCCTCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCACCGCCTTCTCCCTGTTCAAGACCGACGAGGACAT<br>CACCGGCCGGCTGAAGGACCGGGTGCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCACATCTCCTTCGACAAGTTCGTGCAG<br>ATCTCCCTGAAGGCCCTGCGGCGGATCGTGCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGGCCTGCGCCGAGATCTAC<br>GGCGACCACTACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGATCTACCTGCCCCCCATCCCCGCCGACGAGATCCGGAACCCCGTGG<br>TGCTGCGGGCCCTGTCCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTGGTGCGGCGGTACGGCTCCCCCGCCCGGATCCACATCG<br>AGACCGCCCGGGAGGTGGGCAAGTCCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGG<br>GAGAAGGCCGCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCGAGCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGC<br>TGTACGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCCTGTACTCCGGCAAGGAGATCAACCTGGTGCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GATCGACCACGCCCTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTCCTTCAACAACAAGGTGCTGGTGCTGGGCTCCGAGAACCAG<br>AACAAGGGCAACCAGACCCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAACTCCCGGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGGGTGG<br>AGACCTCCCGGTTCCCCCGGTCCAAGAAGCAGCGGATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGTGCAACCT<br>GAACGACACCCGGTACGTGAACCGGTTCCTGTGCCAGTTCGTGGCCGACCACATCCTGCTGACCGGCAAGGGCAAGCGGCG<br>GGTGTTCGCCTCCAACGGCCAGATCACCAACCTGCTGCGGGGCTTCTGGGGCCTGCGGAAGGTGCGGGCCGAGAACGACCG<br>GCACCACGCCCTGGACGCCGTGGTGGTGGCCTGCTCCACCGTGGCCATGCAGCAGAAGATCACCCGGTTCGTGCGGTACAA<br>GGAGATGAACGCCTTCGACGGCAAGACCATCGACAAGGAGACCGGCAAGGTGCTGCACCAGAAGACCCACTTCCCCCAGCCC<br>TGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGGTGATGATCCGGGTGTTCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCGAGGAGGCCGACACC<br>CCCGAGAAGCTGCGGACCCTGCTGGCCGAGAAGCTGTCCTCCCGGCCCGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCCCTGTTC<br>GTGTCCCGGGCCCCCAACCGGAAGATGTCCGGCGCCCACAAGGACACCCTGCGGTCCGCCAAGCGGTTCGTGAAGCACAAC<br>GAGAAGATCTCCGTGAAGCGGGTGTGGCTGACCGAGATCAAGCTGGCCGACCTGGAGAACATGGTGAACTACAAGAACGGCC<br>GGGAGATCGAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAGGCCTACGGCGGCAACGCCAAGCAGGCCTTCGACCCCAAGG<br>ACAACCCCTTCTACAAGAAGGGCGGCCAGCTGGTGAAGGCCGTGCGGGTGGAGAAGACCCAGGAGTCCGGCGTGCTGCTGA<br>ACAAGAAGAACGCCTACACCATCGCCGACAACGGCGACATGGTGCGGGTGGACGTGTTCTGCAAGGTGGACAAGAAGGGCAA<br>GAACCAGTACTTCATCGTGCCCATCTACGCCTGGCAGGTGGCCGAGAACATCCTGCCCGACATCGACTGCAAGGGCTACCGG<br>ATCGACGACTCCTACACCTTCTGCTTCTCCCTGCACAAGTACGACCTGATCGCCTTCCAGAAGGACGAGAAGTCCAAGGTGGA<br>GTTCGCCTACTACATCAACTGCGACTCCTCCAACGGCCGGTTCTACCTGGCCTGGCACGACAAGGGCTCCAAGGAGCAGCAGT<br>TCCGGATCTCCACCCAGAACCTGGTGCTGATCCAGAAGTACCAGGTGAACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCCGGCT<br>GAAGAAGCGGCCCCCCGTGCGGTCCGAGTCCGCCACCCCCGAGTCCGTGTCCGGCTGGCGGCTGTTCAAGAAGATCTCCTA<br>G |
| marco abierto de lectura para Nme2Cas9 codificado por | 380 | atgGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGC<br>GGCTCCGGCGGCGGCgccgccttcaagcccaaccccatcaactacatcctgggcctggacatcggcatcgcctccgtgggctgggccatggtggagatcgacgaggagga<br>gaaccccatccggctgatcgacctgggcgtgcgggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagaccggcgactccctggccatggcccggcggctggcccggtccgtgcggcggctgac<br>ccggcggcgggcccaccggctgctgcgggcccggcggctgctgaagcgggagggcgtgctgcaggccgccgacttcgacgagaacggcctgatcaagtccctgcccaacacccccct<br>ggcagctgcgggccgccgccctggaccggaagctgacccccctggagtggtccgccgtgctgctgcacctgatcaagcaccggggctacctgtcccagcggaagaacgagggcgag |

| | | |
|---|---|---|
| ARNm Q | | accgccgacaaggagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaacaacgcccacgccctgcagaccggcgacttccggacccccgccgagctggccctgaacaagttcgagaag<br>gagtccggccacatccggaaccagcggggcgactactcccacaccttctcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagcagaaggagttcggcaacccccac<br>gtgtccggcggcctgaaggagggcatcgagaccctgctgatgacccagcggcccgccctgtccggcgacgccgtgcagaagatgctgggccactgcaccttcgagcccgccgagccc<br>aaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgaccaagctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagcggcccctgaccgacaccgagcgggcca<br>ccctgatggacgagccctaccggaagtccaagctgacctacgcccaggcccggaagctgctgggcctggaggacaccgccttcttcaagggcctgcggtacggcaaggacaacgcc<br>gaggcctccaccctgatggagatgaaggcctaccacgccatctcccgggccctggagaaggagggcctgaaggacaagaagtccccccctgaacctgtcctccgagctgcaggacga<br>gatcggcaccgccttctccctgttcaagaccgacgaggacatcaccggccggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggaggccctgctgaagcacatctccttcgacaagttcg<br>tgcagatctccctgaaggccctgcggcggatcgtgcccctgatggagcagggcaagcggtacgacgaggcctgcgccgagatctacggcgaccactacggcaagaagaacaccga<br>ggagaagatctacctgccccccatccccgccgacgagatccggaaccccgtggtgctgcgggccctgtcccaggcccggaaggtgatcaacggcgtggtgcggcggtacggctcccc<br>cgcccggatccacatcgagaccgcccgggaggtgggcaagtccttcaaggaccggaaggagatcgagaagcggcaggaggagaaccggaaggaccgggagaaggccgccgc<br>caagttccgggagtacttccccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcagcacggcaagtgcctgtactccggcaaggagatcaac<br>ctggtgcggctgaacgagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgcccttctcccggacctgggacgactccttcaacaacaaggtgctggtgctgggctccgagaaccagaaca<br>agggcaaccagacccccctacgagtacttcaacggcaaggacaactcccgggagtggcaggagttcaaggcccgggtggagacctcccggttcccccggtccaagaagcagcggat<br>cctgctgcagaagttcgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaacgacacccggtacgtgaaccggttcctgtgccagttcgtggccgaccacatcctgctgaccggcaagggc<br>aagcggcgggtgttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctgcggggcttctggggcctgcggaaggtgcgggccgagaacgaccggcaccacgccctggacgccgtggtggt<br>ggcctgctccaccgtggccatgcagcagaagatcacccggttcgtgcggtacaaggagatgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggagaccggcaaggtgctgcaccaga<br>agacccacttcccccagccctgggagttcttcgcccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagcccgacggcaagcccgagttcgaggaggccgacacccccgagaagctgcgga<br>ccctgctggccgagaagctgtcctcccggcccgaggccgtgcacgagtacgtgacccccctgttcgtgtcccgggcccccaaccggaagatgtccggcgcccacaaggacaccctgcg<br>gtccgccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaacatggtgaactacaagaacggccgggag<br>atcgagctgtacgaggccctgaaggcccggctggaggcctacggcggcaacgccaagcaggccttcgaccccaaggacaaccccttctacaagaagggcggccagctggtgaagg<br>ccgtgcgggtggagaagacccaggagtccggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggtggacgtgttctgcaaggtggacaag<br>aagggcaagaaccagtacttcatcgtgcccatctacgcctggcaggtggccgagaacatcctgcccgacatcgactgcaagggctaccggatcgacgactcctacaccttctgcttctcc<br>ctgcacaagtacgacctgatcgccttccagaaggacgagaagtccaaggtggagttcgcctactacatcaactgcgactcctccaacggccggttctacctggcctggcacgacaaggg<br>ctccaaggagcagcagttccggatctccacccagaacctggtgctgatccagaagtaccaggtgaacgagctgggcaaggagatccggccctgccggctgaagaagcggccccccg<br>tgcggtag |

| | | |
|---|---|---|
| Marco abierto de lectura para editor de base Nme2Cas9 codificado por ARNm S | 381 | ATGGACGGCTCCGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGAGGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGG<br>CCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCGGCTCCGGCGGCGGCGAGGCCTCCCCCGCCTCCGGCCCCCGGCACCTGATGGACCCCC<br>ACATCTTCACCTCCAACTTCAACAACGGCATCGGCCGGCACAAGACCTACCTGTGCTACGAGGTGGAGCGGCTGGACAACGG<br>CACCTCCGTGAAGATGGACCAGCACCGGGGCTTCCTGCACAACCAGGCCAAGAACCTGCTGTGCGGCTTCTACGGCCGGCAC<br>GCCGAGCTGCGGTTCCTGGACCTGGTGCCCTCCCTGCAGCTGGACCCCGCCCAGATCTACCGGGTGACCTGGTTCATCTCCT<br>GGTCCCCCTGCTTCTCCTGGGGCTGCGCCGGCGAGGTGCGGGCCTTCCTGCAGGAGAACACCCACGTGCGGCTGCGGATCT<br>TCGCCGCCCGGATCTACGACTACGACCCCCTGTACAAGGAGGCCCTGCAGATGCTGCGGGACGCCGGCGCCCAGGTGTCCA<br>TCATGACCTACGACGAGTTCAAGCACTGCTGGGACACCTTCGTGGACCACCAGGGCTGCCCCTTCCAGCCCTGGGACGGCCT<br>GGACGAGCACTCCCAGGCCCTGTCCGGCCGGCTGCGGGCCATCCTGCAGAACCAGGGCAACTCCGGCTCCGAGACCCCCGG<br>CACCTCCGAGTCCGCCACCCCCGAGTCCGCAGCGTTCAAACCAAATcccatcaactacatcctgggcctggccatcggcatcgcctccgtgggctgggcc<br>atggtggagatcgacgaggaggagaaccccatccggctgatcgacctgggcgtgcgggtgttcgagcgggccgaggtgcccaagaccggcgactccctggccatggcccggcggct<br>ggcccggtccgtgcggcggctgacccggcggcgggcccaccggctgctgcgggcccggcggctgctgaagcgggagggcgtgctgcaggccgccgacttcgacgagaacggcctg<br>atcaagtccctgcccaacacccccctggcagctgcgggccgccgccctggaccggaagctgacccccctggagtggtccgccgtgctgctgcacctgatcaagcaccggggctacctgtc<br>ccagcggaagaacgagggcgagaccgccgacaaggagctgggcgccctgctgaagggcgtggccaacaacgcccacgccctgcagaccggcgacttccggacccccgccgag<br>ctggccctgaacaagttcgagaaggagtccggccacatccggaaccagcggggcgactactcccacaccttctcccggaaggacctgcaggccgagctgatcctgctgttcgagaagc<br>agaaggagttcggcaaccccccacgtgtccggcggcctgaaggagggcatcgagaccctgctgatgacccagcggcccgccctgtccggcgacgccgtgcagaagatgctgggccac<br>tgcaccttcgagcccgccgagcccaaggccgccaagaacacctacaccgccgagcggttcatctggctgaccaagctgaacaacctgcggatcctggagcagggctccgagcggcc<br>cctgaccgacaccgagcgggccaccctgatggacgagccctaccggaagtccaagctgacctacgcccaggcccggaagctgctgggcctggaggacaccgccttcttcaagggcct<br>gcggtacggcaaggacaacgccgaggcctccaccctgatggagatgaaggcctaccacgccatctcccgggccctggagaaggagggcctgaaggacaagaagtccccccctgaa<br>cctgtcctccgagctgcaggacgagatcggcaccgccttctccctgttcaagaccgacgaggacatcaccggccggctgaaggaccgggtgcagcccgagatcctggaggccctgctg<br>aagcacatctccttcgacaagttcgtgcagatctccctgaaggccctgcggcggatcgtgcccctgatggagcagggcaagcggtacgacgaggcctgcgccgagatctacggcgacc<br>actacggcaagaagaacaccgaggagaagatctacctgccccccatccccgccgacgagatccggaaccccgtggtgctgcgggccctgtcccaggcccggaaggtgatcaacgg<br>cgtggtgcggcggtacggctcccccgcccggatccacatcgagaccgcccgggaggtgggcaagtccttcaaggaccggaaggagatcgagaagcggcaggaggagaaccgga<br>aggaccgggagaaggccgccgccaagttccgggagtacttccccaacttcgtgggcgagcccaagtccaaggacatcctgaagctgcggctgtacgagcagcagcacggcaagtgc<br>ctgtactccggcaaggagatcaacctggtgcggctgaacgagaagggctacgtggagatcgaccacgccctgcccttctcccggacctgggacgactccttcaacaacaaggtgctggt |

| | | |
|---|---|---|
| | | gctgggctccgagaaccagaacaagggcaaccagacccctacgagtacttcaacggcaaggacaactcccgggagtggcaggagttcaaggcccgggtggagacctcccggttc<br>ccccggtccaagaagcagcggatcctgctgcagaagttcgacgaggacggcttcaaggagtgcaacctgaacgacacccggtacgtgaaccgcttcctgtgccagttcgtggccgacc<br>acatcctgctgaccggcaagggcaagcggcgggtgttcgcctccaacggccagatcaccaacctgctgcggggcttctggggcctgcggaaggtgcgggccgagaacgaccggcac<br>cacgccctggacgccgtggtggtggcctgctccaccgtggccatgcagcagaagatcacccggttcgtgcggtacaaggagatgaacgccttcgacggcaagaccatcgacaaggag<br>accggcaaggtgctgcaccagaagacccacttcccccagccctgggagttcttcgcccaggaggtgatgatccgggtgttcggcaagcccgacggcaagcccgagttcgaggaggcc<br>gacacccccgagaagctgcggaccctgctggccgagaagctgtcctcccggcccgaggccgtgcacgagtacgtgacccccctgttcgtgtcccgggcccccaaccggaagatgtcc<br>ggcgcccacaaggacaccctgcggtccgccaagcggttcgtgaagcacaacgagaagatctccgtgaagcgggtgtggctgaccgagatcaagctggccgacctggagaacatggt<br>gaactacaagaacggccgggagatcgagctgtacgaggccctgaaggcccggctggaggcctacggcggcaacgccaagcaggccttcgaccccaaggacaacccccttctacaa<br>gaagggcggccagctggtgaaggccgtgcgggtggagaagacccaggagtccggcgtgctgctgaacaagaagaacgcctacaccatcgccgacaacggcgacatggtgcgggt<br>ggacgtgttctgcaaggtggacaagaagggcaagaaccagtacttcatcgtgcccatctacgcctggcaggtggccgagaacatcctgcccgacatcgactgcaagggctaccggatc<br>gacgactcctacaccttctgcttctccctgcacaagtacgacctgatcgccttccagaaggacgagaagtccaaggtggagttcgcctactacatcaactgcgactcctccaacggccggtt<br>ctacctggcctggcacgacaagggctccaaggagcagcagttccggatctccacccagaacctggtgctgatccagaagtaccaggtgaacgagctgggcaaggagatccggccctg<br>ccggctgaagaagcggcccccccgtgcggtag |
| Marco abierto de lectura para editor de base BC22n SpyCas9 codificado por ARNm E | 382 | ATGgaggcctcccccgcctccggcccccggcacctgatggaccccacatcttcacctccAACTTCAACAACggcATCggccggCACAAGaccTACCTGTGCTA<br>CgaggtggagcggCTGGACAACggcacctccgtgAAGATGGACCAGCACcggggcTTCCTGCACAACCAGgccAAGAACCTGCTGTGCggcTT<br>CTACggccggCACgccgagCTGcggTTCCTGGACCTGgtgccctccCTGCAGCTGGACcccgccCAGATCTACcgggtgaccTGGTTCATCtccT<br>GGtccccTGCTTCtccTGGggcTGCgccggcgaggtgcgggccTTCCTGCAGgagAACaccCACgtgcggCTGcggATCTTCgccgcccggATCTAC<br>GACTACGACcccCTGTACAAGgaggccCTGCAGATGCTGcggGACgccggcgccCAGgtgtccATCATGaccTACGACgagTTCAAGCACTG<br>CTGGGACaccTTCgtgGACCACCAGggcTGCccTTCCAGcccTGGGACggcCTGGACgagCACtccCAGgccCTGtccggccggCTGcgggcc<br>ATCCTGCAGAACCAGggcAACtccggctccgagacccccggcacctccgagtccgccacccccgagtccgacaagaagtactccatcggcctggCcatcggcaccaact<br>ccgtgggctgggccgtgatcaccgacgagtacaaggtgccctccaagaagttcaaggtgctgggcaacaccgaccggcactccatcaagaagaacctgatcggcgccctgctgttcga<br>ctccggcgagaccgccgaggccacccggctgaagcggaccgcccggcggcggtacacccggcggaagaaccggatctgctacctgcaggagatcttctccaacgagatggccaag<br>gtggacgactccttcttccaccggctggaggagtccttcctggtggaggaggacaagaagcacgagcggcaccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagt<br>accccaccatctaccacctgcggaagaagctggtggactccaccgacaaggccgacctgcggctgatctacctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgag<br>ggcgacctgaaccccgacaactccgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggagaaccccatcaacgcctccggcgtggacgccaaggcc |

| | | |
|---|---|---|
| | | atcctgtccgcccggctgtccaagtcccggcggctggagaacctgatcgcccagctgcccggcgagaagaagaacggcctgttcggcaacctgatcgccctgtccctgggcctgacccc<br>caacttcaagtccaacttcgacctggccgaggacgccaagctgcagctgtccaaggacacctacgacgacgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacct<br>gttcctggccgccaagaacctgtccgacgccatcctgctgtccgacatcctgcgggtgaacaccgagatcaccaaggcccccctgtccgcctccatgatcaagcggtacgacgagcacc<br>accaggacctgaccctgctgaaggccctggtgcggcagcagctgcccgagaagtacaaggagatcttcttcgaccagtccaagaacggctacgccggctacatcgacggcggcgcct<br>cccaggaggagttctacaagttcatcaagcccatcctggagaagatggacggcaccgaggagctgctggtgaagctgaaccgggaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgac<br>aacggctccatcccccaccagatccacctgggcgagctgcacgccatcctgcggcggcaggaggacttctacccccttcctgaaggacaaccgggagaagatcgagaagatcctgacc<br>ttccggatcccctactacgtgggccccctggcccggggcaactcccggttcgcctggatgacccggaagtccgaggagaccatcacccccctggaacttcgaggaggtggtggacaagg<br>gcgcctccgcccagtccttcatcgagcggatgaccaacttcgacaagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcactccctgctgtacgagtacttcaccgtgtacaacgagctg<br>accaaggtgaagtacgtgaccgagggcatgcggaagcccgccttcctgtccggcgagcagaagaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaggtgaccgtgaagca<br>gctgaaggaggactacttcaagaagatcgagtgcttcgactccgtggagatctccggcgtggaggaccggttcaacgcctccctgggcacctaccacgacctgctgaagatcatcaagg<br>acaaggacttcctggacaacgaggagaacgaggacatcctggaggacatcgtgctgaccctgaccctgttcgaggaccgggagatgatcgaggagcggctgaagacctacgcccac<br>ctgttcgacgacaaggtgatgaagcagctgaagcggcggcggtacaccggctggggccggctgtcccggaagctgatcaacggcatccgggacaagcagtccggcaagaccatcct<br>ggacttcctgaagtccgacggcttcgccaaccggaacttcatgcagctgatccacgacgactccctgaccttcaaggaggacatccagaaggcccaggtgtccggccagggcgactcc<br>ctgcacgagcacatcgccaacctggccggctcccccgccatcaagaagggcatcctgcagaccgtgaaggtggtggacgagctggtgaaggtgatgggccggcacaagcccgaga<br>acatcgtgatcgagatggcccgggagaaccagaccacccagaagggccagaagaactcccgggagcggatgaagcggatcgaggagggcatcaaggagctgggctcccagatc<br>ctgaaggagcaccccgtggagaacacccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaacggccgggacatgtacgtggaccaggagctggacatcaaccggctgtc<br>cgactacgacgtggaccacatcgtgccccagtccttcctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgacccggtccgacaagaaccggggcaagtccgacaacgtgccctccga<br>ggaggtggtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgccaagctgatcacccagcggaagttcgacaacctgaccaaggccgagcggggcggcctgtccgagctg<br>gacaaggccggcttcatcaagcggcagctggtggagacccggcagatcaccaagcacgtggcccagatcctggactcccggatgaacaccaagtacgacgagaacgacaagctga<br>tccgggaggtgaaggtgatcaccctgaagtccaagctggtgtccgacttccggaaggacttccagttctacaaggtgcgggagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctg<br>aacgccgtggtgggcaccgccctgatcaagaagtaccccaagctggagtccgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagtccgagcaggag<br>atcggcaaggccaccgccaagtacttcttctactccaacatcatgaacttcttcaagaccgagatcaccctggccaacggcgagatccggaagcggcccctgatcgagaccaacggcg<br>agaccggcgagatcgtgtgggacaagggccgggacttcgccaccgtgcggaaggtgctgtccatgccccaggtgaacatcgtgaagaagaccgaggtgcagaccggcggcttctcc<br>aaggagtccatcctgcccaagcggaactccgacaagctgatcgcccggaagaaggactgggacccccaagaagtacggcggcttcgactccccaccgtggcctactccgtgctggtg<br>gtggccaaggtggagaagggcaagtccaagaagctgaagtccgtgaaggagctgctgggcatcaccatcatggagcggtcctccttcgagaagaaccccatcgacttcctggaggcc |

| | | |
|---|---|---|
| | | aagggctacaaggaggtgaagaaggacctgatcatcaagctgcccaagtactccctgttcgagctggagaacggccggaagcggatgctggcctccgccggcgagctgcagaaggg<br>caacgagctggccctgccctccaagtacgtgaacttcctgtacctggcctcccactacgagaagctgaagggctcccccgaggacaacgagcagaagcagctgttcgtggagcagcac<br>aagcactacctggacgagatcatcgagcagatctccgagttctccaagcgggtgatcctggccgacgccaacctggacaaggtgctgtccgcctacaacaagcaccgggacaagccc<br>atccgggagcaggccgagaacatcatccacctgttcaccctgaccaacctgggcgccccgccgccttcaagtacttcgacaccaccatcgaccggaagcggtacacctccaccaag<br>gaggtgctggacgccaccctgatccaccagtccatcaccggcctgtacgagacccggatcgacctgtcccagctgggcggcgacggcggcggctcccccaagaagaagcggaaggt<br>gTgA |

## VI. EJEMPLOS

[001020] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas modalidades descritas y no deben interpretarse como limitantes del alcance de esta descripción de ninguna manera.

### Ejemplo 1. Materiales y métodos

#### Transcripción *in vitro* (IVT) de ARNm de nucleasa

[001021] El ARNm con caperuza y poliadenilado con N1-metil pseudo-U fue generado por transcripción *in vitro* utilizando métodos de rutina. Usualmente, se linealizó con XbaI un ADN de plásmido que contenía un promotor T7, una secuencia para transcripción y una región de poliadenilación según el protocolo del fabricante. El XbaI se inactivó por calentamiento. El plásmido linealizado se purificó a partir de sales de amortiguador y enzimáticas. Se llevó a cabo la reacción IVT para generar ARNm modificado mediante incubación a 37 °C. 50 ng/μL de plásmido linealizado; GTP, ATP, CTP y N1-metil pseudo-UTP (Trilink) con una concentración de 2 mM; ARCA 10 mM (Trilink); 5 U/μL de ARN polimerasa T7; 1 U/μL de inhibidor de ribonucleasa murina (NEB); 0,004 U/μL de pirofosfatasa inorgánica de E. coli (NEB); y 1x de amortiguador de reacción. Se adicionó DNasa TURBO (ThermoFisher) a una concentración final de 0,01U/μL, y la reacción se incubó a 37°C para remover la plantilla de ADN.

[001022] El ARNm fue purificado usando un kit de limpieza de transcripción MegaClear (ThermoFisher) o un kit RNeasy Maxi (Qiagen) según los protocolos de los fabricantes. Alternativamente, el ARNm fue purificado a través de un protocolo de precipitación, que en algunos casos fue seguido por purificación basada en HPLC. Brevemente, después de la digestión de la DNasa, el ARNm se purificó usando la precipitación con LiCl, la precipitación con acetato de amonio y la precipitación con acetato de sodio. Para el ARNm purificado por HPLC, después de la precipitación y reconstitución del LiCl, el ARNm fue purificado por RP-IP HPLC (véase, por ejemplo, Kariko, et ál. *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 21 el42). Las fracciones elegidas para la agrupación se combinaron y desalinizaron mediante precipitación con acetato de sodio y etanol como se describe anteriormente. En otro método alternativo, se purificó el ARNm con un método de precipitación con LiCl seguido de una purificación adicional por filtración de flujo tangencial. Las concentraciones de ARN se determinaron midiendo la absorbancia de la luz a 260 nm (Nanodrop) y los transcritos se analizaron por electroforesis capilar por Bioanalizador (Agilent).

[001023] El ARNm de Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (Spy) se generó a partir de ADN plasmídico que codifica un marco abierto de lectura de acuerdo con las SEQ ID NO: 321 a 323 (ver secuencias en la Tabla 5). Cuando las secuencias citadas en este párrafo se mencionan a continuación con respecto a los ARN, se entiende que se debe reemplazar las T con U (que pueden ser nucleósidos modificados como se describe anteriormente). Los ARN mensajeros utilizados en los Ejemplos incluyen un casquete de 5' y una secuencia de poliadenilación de 3', por ejemplo, hasta 100 nucleótidos. Los ARN guía fueron sintetizados químicamente por vendedores comerciales o utilizando técnicas estándar de síntesis *in vitro* con nucleótidos modificados.

**Preparación celular**

[001024] Se diseñaron y utilizaron ARNsg cortos dirigidos al gen de TTR de la transtiretina de ratón, rata, humano y cynomolgus (cyno) para la lipoinfección, como se describe a continuación, en hepatocitos primarios de ratón (PMH), hepatocitos primarios de rata (PRH), hepatocitos primarios humanos (PHH) y hepatocitos primarios de cynomolgus (PCH), respectivamente. PMH, PRH, PHH, o PCH fueron descongelados y resuspendidos en medio de descongelación de hepatocitos con suplementos de recubrimiento (medio E de William (Gibco, Cat. A12176-01, lote 2039733) con dexametasona + suplemento de cóctel (Gibco, Cat. A15563, lote 2019842) y suplementos de revestimiento con contenido FBS (Gibco, Cat. A13450, lote 1970698) seguido de centrifugación. El sobrenadante fue desechado y las células granuladas resuspendidas en medio de cultivo hepatocitario más suplemento (Invitrogen, Cat. A1217601 y Gibco, Cat. CM3000). Las células se contaron y se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con Bio-coat colágeno I (ThermoFisher, Cat. 877272). Se permitió que las células sembradas se asentaran y se adhirieran durante 4-6 horas en una incubadora de cultivo tisular a 37°C y atmósfera de CO2 al 5%. Después de la incubación, las células se analizaron en busca de formación de monocapas y se lavaron una vez con medio de mantenimiento de hepatocitos (Invitrogen, Cat. A1217601 y Gibco, Cat. CM4000).

**Preparación de la formulación de LNP que contiene ARNsg y ARNm Cas9**

[001025] En general, los componentes de nanopartículas lipídicas se disolvieron en etanol al 100% en diversas proporciones molares. Los cargamentos de ARN (p. ej., ARNm Cas9 y ARNsg) se disolvieron en citrato 25 mM, NaCl 100 mM, pH 5,0, dando como resultado una concentración de carga de ARN de aproximadamente 0,45 mg/mL. Las LNP utilizadas contenían lípidos ionizables (octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-

bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo, también denominado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo), también llamado aquí lípido A, colesterol, distearoil fosfatidilcolina (DSPC), y 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metilpolioxietilenglicol 2000 (PEG2k-DMG) en una proporción molar de 50% de lípido A, 38% de colesterol, 9% DSPC, y 3% PEG2k-DMG. Las LNP fueron formuladss con una relación molar de lípido de amina a ARN fosfato (N:P) de aproximadamente 6, y una relación de ARNg a ARNm de 1:2 en peso. Las LNP utilizadas comprenden una sola especie de ARN, como el ARNm Cas9 o un ARNsg. Las LNP se preparan de manera similar con una mezcla de ARNm de Cas9 y un ARN guía.

[001026] Las LNP se prepararon mediante el uso de una técnica de flujo cruzado mediante el uso de mezcla de chorro de impacto del lípido en etanol con dos volúmenes de soluciones de ARN y un volumen de agua. El lípido en etanol se mezcló mediante una cruz mezcladora con los dos volúmenes de solución de ARN. Se mezcló una cuarta corriente de agua con la corriente de salida de la cruz a través de una T en línea (véase WO2016010840, FIG. 2). Las LNP se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente y se diluyeron adicionalmente con agua (aproximadamente 1:1 v/v). Las LNP diluidas se concentraron usando filtración de flujo tangencial en un cartucho de lámina plana (Sartorius, 100kD MWCO) y luego se intercambió el amortiguador utilizando columnas desalinizadoras (GE) PD-10 en Tris 50 mM, NaCl 45 mM, sacarosa al 5% (p/v), pH 7,5 (TSS). La mezcla resultante se filtró utilizando un filtro estéril de 0,2 µm. Las LNP finales se caracterizaron para determinar la eficiencia de encapsulación, el índice de polidispersidad y el tamaño promedio de partícula. La LNP final se almacenó a 4 °C o -80 °C hasta su uso posterior.

**Lipoinfección por ARNm de Cas9 y ARNsg**

[001027] Lipofección de ARNm de Cas9 y los ARNg utilizó formulaciones lipídicas premezcladas. El reactivo de lipofección contenía lípidos ionizables (octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo, también llamado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo), colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una proporción molar de 50% de lípido A, 38% de colesterol, 9% DSPC y 3% PEG2k-DMG. Esta mezcla se reconstituyó en etanol al 100% y luego se mezcló con cargas de ARN (p.

ej., ARNm Cas9 y ARNg) en una proporción molar de lípidos de amina a fosfato de ARN (N:P) de aproximadamente 6,0. Proveedores comerciales sintetizaron químicamente el ARN guía o se usaron técnicas de síntesis *in vitro* con nucleótidos modificados. Un ARNm que comprende un ORF de Cas9 de la Tabla 5 fue producido por transcripción *in vitro* (IVT) tal como se describe en WO2019/067910, véase, por ejemplo, ¶ 354, utilizando un tiempo de reacción IVT de 2 horas y purificando el ARNm por precipitación LiCl seguido por filtración de flujo tangencial.

[001028] Las lipofecciones se realizaron con una relación ARNg/ARNm de 1:1 por peso. En resumen, las células se incubaron a 37°C, $CO_2$ al 5 % durante 24 horas antes del tratamiento con las LNP. Las LNP fueron incubadas en medios con 6% de suero de mono cynomolgus o 6% de suero fetal bovino (FBS) a 37°C durante 10 minutos. Después de la incubación, las LNP se añadieron a los hepatocitos de ratón o cynomolgus en una curva de respuesta a dosis de 8 o 12 puntos y 3 veces, comenzando con 300 ng de ARNm Cas9. Las células se lisaron 72 horas después del tratamiento para el análisis de NGS como se describe en el ejemplo 1.

**Aislamiento de ADN genómico**

[001029] Las células fueron recolectadas postranfección a las 72 horas. El ADNg se extrajo de cada pocillo de una placa de 96 pocillos utilizando una solución de extracción de ADN de 50 µL/pocillo QuickExtract (Epicenter, Cat. QE09050) o Quick Extract (Lucigen, Cat. SS000035-D2) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

**Secuenciación de última generación (NGS) y análisis para mejorar la eficacia de la edición**

[001030] Para determinar cuantitativamente la eficiencia de la edición en la ubicación objetivo en el genoma, se utilizó la secuenciación para identificar la presencia de inserciones y deleciones introducidas por la edición de genes. Se diseñaron cebadores de PCR alrededor del sitio diana dentro del gen de interés (por ejemplo, TTR) y se amplificó el área genómica de interés. El diseño de la secuencia de imprimación se hizo como es estándar en el campo.

[001031] Se realizó una PCR adicional de acuerdo con los protocolos del fabricante (Illumina) para añadir química para la secuenciación. Los amplicones fueron secuenciados en un instrumento Illumina MiSeq. Las lecturas se alinearon con el genoma de referencia (p. ej., hg38) después de eliminar aquellos que tenían puntuaciones de baja calidad. Los archivos resultantes que contenían las lecturas se asignaron al genoma de referencia

(archivos BAM), donde se seleccionaron las lecturas que se solapaban con la región objetivo de interés y se calculó el número de lecturas de tipo salvaje frente al número de lecturas que contenían una inserción o eliminación (indel).

[001032] El porcentaje de edición (por ejemplo, la «eficacia de edición» o el «porcentaje de edición») se define como el número total de lecturas de secuencia con inserciones o eliminaciones («indel») sobre el número total de lecturas de secuencia, incluido el tipo salvaje.

**Ejemplo 2. Edición *in vitro* en hepatocitos primarios**

[001033] Los ARNsg que comparten la misma secuencia de segmentación, que es reactiva cruzada a los genes TTR de ratón, mono cynomolgus y humano, con varias secuencias de andamios se diseñaron como se muestra en las Tablas 2A-2B y se lipoinfectaron en hepatocitos primarios de ratón (PMH), mono cynomolgus (PCH) y humanos (PHH). Se prepararon células de ADMET Laboratories, Inc. y Gibco™ *in vitro*, se trataron mediante lipofección y se analizaron como se describe anteriormente a menos que se indique lo contrario. Específicamente, las células PMH (n.° lote 839), PCH (n.° lote 10136011) y PHH (n.° lote 8296) fueron utilizadas y sembradas a densidades de 15 000, 30 000 y 33 000 células/pocillo, respectivamente. El reactivo de lipofección se preparó como se describe en el Ejemplo 1 utilizando una proporción molar de 50% de lípido A, 38% de colesterol, 9% de DSPC y 3 % de PEG2k-DMG. Las muestras de lipofección se prepararon utilizando una relación molar N:P de aproximadamente 6 y una relación ARNg:ARNm de 1:1 en peso. Se incluyeron muestras duplicadas en el ensayo. Los resultados de media de edición con desviación estándar (SD) se muestran en la Tabla 6 y la Fig. 1A para PMH, la Fig. 1B para PCH y la Fig. 1C para PHH. El valor NA indica que una de las réplicas de una guía no cumplía los criterios de calidad de la secuenciación, por lo que no se podía calcular la desviación estándar.

**Tabla 6. Edición *in vitro* en PMH, PCH, PHH**

| ID de guía | PMH | | PCH | | PHH | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Media % edición | SD | Media % edición | SD | Media % edición | SD |
| G018707 | 93,1 | 0,8 | 93,3 | 1,8 | 52,2 | 0,6 |
| G018675 | 91,5 | 3,5 | 82,0 | NA | 49,8 | 8,8 |
| G018681 | 90,7 | 3,1 | 91,1 | 1,3 | 52,4 | 12,0 |

| ID de guía | PMH | | PCH | | PHH | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Media % edición | SD | Media % edición | SD | Media % edición | SD |
| G018706 | 90,7 | 3,3 | 90,3 | NA | 61,5 | 0,1 |
| G018668 | 89,8 | 1,3 | 73,4 | 3,4 | 37,9 | 4,3 |
| G018684 | 89,7 | 4,4 | 85,2 | 5,1 | 65,6 | NA |
| G018695 | 89,6 | 2,8 | 84,1 | 3,7 | 28,1 | 1,6 |
| G018683 | 89,4 | 2,0 | 79,3 | 11,7 | 56,6 | 1,1 |
| G018674 | 88,9 | 7,1 | 85,2 | 10,2 | 42,1 | 5,5 |
| G018687 | 88,7 | 2,5 | 93,5 | 2,1 | 51,6 | 5,9 |
| G018667 | 88,3 | 3,2 | 79,1 | 1,3 | 40,1 | 8,8 |
| G018689 | 88,2 | 1,2 | 85,1 | 4,4 | 60,3 | 13,2 |
| G018685 | 88,0 | 4,1 | 78,0 | 5,7 | 46,8 | 3,7 |
| G018698 | 88,0 | 2,3 | 90,0 | 1,6 | 50,1 | 0,4 |
| G018694 | 87,8 | 7,5 | 91,3 | NA | 42,5 | 9,7 |
| G018705 | 87,8 | 1,4 | 88,1 | 4,0 | 57,7 | 1,8 |
| G018677 | 87,6 | 3,6 | 76,5 | 7,8 | 45,0 | 2,2 |
| G018690 | 87,4 | 3,0 | 91,9 | 0,5 | 60,3 | 7,6 |
| G000502 | 87,1 | 7,2 | 90,2 | 6,4 | 52,5 | 4,2 |
| G018702 | 86,4 | 1,1 | 85,0 | 1,1 | 32,9 | 0,8 |
| G018682 | 86,0 | 9,3 | 77,2 | NA | 37,8 | 16,6 |
| G018686 | 86,0 | 5,0 | 87,3 | 5,1 | 46,1 | 6,7 |
| G018700 | 85,8 | 12,2 | 84,3 | NA | 41,7 | 0,3 |
| G018676 | 84,8 | 0,1 | 87,0 | 2,8 | 42,4 | 8,1 |
| G018669 | 82,0 | 3,6 | 79,2 | 2,4 | 35,5 | 0,6 |
| G018693 | 81,7 | 8,8 | 82,5 | 5,4 | 42,0 | 6,6 |
| G018692 | 81,6 | 7,6 | 86,4 | 3,9 | 49,2 | 8,9 |
| G018688 | 81,3 | 4,8 | 87,9 | 2,1 | 57,0 | 4,4 |
| G018666 | 80,8 | 6,4 | 85,4 | 3,9 | 25,0 | 1,1 |
| G018701 | 80,1 | 2,7 | 77,5 | 12,3 | 26,1 | 2,8 |
| G018673 | 80,0 | 8,9 | 89,2 | 3,3 | 36,1 | 0,2 |
| G018678 | 78,8 | 2,5 | 81,0 | 2,2 | 28,8 | 7,4 |
| G018696 | 76,7 | 7,4 | 87,3 | 3,5 | 36,4 | 3,9 |
| G018699 | 76,1 | 0,4 | 82,1 | 8,6 | 34,3 | 6,4 |
| G018704 | 76,1 | 0,1 | 78,7 | 12,5 | 24,9 | 4,2 |
| G018691 | 75,8 | 3,3 | 90,6 | 5,2 | 43,0 | 5,0 |
| G018697 | 72,9 | 2,6 | 82,8 | 1,3 | 27,2 | 11,2 |
| G018703 | 69,5 | 0,0 | 70,6 | 4,1 | 13,8 | 4,2 |

| ID de guía | PMH | | PCH | | PHH | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Media % edición | SD | Media % edición | SD | Media % edición | SD |
| G018671 | 67,5 | 0,6 | 68,2 | 11,0 | 15,1 | 1,7 |
| G018670 | 62,3 | 4,1 | 47,7 | 9,3 | 9,6 | 0,2 |
| G018679 | 58,0 | 13,8 | 42,3 | 2,5 | 10,6 | 3,7 |
| G018672 | 55,0 % | 5,7 | 56,2 | 2,5 | 7,8 | 0,6 |
| G018708 | 50,7 | 11,6 | 71,5 | 8,1 | 14,2 | 1,3 |
| G018680 | 12,6 | 0,6 | 12,3 | NA | 1,2 | 0,4 |
| G017278 | 92,7 | 5,8 | 87,9 | 5,3 | 60,3 | 6,6 |
| G012401 | 89,7 | 4,1 | 90,6 | 1,4 | 54,1 | 4,7 |

**Ejemplo 3. Edición *in vitro* en hepatocitos primarios con curva de dilución**

[001034] Los ARNsg que tienen todos la misma secuencia diana que es reactiva cruzada con genes TTR de ratón, humano y mono cynomolgus se diseñaron con varias secuencias de andamiaje como se muestra en las Tablas 2A-2B que incorporaron conectores de polietilenglicol en diferentes regiones de la región constante de ARNsg. Los ARNm de Cas9 y guía fueron lipoinfectados en hepatocitos primarios de ratón (PMH) como se describe anteriormente. Se utilizaron células PMH (n.° lote 839) y se sembraron a una densidad de 15 000 células/pocillo. Se prepararon células de Gibco™, se trataron mediante lipofección y se analizaron como se describe anteriormente, a menos que se indique lo contrario. Las guías se analizaron en una curva de dilución de 8 puntos y 3 veces a partir de una concentración guía de 46,5 nM, como se muestra en la Tabla 7. Se probaron dos conjuntos de guías con las guías de control G000502 y G012401. Las muestras se ejecutaron en triplicado. Los valores de $EC_{50}$ y los resultados de media de edición se muestran en la Tabla 7. Las curvas de respuesta a la dosis se representan gráficamente en las figuras 2A y 2B.

Tabla 7. Porcentaje de edición en PMH

| ID de guía | Conjunto 1 | | | | Conjunto 2 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 | ID de guía | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 |
| G000502 | 46,56 | 93,3 | 2,3 | 2,32 | G000502 | 46,56 | 92,9 | 1,7 | 3,25 |

| ID de | Conjunto 1 | | | | Conjunto 2 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 15,52 | 95,4 | 1,3 | | | 15,52 | 88,1 | 6,1 | |
| | 5,17 | 81,0 | 2,5 | | | 5,17 | 65,2 | 0,1 | |
| | 1,72 | 32,9 | 2,1 | | | 1,72 | 23,1 | 0,4 | |
| | 0,57 | 6,0 | 0,1 | | | 0,57 | 4,0 | 0,7 | |
| | 0,19 | 1,1 | 0,1 | | | 0,19 | 0,8 | 0,8 | |
| | 0,06 | 0,2 | 0,1 | | | 0,06 | 0,2 | 0,0 | |
| | 0,02 | 0,1 | 0,0 | | | 0,02 | 0,1 | 0,1 | |
| G012401 | 46,56 | 97,2 | 0,1 | 2,42 | G012401 | 46,56 | 94,2 | 5,2 | 2,36 |
| | 15,52 | 95,0 | 1,4 | | | 15,52 | 92,1 | 1,6 | |
| | 5,17 | 82,3 | 2,8 | | | 5,17 | 77,8 | 4,7 | |
| | 1,72 | 31,8 | 0,6 | | | 1,72 | 33,6 | 1,1 | |
| | 0,57 | 8,2 | 0,8 | | | 0,57 | 9,0 | 1,5 | |
| | 0,19 | 1,8 | 0,5 | | | 0,19 | 1,7 | 0,2 | |
| | 0,06 | 0,1 | 0,1 | | | 0,06 | 0,9 | 0,1 | |
| | 0,02 | 0,2 | 0,1 | | | 0,02 | 0,2 | 0,1 | |
| G018804 | 46,56 | 93,2 | 5,9 | 2,87 | G018811 | 46,56 | 90,8 | 3,3 | 2,91 |
| | 15,52 | 92,2 | 5,4 | | | 15,52 | 92,5 | 4,5 | |
| | 5,17 | 75,2 | 2,3 | | | 5,17 | 69,8 | 7,4 | |
| | 1,72 | 22,0 | 1,6 | | | 1,72 | 24,8 | 3,4 | |
| | 0,57 | 4,3 | 0,9 | | | 0,57 | 3,9 | 0,4 | |
| | 0,19 | 0,7 | 0,4 | | | 0,19 | 0,6 | 0,2 | |
| | 0,06 | 0,2 | 0,0 | | | 0,06 | 0,2 | 0,1 | |
| | 0,02 | 0,2 | 0,1 | | | 0,02 | 0,2 | 0,1 | |
| G018805 | 46,56 | 93,9 | 2,7 | 3,00 | G018812 | 46,56 | 93,4 | 3,2 | 2,81 |
| | 15,52 | 96,6 | 0,8 | | | 15,52 | 87,5 | 0,4 | |
| | 5,17 | 74,8 | 7,6 | | | 5,17 | 72,4 | 3,9 | |
| | 1,72 | 21,4 | 1,2 | | | 1,72 | 24,7 | 2,5 | |
| | 0,57 | 4,0 | 1,2 | | | 0,57 | 3,8 | 0,7 | |
| | 0,19 | 0,5 | 0,1 | | | 0,19 | 0,8 | 0,4 | |
| | 0,06 | 0,2 | 0,0 | | | 0,06 | 0,4 | 0,4 | |
| | 0,02 | 0,2 | 0,0 | | | 0,02 | 0,3 | 0,1 | |
| G018806 | 46,56 | 93,0 | 0,4 | 1,60 | G018813 | 46,56 | 94,6 | 1,5 | 1,73 |
| | 15,52 | 93,2 | 4,6 | | | 15,52 | 91,1 | 4,3 | |
| | 5,17 | 87,1 | 4,6 | | | 5,17 | 84,2 | 1,5 | |
| | 1,72 | 49,1 | 2,7 | | | 1,72 | 45,6 | 1,4 | |
| | 0,57 | 15,8 | 1,6 | | | 0,57 | 16,3 | 0,8 | |
| | 0,19 | 3,6 | 0,3 | | | 0,19 | 3,5 | 0,6 | |
| | 0,06 | 0,7 | 0,2 | | | 0,06 | 0,7 | 0,3 | |

| ID de | Conjunto 1 | | | | Conjunto 2 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,02 | 0,2 | 0,1 | | | 0,02 | 0,3 | 0,0 | |
| G018807 | 46,56 | 94,3 | 4,8 | 2,21 | G018814 | 46,56 | 95,3 | 1,0 | 1,72 |
| | 15,52 | 92,3 | 3,5 | | | 15,52 | 92,7 | 0,3 | |
| | 5,17 | 83,6 | 2,8 | | | 5,17 | 85,0 | 2,5 | |
| | 1,72 | 34,4 | 4,4 | | | 1,72 | 47,2 | 2,3 | |
| | 0,57 | 8,1 | 0,4 | | | 0,57 | 12,8 | 4,5 | |
| | 0,19 | 2,4 | 0,1 | | | 0,19 | 1,9 | 0,2 | |
| | 0,06 | 0,3 | 0,1 | | | 0,06 | 0,4 | 0,2 | |
| | 0,02 | 0,8 | 0,5 | | | 0,02 | 0,2 | 0,0 | |
| G018808 | 46,56 | 96,2 | 0,5 | 4,21 | G018815 | 46,56 | 92,8 | 3,3 | 2,57 |
| | 15,52 | 90,9 | 4,8 | | | 15,52 | 91,8 | 4,7 | |
| | 5,17 | 58,9 | 1,1 | | | 5,17 | 74,0 | 3,7 | |
| | 1,72 | 13,0 | 4,9 | | | 1,72 | 30,6 | 0,8 | |
| | 0,57 | 2,7 | 0,6 | | | 0,57 | 7,4 | 1,6 | |
| | 0,19 | 0,3 | 0,0 | | | 0,19 | 1,7 | 0,5 | |
| | 0,06 | 0,3 | 0,1 | | | 0,06 | 0,6 | 0,1 | |
| | 0,02 | 0,2 | 0,1 | | | 0,02 | 0,2 | 0,1 | |
| G018809 | 46,56 | 90,0 | 2,6 | 2,84 | G018816 | 46,56 | 87,6 | 2,1 | 4,03 |
| | 15,52 | 90,8 | 2,7 | | | 15,52 | 89,7 | 1,0 | |
| | 5,17 | 70,6 | 2,1 | | | 5,17 | 57,6 | 6,3 | |
| | 1,72 | 25,0 | 1,4 | | | 1,72 | 11,8 | 0,5 | |
| | 0,57 | 5,2 | 0,5 | | | 0,57 | 1,6 | 0,4 | |
| | 0,19 | 1,3 | 0,3 | | | 0,19 | 0,4 | 0,3 | |
| | 0,06 | 0,2 | 0,0 | | | 0,06 | 0,2 | 0,1 | |
| | 0,02 | 0,3 | 0,1 | | | 0,02 | 0,2 | 0,1 | |
| G018810 | 46,56 | 94,1 | 0,1 | 2,36 | | | | | |
| | 15,52 | 91,4 | 3,7 | | | | | | |
| | 5,17 | 81,8 | 8,1 | | | | | | |
| | 1,72 | 30,8 | 7,4 | | | | | | |
| | 0,57 | 8,9 | 1,4 | | | | | | |
| | 0,19 | 1,4 | 0,7 | | | | | | |
| | 0,06 | 0,5 | 0,3 | | | | | | |
| | 0,02 | 0,2 | 0,1 | | | | | | |

[001035] Los ARNsg seleccionados de la Tabla 7 se evaluaron además en hepatocitos primarios de ratón (PMH) y hepatocitos primarios de cynomolgus (PCH), utilizando los mismos métodos para preparar, tratar mediante LNP y analizar las células descritas

anteriormente. Se utilizaron células PMH (n.° lote 839) y PCH (n.° lote CY6011) de Gibco ™ y se sembraron a una densidad de 15 000 y 30 000 células/pocillo, respectivamente. Las formulaciones de LNP se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 en una proporción molar de 50% de lípido A, 38% de colesterol, 9% de DSPC y 3% de PEG2k-DMG, usando una relación molar N:P de aproximadamente 6 y una relación 1:2 de ARNg:ARNm en peso. Se analizaron las guías en una curva de respuesta a la dosis de dilución de 8 puntos y 3 veces a partir de una concentración guía de 46,5 nM, tal como se muestra en la Tabla 8. Las muestras se ejecutaron en duplicado . Los valores de $EC_{50}$ y los resultados de media de edición para PMH y PCH se muestran en la Tabla 8. Las curvas de respuesta a la dosis se representan gráficamente en las figuras 3A y 3B, respectivamente. Los valores de $EC_{50}$ que se citaron como indefinidos se indican con «ND».

Tabla 8. Edición en PMH y PCH

| ID de guía | PMH | | | | PCH | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 |
| G012401 | 46,56 | 94,0 | 0,5 | 0,18 | 46,56 | 84,2 | 1,3 | 0,07 |
| | 15,52 | 94,4 | 4,7 | | 15,52 | 86,6 | 5,4 | |
| | 5,17 | 97,9 | 0,1 | | 5,17 | 74,7 | 0,7 | |
| | 1,72 | 92,8 | 0,1 | | 1,72 | 71,7 | 3,7 | |
| | 0,57 | 79,8 | 1,8 | | 0,57 | 74,9 | 6,9 | |
| | 0,19 | 50,4 | 2,0 | | 0,19 | 53,4 | 3,9 | |
| | 0,06 | 16,1 | 0,4 | | 0,06 | 32,9 | 0,5 | |
| | 0,02 | 4,7 | 0,9 | | 0,02 | 15,8 | 3,7 | |
| G017276 | 46,56 | 95,3 | 0,5 | 0,17 | 46,56 | 82,4 | 0,5 | 0,03 |
| | 15,52 | 93,0 | 0,4 | | 15,52 | 83,8 | 2,4 | |
| | 5,17 | 96,7 | 1,4 | | 5,17 | 84,0 | 0,6 | |
| | 1,72 | 91,2 | 9,1 | | 1,72 | 74,2 | 2,5 | |
| | 0,57 | 82,2 | 3,3 | | 0,57 | 73,5 | 6,4 | |
| | 0,19 | 52,7 | 0,1 | | 0,19 | 59,6 | 0,6 | |
| | 0,06 | 23,8 | 4,9 | | 0,06 | 45,4 | 2,6 | |
| | 0,02 | 8,4 | 1,1 | | 0,02 | 26,7 | 4,8 | |
| G018804 | 46,56 | 97,5 | 0,7 | 0,39 | 46,56 | 87,7 | 0,2 | 0,09 |
| | 15,52 | 95,9 | 3,3 | | 15,52 | 85,1 | 3,2 | |
| | 5,17 | 96,5 | 2,9 | | 5,17 | 81,3 | 6,4 | |

| ID de guía | PMH | | | | PCH | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 |
| | 1,72 | 92,0 | 2,3 | | 1,72 | 81,3 | 6,3 | |
| | 0,57 | 63,9 | 1,0 | | 0,57 | 71,4 | 7,4 | |
| | 0,19 | 24,1 | 0,1 | | 0,19 | 56,4 | 6,2 | |
| | 0,06 | 4,7 | 0,3 | | 0,06 | 31,2 | 3,9 | |
| | 0,02 | 2,0 | 0,3 | | 0,02 | 13,6 | 2,3 | |
| G018805 | 46,56 | 94,9 | 1,5 | 0,48 | 46,56 | 89,7 | 0,7 | 0,13 |
| | 15,52 | 93,5 | 0,7 | | 15,52 | 83,9 | 0,1 | |
| | 5,17 | 92,7 | 0,1 | | 5,17 | 81,3 | 1,6 | |
| | 1,72 | 91,2 | 2,2 | | 1,72 | 75,3 | 0,8 | |
| | 0,57 | 55,9 | 0,2 | | 0,57 | 72,7 | 7,0 | |
| | 0,19 | 14,3 | 0,7 | | 0,19 | 54,0 | 10,9 | |
| | 0,06 | 4,1 | 0,1 | | 0,06 | 21,9 | 4,9 | |
| | 0,02 | 0,9 | 0,2 | | 0,02 | 10,9 | 0,3 | |
| G018806 | 46,56 | 96,3 | 1,8 | 0,23 | 46,56 | 92,2 | 1,3 | 0,02 |
| | 15,52 | 93,6 | 2,7 | | 15,52 | 92,8 | 1,3 | |
| | 5,17 | 94,1 | 1,2 | | 5,17 | 85,3 | 1,4 | |
| | 1,72 | 91,2 | 6,0 | | 1,72 | 80,5 | 6,5 | |
| | 0,57 | 74,7 | 8,3 | | 0,57 | 73,5 | 3,7 | |
| | 0,19 | 42,1 | 0,8 | | 0,19 | 64,6 | 6,0 | |
| | 0,06 | 11,4 | 0,7 | | 0,06 | 37,1 | 4,6 | |
| | 0,02 | 3,4 | 1,8 | | 0,02 | 17,6 | 2,2 | |
| G018807 | 46,56 | 97,1 | 0,6 | 0,23 | 46,56 | 94,7 | 1,8 | ND |
| | 15,52 | 93,2 | 1,3 | | 15,52 | 88,8 | 2,3 | |
| | 5,17 | 93,1 | 1,3 | | 5,17 | 79,0 | 0,9 | |
| | 1,72 | 91,9 | 1,7 | | 1,72 | 80,4 | 4,3 | |
| | 0,57 | 81,3 | 4,2 | | 0,57 | 71,1 | 4,7 | |
| | 0,19 | 41,1 | 1,8 | | 0,19 | 67,2 | 6,8 | |
| | 0,06 | 17,1 | 3,2 | | 0,06 | 38,5 | 3,5 | |
| | 0,02 | 5,2 | 0,1 | | 0,02 | 19,0 | 2,9 | |
| G018808 | 46,56 | 98,0 | 0,5 | 0,47 | 46,56 | 93,0 | 0,8 | 0,1 |
| | 15,52 | 98,1 | 0,1 | | 15,52 | 85,9 | 0,6 | |
| | 5,17 | 94,1 | 3,5 | | 5,17 | 86,3 | 9,9 | |
| | 1,72 | 85,2 | 1,8 | | 1,72 | 81,5 | 0,5 | |
| | 0,57 | 58,0 | 7,0 | | 0,57 | 74,5 | 8,6 | |
| | 0,19 | 18,4 | 1,2 | | 0,19 | 48,8 | 4,7 | |

| ID de guía | PMH | | | | PCH | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 |
| | 0,06 | 4,7 | 1,6 | | 0,06 | 16,7 | 1,3 | |
| | 0,02 | 1,1 | 0,1 | | 0,02 | 6,4 | 0,3 | |
| G018809 | 46,56 | 96,2 | 1,8 | 0,3 | 46,56 | 89,6 | 1,1 | 0,12 |
| | 15,52 | 96,3 | 1,3 | | 15,52 | 87,9 | 0,9 | |
| | 5,17 | 97,2 | 2,1 | | 5,17 | 83,3 | 7,6 | |
| | 1,72 | 95,6 | 1,6 | | 1,72 | 86,9 | 6,4 | |
| | 0,57 | 69,4 | 4,2 | | 0,57 | 81,0 | 6,0 | |
| | 0,19 | 36,0 | 4,7 | | 0,19 | 57,5 | 3,8 | |
| | 0,06 | 9,7 | 0,6 | | 0,06 | 30,8 | 1,8 | |
| | 0,02 | 3,0 | 0,1 | | 0,02 | 13,7 | 0,1 | |
| G018810 | 46,56 | 95,7 | 0,4 | 0,14 | 46,56 | 92,1 | 2,3 | 0,06 |
| | 15,52 | 98,1 | 0,2 | | 15,52 | 89,4 | 2,2 | |
| | 5,17 | 92,4 | 1,4 | | 5,17 | 89,3 | 1,5 | |
| | 1,72 | 93,8 | 1,2 | | 1,72 | 82,8 | 2,1 | |
| | 0,57 | 90,1 | 3,5 | | 0,57 | 84,5 | 6,1 | |
| | 0,19 | 61,7 | 2,3 | | 0,19 | 76,3 | 7,6 | |
| | 0,06 | 21,9 | 0,1 | | 0,06 | 48,4 | 5,6 | |
| | 0,02 | 6,2 | 0,0 | | 0,02 | 23,9 | 1,3 | |

[001036] Se evaluaron ARNsg adicionales en hepatocitos primarios de ratón (PMH), hepatocitos primarios de rata (PRH) y hepatocitos primarios de cynomolgus (PCH) utilizando los mismos métodos para preparar, tratar mediante LNP y analizar las células descritas anteriormente, a menos que se indique lo contrario. Se utilizaron células PMH (n.° lote 839) y se sembraron a una densidad de 15 000 células/pocillo. Se utilizaron células PMH (n.° lote 839 o n.° lote mc114), PCH (n.° lote 10136011) y PRH (n.° lote 977A), las cuales se sembraron a densidades de 15 000, 33 000 y 30 000 células/pocillo, respectivamente. Las formulaciones de LNP se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 en una proporción molar de 50% de lípido A, 38% de colesterol, 9% de DSPC y 3% de PEG2k-DMG, usando una relación molar N:P de aproximadamente 6 y una relación 1:2 de ARNg:ARNm en peso. Las guías se analizaron en una curva de respuesta a la dosis de 12 puntos y 3 veces a partir de una concentración guía de 46,5 nM, como se muestra en las tablas 8 y 9. Los controles, G017276 y G000502, para PMH y PCH se realizaron con 6 y 4 réplicas y las muestras restantes con 4 y 2 réplicas, respectivamente. Los controles,

G017276 y G000502, para PMH y PCH se ejecutaron con 6 y 3 repeticiones y las muestras de prueba con 4 y 2 repeticiones, respectivamente. Los controles, G018631 y G022500, para PRH fueron ejecutados con 4 repeticiones y el resto de las muestras con 2 repeticiones. Los valores de $EC_{50}$ y los resultados de media de edición para PMH y PCH se muestran en la Tabla 9 y para PRH en la Tabla 10. Se trazan curvas de respuesta a la dosis para PMH, PCH y PRH en la Fig. 4A, Fig. 4B y Fig. 4C, respectivamente.

[001037] Tabla 9. Edición en PMH y PCH

| ID de guía | PMH | | | | | PCH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 |
| G017276 | 46,5 | 97,4 | 0,3 | 0,11 | 46,5 | 90,6 | 4,0 | 0,05 |
| | 15,5 | 98,0 | 0,4 | | 15,5 | 94,1 | 1,8 | |
| | 5,1 | 98,1 | 0,4 | | 5,1 | 92,4 | 2,1 | |
| | 1,7 | 97,1 | 1,1 | | 1,7 | 92,8 | 2,3 | |
| | 0,5 | 91,5 | 1,9 | | 0,5 | 85,3 | 8,4 | |
| | 0,19 | 67,7 | 6,9 | | 0,19 | 78,0 | 2,3 | |
| | 0,06 | 30,8 | 4,3 | | 0,06 | 52,8 | 5,7 | |
| | 0,02 | 8,7 | 1,6 | | 0,02 | 20,6 | 2,7 | |
| | 0,007 | 1,6 | 0,5 | | 0,007 | 5,1 | 1,3 | |
| | 0,002 | 0,3 | 0,2 | | 0,002 | 1,1 | 0,5 | |
| | 0,0007 | 0,1 | 0,1 | | 0,0007 | 0,5 | 0,2 | |
| | 0,0002 | 0,1 | 0,0 | | 0,0002 | 0,1 | 0,1 | |
| G022502 | 46,5 | 96,2 | 1,3 | 0,22 | 46,5 | 92,1 | 1,6 | 0,1 |
| | 15,5 | 97,4 | 0,6 | | 15,5 | 95,2 | 1,4 | |
| | 5,1 | 97,6 | 1,1 | | 5,1 | 88,5 | 2,0 | |
| | 1,7 | 95,1 | 1,4 | | 1,7 | 90,4 | 0,0 | |
| | 0,5 | 82,1 | 3,4 | | 0,5 | 85,2 | 0,1 | |
| | 0,19 | 41,0 | 5,9 | | 0,19 | 66,1 | 5,3 | |
| | 0,06 | 10,9 | 1,5 | | 0,06 | 30,6 | 3,3 | |
| | 0,02 | 2,2 | 0,4 | | 0,02 | 9,1 | 1,6 | |
| | 0,007 | 0,4 | 0,1 | | 0,007 | 1,5 | 0,4 | |
| | 0,002 | 0,1 | 0,1 | | 0,002 | 0,3 | 0,3 | |
| | 0,0007 | 0,1 | 0,1 | | 0,0007 | 0,1 | 0,0 | |
| | 0,0002 | 0,1 | 0,0 | | 0,0002 | 0,1 | 0,1 | |
| G022503 | 46,5 | 95,8 | 1,5 | 0,26 | 46,5 | 85,7 | 10,5 | 0,11 |

| ID de guía | PMH | | | | | PCH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 |
| | 15,5 | 97,9 | 0,8 | | 15,5 | 95,0 | 0,8 | |
| | 5,1 | 97,5 | 0,1 | | 5,1 | 94,4 | 0,5 | |
| | 1,7 | 94,5 | 1,9 | | 1,7 | 92,0 | 2,9 | |
| | 0,5 | 75,6 | 6,8 | | 0,5 | 85,6 | 5,4 | |
| | 0,19 | 33,6 | 4,9 | | 0,19 | 59,5 | 6,0 | |
| | 0,06 | 10,4 | 1,6 | | 0,06 | 32,3 | 8,6 | |
| | 0,02 | 1,8 | 0,1 | | 0,02 | 6,5 | 2,4 | |
| | 0,007 | 0,3 | 0,1 | | 0,007 | 1,1 | 0,4 | |
| | 0,002 | 0,1 | 0,1 | | 0,002 | 0,4 | 0,4 | |
| | 0,0007 | 0,1 | 0,1 | | 0,0007 | 0,0 | 0,0 | |
| | 0,0002 | 0,1 | 0,1 | | 0,0002 | 0,1 | 0,0 | |
| | 46,5 | 95,5 | 1,8 | | 46,5 | 90,2 | 2,5 | |
| | 15,5 | 97,8 | 0,5 | | 15,5 | 88,8 | 4,4 | |
| | 5,1 | 97,2 | 1,0 | | 5,1 | 93,6 | 3,0 | |
| | 1,7 | 95,9 | 1,3 | | 1,7 | 92,0 | 1,4 | |
| | 0,5 | 82,0 | 5,4 | | 0,5 | 86,2 | 1,9 | |
| G022501 | 0,19 | 43,9 | 7,6 | 0,21 | 0,19 | 67,8 | 2,9 | 0,9 |
| | 0,06 | 10,9 | 0,8 | | 0,06 | 32,4 | 3,6 | |
| | 0,02 | 2,0 | 0,8 | | 0,02 | 7,1 | 2,1 | |
| | 0,007 | 0,5 | 0,1 | | 0,007 | 1,9 | 0,6 | |
| | 0,002 | 0,1 | 0,0 | | 0,002 | 0,2 | 0,3 | |
| | 0,0007 | 0,1 | 0,1 | | 0,0007 | 0,1 | 0,1 | |
| | 0,0002 | 0,1 | 0,0 | | 0,0002 | 0,1 | 0,0 | |
| | 46,5 | 96,3 | 1,7 | | 46,5 | 91,3 | 1,1 | |
| | 15,5 | 97,7 | 0,3 | | 15,5 | 90,0 | 2,5 | |
| | 5,1 | 97,0 | 0,7 | | 5,1 | 87,2 | 8,8 | |
| | 1,7 | 92,8 | 3,3 | | 1,7 | 90,6 | 1,0 | |
| | 0,5 | 68,7 | 7,8 | | 0,5 | 83,3 | 6,4 | |
| G022504 | 0,19 | 25,9 | 2,3 | 0,32 | 0,19 | 53,8 | 3,9 | 0,14 |
| | 0,06 | 5,4 | 0,1 | | 0,06 | 19,9 | 4,4 | |
| | 0,02 | 0,7 | 0,1 | | 0,02 | 3,3 | 0,6 | |
| | 0,007 | 0,2 | 0,1 | | 0,007 | 0,7 | 0,1 | |
| | 0,002 | 0,1 | 0,0 | | 0,002 | 0,2 | 0,0 | |
| | 0,0007 | 0,1 | 0,0 | | 0,0007 | 0,2 | 0,1 | |
| | 0,0002 | 0,1 | 0,0 | | 0,0002 | 0,1 | 0,0 | |

| ID de guía | PMH | | | | | PCH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 |
| G000502 | 46,5 | 95,4 | 1,0 | 0,34 | 46,5 | 88,5 | 6,3 | 0,2 |
| | 15,5 | 97,3 | 0,4 | | 15,5 | 93,3 | 1,9 | |
| | 5,1 | 96,5 | 1,8 | | 5,1 | 93,0 | 1,5 | |
| | 1,7 | 90,5 | 4,8 | | 1,7 | 88,2 | 3,3 | |
| | 0,5 | 64,1 | 8,3 | | 0,5 | 75,4 | 1,6 | |
| | 0,19 | 24,8 | 3,6 | | 0,19 | 42,0 | 4,0 | |
| | 0,06 | 5,4 | 0,4 | | 0,06 | 14,1 | 2,4 | |
| | 0,02 | 1,2 | 0,3 | | 0,02 | 3,0 | 0,3 | |
| | 0,007 | 0,3 | 0,1 | | 0,007 | 0,6 | 0,1 | |
| | 0,002 | 0,1 | 0,1 | | 0,002 | 0,2 | 0,1 | |
| | 0,0007 | 0,1 | 0,0 | | 0,0007 | 0,0 | 0,1 | |
| | 0,0002 | 0,1 | 0,0 | | 0,0002 | 0,1 | 0,1 | |

[001038] Tabla 10. Edición en PRH

| ID de guía | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 |
|---|---|---|---|---|
| G018631 | 46,5 | 99,0 | 0,2 | 0,02 |
| | 15,5 | 99,6 | 0,1 | |
| | 5,1 | 99,5 | 0,2 | |
| | 1,7 | 99,0 | 0,2 | |
| | 0,5 | 97,2 | 0,7 | |
| | 0,19 | 92,3 | 1,3 | |
| | 0,06 | 78,6 | 4,0 | |
| | 0,02 | 49,9 | 8,5 | |
| | 0,007 | 15,5 | 3,6 | |
| | 0,002 | 4,0 | 1,4 | |
| | 0,0007 | 0,9 | 0,4 | |
| | 0,0002 | 0,4 | 0,1 | |
| G022499 | 46,5 | 98,3 | 0,4 | 0,06 |
| | 15,5 | 99,2 | 0,7 | |
| | 5,1 | 99,3 | 0,3 | |
| | 1,7 | 97,7 | 0,0 | |
| | 0,5 | 94,4 | 0,8 | |

| ID de guía | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 |
|---|---|---|---|---|
| | 0,19 | 81,7 | 2,9 | |
| | 0,06 | 49,6 | 5,0 | |
| | 0,02 | 16,5 | 4,2 | |
| | 0,007 | 3,3 | 1,9 | |
| | 0,002 | 0,9 | 0,4 | |
| | 0,0007 | 0,2 | 0,0 | |
| | 0,0002 | 0,2 | 0,1 | |
| G022497 | 46,5 | 98,3 | 0,4 | 0,07 |
| | 15,5 | 98,9 | 0,4 | |
| | 5,1 | 99,4 | 0,1 | |
| | 1,7 | 97,9 | 1,1 | |
| | 0,5 | 94,0 | 2,9 | |
| | 0,19 | 82,4 | 5,9 | |
| | 0,06 | 41,6 | | |
| | 0,02 | 16,7 | 7,1 | |
| | 0,007 | 3,1 | 1,8 | |
| | 0,002 | 0,4 | 0,1 | |
| | 0,0007 | 0,4 | 0,0 | |
| | 0,0002 | 0,1 | 0,0 | |
| G022498 | 46,5 | 97,9 | 0,0 | 0,04 |
| | 15,5 | 99,1 | 0,4 | |
| | 5,1 | 99,2 | 0,0 | |
| | 1,7 | 98,7 | 0,1 | |
| | 0,5 | 96,0 | 1,5 | |
| | 0,19 | 89,6 | 2,3 | |
| | 0,06 | 65,9 | 10,2 | |
| | 0,02 | 31,9 | 10,0 | |
| | 0,007 | 7,4 | 2,3 | |
| | 0,002 | 1,5 | 0,7 | |
| | 0,0007 | 0,4 | 0,1 | |
| | 0,0002 | 0,1 | 0,0 | |
| G00534 | 46,5 | 98,4 | 0,4 | 0,08 |
| | 15,5 | 99,0 | 0,4 | |
| | 5,1 | 99,0 | 0,5 | |
| | 1,7 | 97,9 | 0,8 | |
| | 0,5 | 92,1 | | |

| ID de guía | Concentración de guía (nM) | Media % edición | SD | EC50 |
|---|---|---|---|---|
| | 0,19 | 77,5 | 7,1 | |
| | 0,06 | 40,3 | 7,0 | |
| | 0,02 | 11,8 | 4,2 | |
| | 0,007 | 2,2 | 0,8 | |
| | 0,002 | 0,3 | 0,0 | |
| | 0,0007 | 0,2 | 0,1 | |
| | 0,0002 | 0,2 | 0,1 | |
| G022500 | 46,5 | 98,4 | 0,4 | 0,07 |
| | 15,5 | 99,1 | 0,2 | |
| | 5,1 | 99,3 | 0,3 | |
| | 1,7 | 97,7 | 0,7 | |
| | 0,5 | 93,3 | 1,8 | |
| | 0,19 | 78,1 | 4,8 | |
| | 0,06 | 44,3 | 6,1 | |
| | 0,02 | 12,9 | 3,1 | |
| | 0,007 | 2,4 | 0,8 | |
| | 0,002 | 0,4 | 0,2 | |
| | 0,0007 | 0,2 | 0,1 | |
| | 0,0002 | 0,1 | 0,1 | |

**Ejemplo 4. Edición *in vivo* en hígado de ratón utilizando nanopartículas lipídicas (LNP)**

[001039] Las LNP utilizadas en todos los estudios *in vivo* se formularon como se describe en el Ejemplo 1. Las desviaciones del protocolo se indican en el ejemplo correspondiente. La solución de transporte y almacenamiento (TSS) utilizada en la preparación de la LNP se dosificó en el experimento como un control negativo solo para el vehículo. Todas las secuencias nucleotídicas del ARNsg contenidas en las LNP tienen como diana la misma secuencia en el gen TTR, como se indica en las tablas 2A-2B.

**Ejemplo 4.1 Edición *in vivo* en el modelo del ratón**

[001040] Se probaron diseños de guías seleccionados de las tablas 2A-2B para mejorar la eficacia de la edición *in vivo*. En cada estudio con ratones se utilizaron ratones hembra CD-1 de 6 a 10 semanas de edad. Los animales se pesaron antes de la dosis. Las LNP se administraron a través de la vena lateral de la cola en un volumen de 0,2 ml por

animal (aproximadamente 10 ml por kilogramo de peso corporal). Los animales fueron observados aproximadamente 6 horas después de la dosis para detectar efectos adversos. El peso corporal se midió 24 horas después de la administración y los animales fueron sacrificados 8 días después de la dosis por exanguinación bajo anestesia con isoflurano. Se recolectó la sangre mediante punción cardíaca en tubos separadores de suero y en tubos que contenían citrato de sodio amortiguado para plasma, tal como se describe en la presente. En los estudios de edición *in vivo* se recogió tejido hepático del lóbulo medial izquierdo de cada animal para extracción y análisis de ADN.

[001041] Para los estudios *in vivo*, se extrajo ADN genómico de 10 mg de tejido utilizando un kit de extracción basado en esferas, por ejemplo, el kit Zymo Quick-DNA 96 (Zymo Research, n.° cat. D3010) según el protocolo del fabricante, que incluye la homogeneización del tejido en el amortiguadorde lisis (aproximadamente 400 µl/10 mg de tejido). Todas las muestras de ADN se normalizaron a una concentración de 100 ng/µl para la PCR y el posterior análisis de NGS, como se describe en el ejemplo 1.

**Ejemplo 4.2 Análisis ELISA de transtiretina (TTR) utilizado en estudios con animales**

[001042] Se recolectó sangre y se aisló el suero como se describió anteriormente. Los niveles séricos de TTR total se determinaron utilizando un kit ELISA de prealbúmina de ratón (Transtiretina) (Aviva Systems Biology, Cat. OKIA00111); los niveles séricos de TTR en ratas se midieron utilizando un kit ELISA específico para ratas (número de catálogo de Aviva Systems Biology OKIA00159). Los reactivos y estándares del kit se prepararon de acuerdo con el protocolo del fabricante. El suero de ratón o rata se diluyó hasta una dilución final de 10 000 veces con 1 diluyente de ensayo. Para ello se realizaron dos diluciones secuenciales de 50 veces, dando lugar a una dilución de 2500 veces. Se realizó una dilución final de 4 veces para una dilución total de la muestra de 10 000 veces. Se añadieron a cada pocillo de la placa ELISA prerecubierta con anticuerpo de captura diluciones de la curva estándar (100 µL cada una) y muestras de suero diluido. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes del lavado. Se añadió un conjugado de enzima y anticuerpo (100 µl por pocillo) para una incubación de 20 minutos. Se retiró el conjugado de anticuerpo libre y se lavó de nuevo la placa antes de añadir la solución de sustrato cromogénico. La placa se incubó durante 10 minutos antes de añadir 100 µl de la solución de parada, por ejemplo, ácido sulfúrico (aproximadamente 0,3 M). La placa se leyó en un lector de placas SpectraMax M5 o Clariostar a una absorbancia de 450

nm. Los niveles séricos de TTR fueron calculados por el software SoftMax Pro ver. 6.4.2 o software Mars ver. 3.31 utilizando una curva logística de cuatro parámetros que se ajuste a la curva estándar. Los valores séricos finales se ajustaron para la dilución del ensayo. Se determinaron los valores de porcentaje de inactivación de proteínas (%KD) en relación con los controles, que generalmente eran animales tratados con el vehículo (TSS) a menos que se indique lo contrario. Se observaron valores negativos de %KD en animales individuales o en un grupo de animales con niveles de TTR superiores a la media del grupo de control, lo que dio lugar a un valor negativo de inactivación.

**Ejemplo 4.3 Edición *in vivo* y eliminación de TTR en suero**

[001043] Las LNP se prepararon generalmente como se describe en el ejemplo 1. Las formulaciones de LNP se analizaron para tamaño de partícula promedio, polidispersidad (pdi), contenido de ARN total y eficiencia de encapsulación de ARN como se describe en el Ejemplo 1 y los resultados mostrados en la Tabla 11.

[001044] Tabla 11. Análisis de formulación de LNP

| Identificador de LNP | ID de guía | Encapsulación (%) | Tamaño Z promedio(nm) | PDI | Tamaño prom. en número (nm) |
|---|---|---|---|---|---|
| LNP1 | TSS | 98 | 88 | 0,04 | 71 |
| LNP2 | G017276 | 99 | 89 | 0,02 | 71 |
| LNP3 | G018804 | 98 | 90 | 0,04 | 71 |
| LNP4 | G018805 | 98 | 92 | 0,02 | 75 |
| LNP5 | G018806 | 98 | 91 | 0 | 75 |
| LNP6 | G018807 | 98 | 90 | 0,02 | 73 |
| LNP7 | G018808 | 98 | 89 | 0,01 | 72 |
| LNP8 | G018809 | 98 | 87 | 0,04 | 68 |
| LNP9 | G018810 | 99 | 88 | 0,06 | 67 |

[001045] Las LNP que contenían los ARNsg indicados en la Tabla 12 se administraron a ratones hembra CD-1 (n=5) a una dosis de 0,1 mg/kg de ARN total como se ha descrito anteriormente. La guía G017276 actuó como control. La eficiencia de edición, los niveles de proteína TTR y el porcentaje de reducción de TTR (%KD) para las LNP que contienen los ARNsg indicados se muestran en la Tabla 12 y la eficiencia de edición y los niveles de proteína TTR se muestran en las Figuras 5A y 5B.

**Tabla 12. Edición hepática, proteína TTR sérica e inactvación de la proteína TTR**

| ID de guía | Media de % de indel | SD | Media de TTR en suero (ug/ml) | SD | Media de % KD | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TSS | 0,06 | 0,05 | 614,6 | 137,4 | 0 | 22,35 |
| G017276 | 64,12 | 5,97 | 107,2 | 38,65 | 82,57 | 6,29 |
| G018804 | 66,08 | 4,98 | 84,5 | 54,1 | 86,25 | 8,8 |
| G018805 | 59,88 | 4,28 | 118,8 | 59,23 | 80,67 | 9,64 |
| G018806 | 63,72 | 2,03 | 104,4 | 19,71 | 83,01 | 3,21 |
| G018807 | 65,34 | 6,11 | 86,4 | 43,46 | 85,94 | 7,07 |
| G018808 | 46,76 | 11,65 | 227,0 | 138,4 | 63,06 | 22,51 |
| G018809 | 64,74 | 2,8 | 78,2 | 20,79 | 87,28 | 3,38 |
| G018810 | 63,44 | 5,91 | 103,1 | 70,12 | 83,22 | 11,41 |

[001046] Se administraron guías seleccionadas de la Tabla 12 a ratones hembra CD-1 (n=5) a 0,1 mg/kg y 0,03 mg/kg de ARN total, tal como se describe anteriormente. Las guías G012401 y G01727 actuaron como controles. En la Tabla 13 se muestran la eficiencia de edición, los niveles de proteína de TTR y el porcentaje de reducción de TTR, respectivamente, para las LNP que contienen los ARNsg indicados y la eficiencia de edición se muestra en la Figura 6.

Tabla 13. Edición hepática, proteína TTR en suero y proteína TTR en suero %KD

| Guía | Dosis (mg/kg) | Media de % de indel | SD | Media de TTR en suero (ug/ml) | SD | Media de % KD | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TSS | 0 | 0,2 | 0 | 658,9 | 56,6 | 0 | 8,6 |
| G12401 | 0,1 | 36 | 7,9 | 324,0 | 115,0 | 50,8 | 17,5 |
| | 0,03 | 8,3 | 2,1 | 550,3 | 51,3 | 30,7 | 31,7 |
| G17276 | 0,1 | 60,3 | 7,3 | 115,1 | 54,2 | 68,4 | 31 |
| | 0,03 | 27,2 | 5,4 | 412,7 | 65,6 | 37,4 | 10 |
| G18806 | 0,1 | 63,1 | 6,1 | 89,4 | 76,2 | 86,4 | 11,6 |
| | 0,03 | 34,6 | 5,4 | 369,9 | 64,8 | 43,9 | 9,8 |
| G18807 | 0,1 | 67,8 | 2,3 | 75,5 | 14,8 | 88,6 | 2,3 |
| | 0,03 | 40,2 | 9 | 316,5 | 95,8 | 52 | 14,5 |
| G18808 | 0,1 | 47,3 | 5,4 | 202,2 | 35,8 | 69,3 | 5,4 |

| Guía | Dosis (mg/kg) | Media de % de indel | SD | Media de TTR en suero (ug/ml) | SD | Media de % KD | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,03 | 17,3 | 6,6 | 444,1 | 101,2 | 32,6 | 15,4 |
| G18809 | 0,1 | 61 | 4,8 | 114,0 | 44,7 | 82,7 | 6,8 |
| | 0,03 | 27 | 3,1 | 494,7 | 93,8 | 24,9 | 14,2 |
| G18810 | 0,1 | 54,4 | 6,7 | 156,2 | 81,0 | 76,3 | 12,3 |
| | 0,03 | 20,9 | 5,1 | 592,4 | 67,0 | 10,1 | 10,2 |

[001047] Se administraron otras guías con la misma secuencia de selección con modificaciones adicionales del conector a ratones hembra CD-1 (n=5) a 0,1 mg/kg y 0,03 mg/kg de ARN total, tal como se describe anteriormente. Las guías G017276 y G000502 actuaron como controles. En la Tabla 14 se muestra la eficiencia de edición, los niveles de proteína TTR y el porcentaje de inactivación de TTR, respectivamente, para las LNP que contienen los ARNsg indicados y la eficiencia de edición se muestra en la Figura 7.

**Tabla 14. Edición hepática, proteína TTR en suero y proteína TTR en suero %KD**

| Guía | Dosis (mg/kg) | Media de % de indel | SD | Media de TTR ug/ml | SD | Media de % KD | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **TSS** | x | 0,14 | 0,09 | 588,8 | 62,3 | -6E-10 | 10,6 |
| **G017276** | 0,1 | 53,92 | 6,78 | 154,5 | 77,0 | 73,8 | 13,1 |
| | 0,03 | 25,6 | 6,59 | 373,3 | 109,3 | 36,6 | 18,6 |
| **G000502** | 0,1 | 43,04 | 9,20 | 240,5 | 52,1 | 59,2 | 8,8 |
| | 0,03 | 21,42 | 10,67 | 439,7 | 99,2 | 25,3 | 16,9 |
| **G022501** | 0,1 | 60,74 | 0,59 | 116,0 | 26,6 | 80,3 | 4,5 |
| | 0,03 | 17,16 | 5,11 | 611,7 | 183,6 | -3,9 | 31,2 |
| **G022502** | 0,1 | 33,82 | 10,61 | 472,2 | 205,4 | 19,8 | 34,9 |
| | 0,03 | 5,52 | 1,35 | 573,5 | 46,9 | 2,6 | 8,0 |
| **G022503** | 0,1 | 58,1 | 9,36 | 154,2 | 78,5 | 73,8 | 13,3 |
| | 0,03 | 18,94 | 7,19 | 508,7 | 104,1 | 13,6 | 17,7 |
| **G022504** | 0,1 | 25,88 | 4,45 | 527,5 | 122,2 | 10,4 | 20,8 |
| | 0,03 | | | 624,9 | 88,5 | -6,1 | 15,0 |

**Ejemplo 5. Edición *in vivo* en hígado de rata con nanopartículas lipídicas (LNP)**

**Ejemplo 5.1 Entrega de la LNP en ratas**

[001048] Algunos diseños de guías fueron sometidos a pruebas adicionales en ratas. En cada estudio con ratas se utilizaron ratas hembras Sprague Dawley de Charles River de 6 a 8 semanas de edad. Se administraron dosis de las LNP mediante inyección en la vena lateral de la cola. Las formulaciones de LNP se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 en una proporción molar de 50% de lípido A, 38% de colesterol, 9% de DSPC y 3% de PEG2k-DMG, usando una relación molar N:P de aproximadamente 6 y una relación 1:2 de ARNg:ARNm en peso. Los animales fueron observados después de la dosis en busca de efectos adversos. El peso corporal se midió 24 horas después de la administración y los animales fueron sacrificados después de la dosis por exanguinación bajo asfixia por $CO_2$. La sangre fue recolectada por punción cardíaca en tubos separadores de suero (Geriner Bio One, n.° catálogo 450472). En los estudios de edición *in vivo* se recogió tejido hepático de cada animal. El ADN genómico se aisló y se procesó como se describe en el ejemplo 5. Todas las muestras de ADN se prepararon para la PCR y el posterior análisis de NGS, tal como se describe en el ejemplo 5.

[001049] Se evaluó la eficiencia de edición en los niveles de proteína sérica del hígado y de TTR para cada muestra de rata, tal como se describe en el ejemplo 5. Los resultados mostrados en cada una de las siguientes tablas de estudio denotan el ARNsg contenido dentro de cada LNP (ver Tablas 2A-2B para secuencias nucleotídicas de ARNsg) que tienen como objetivo la misma secuencia en el gen TTR. Las LNP se prepararon como se describe en el ejemplo 5. Las desviaciones del protocolo se indican en los ejemplos respectivos que figuran a continuación.

**Ejemplo 5.2 Edición *in vivo* e inactivación de TTR en el modelo de ratas**

[001050] Las LNP que contenían los ARNsg indicados en la Tabla 15 se administraron a ratas hembra Sprague Dawley (n=5) a una dosis de 0,1 mg/kg y 0,03 mg/kg de ARN total, tal como se ha descrito anteriormente. Las guías G000534 y G018631 actuaron como controles. En la tabla 15 se muestra la eficacia de la edición, la proteína TTR sérica y el porcentaje de TSS, respectivamente. La eficacia de la edición y los niveles de proteína TTR sérica se ilustran en las figuras 8A y 8B.

**Tabla 15. Edición hepática y TTR sérica**

| Guía | Dosis de LNP (mg/kg) | Media de % de indel | SD | Media de TTR en suero (ug/ml) | SD | %TSS |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TSS | n/a | 0,1 | 0,0 | 1385,4 | 215,8 | 100,0 |
| G000534 | 0,03 | 4,8 | 2,4 | 1200,3 | 343,4 | 86,6 |
| | 0,1 | 40,4 | 5,7 | 596,3 | 91,7 | 43,0 |
| G018631 | 0,03 | 25,8 | 4,7 | 770,1 | 181,4 | 55,6 |
| | 0,1 | 62,4 | 2,7 | 200,0 | 88,9 | 14,4 |
| G022497 | 0,03 | 16,0 | 3,4 | 839,6 | 45,5 | 60,6 |
| | 0,1 | 46,3 | 8,1 | 521,8 | 137,4 | 37,7 |
| G022498 | 0,03 | 4,2 | 1,6 | 1052,6 | 207,4 | 76,0 |
| | 0,1 | 20,9 | 8,7 | 781,1 | 143,6 | 56,4 |
| G022499 | 0,03 | 8,6 | 6,2 | 978,5 | 111,8 | 70,6 |
| | 0,1 | 42,8 | 9,7 | 489,3 | 185,1 | 35,3 |
| G022500 | 0,03 | 2,6 | 1,1 | 905,0 | 146,7 | 65,3 |
| | 0,1 | 16,1 | 6,1 | 828,3 | 59,8 | 59,8 |

**Ejemplo 6. Relación de ARNsg:ARNm en relación con ARNsg o ARNpg utilizando LNP**

[001051] Se realizaron estudios para evaluar la eficiencia de edición de diseños de ARNsg que contienen conetores de polietilenglicol (ARNpg). En el estudio se compararon dos ARNg que tenían como diana la TTR con la misma secuencia guía, uno de los cuales incluía tres conectores de polietilenglicol en la región constante de la guía (ARNpg, G021846) y uno de los cuales no (G021845), como se muestra en la Tabla 4B. Las guías y el ARNm se formularon en diferentes LNP y se mezclaron a las proporciones deseadas para la entrega a hepatocitos primarios de ratón (PMH) a través de nanopartículas lipídicas (LNP).

[001052] Las células de PMH se prepararon, se trataron y se analizaron como se describe en el ejemplo 1, a menos que se indique lo contrario. Las células PMH de los Laboratorios In Vitro ADMET (n.° lote MCM114) fueron sembradas a una densidad de 15 000 células/pocillo. Las células fueron tratadas con LNP como se describe a continuación. Las LNP se prepararon generalmente como se describe en el ejemplo 1. Las LNP fueron preparados con una composición lipídica en una proporción molar de 50% de Lípido A, 38% de Colesterol, 9% DSPC y 3% PEG2k-DMG. Las LNP fueron formuladas con una relación molar de aminalipídica y ARN fosfato (N:P) de aproximadamente 6. Las LNP

encapsularon una sola especie de ARN, ya sea ARNg G021845, ARNg G021846 o ARNm (ARNm M) como se describe en el Ejemplo 1.

[001053] Las células de PMH fueron tratadas con cantidades variables de LNP en relaciones de ARNg a ARNm de 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1 u 8:1 en peso de carga de ARN. Se incluyeron muestras duplicadas en cada ensayo. Se analizaron las guías en una curva de respuesta a la dosis de 8 puntos y 3 veces a partir de una concentración de ARN total de 1 ng/uL, como se muestra en la Tabla 16. En la Tabla 16 se muestran los resultados de media de porcentaje de edición. En la Fig. 12A se muestra la media de porcentaje de edición para ARNsg G021845 y en la Fig. 12B se muestra la media de porcentaje de edición para ARNsg G021846. «ND» en la tabla representa valores que no se pudieron detectar debido a un fallo experimental.

**Tabla 16. Media de porcentaje de edición en PMH**

| **Relación de carga (ARNg:ARNm)** | **Dosis de LNP (ng/uL)** | **ARNsg (G021845)** | | **ARNpg (G021846)** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **Media % edición** | **SD** | **Media % edición** | **SD** |
| 1:4 | 1 | 88,1 | 1,7 | ND | ND |
| | 0,3 | 68,7 | 5,7 | 78 | 0,3 |
| | 0,1 | 28,1 | 4,1 | 39,8 | 8,2 |
| | 0,03 | 8,7 | 2 | 5,1 | 0 |
| | 0,01 | 1,5 | 0,4 | 4 | 1,2 |
| | 0,004 | 0,6 | 0,5 | 0,2 | 0 |
| | 0,001 | 0,3 | 0,2 | 0,6 | 0,3 |
| 1:2 | 1 | 90,6 | 0 | 91,2 | 2,9 |
| | 0,3 | 78 | 2,4 | 85,6 | 1,4 |
| | 0,1 | 41,5 | 5,8 | 56,6 | 4,4 |
| | 0,03 | 23 | 5,4 | 17,5 | 0 |
| | 0,01 | 6,1 | 4,3 | 18,6 | 0,5 |
| | 0,004 | 0,1 | 0,1 | 3,4 | 1,7 |
| | 0,001 | 0,1 | 0 | 2,4 | 0,7 |
| 1:1 | 1 | 90,9 | 1,4 | 94,7 | 0,6 |
| | 0,3 | 71,8 | 4,2 | 84,7 | 0,9 |
| | 0,1 | 45,7 | 3,2 | 64,3 | 5,3 |
| | 0,03 | 27,4 | 1 | 44,8 | 11,5 |

| Relación de carga (ARNg:ARNm) | Dosis de LNP (ng/uL) | ARNsg (G021845) | | ARNpg (G021846) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Media % edición | SD | Media % edición | SD |
| | 0,01 | 4,7 | 2,5 | 10,2 | 4,3 |
| | 0,004 | 0,2 | 0 | 1,7 | 0,7 |
| | 0,001 | 0,1 | 0 | 0,7 | 0,5 |
| 2:1 | 1 | 92,4 | 1,6 | 94,5 | 0,8 |
| | 0,3 | 80 | 1,3 | 85,7 | 0,2 |
| | 0,1 | 45,4 | 0 | 68 | 7,9 |
| | 0,03 | 47,2 | 3 | 49,3 | 0 |
| | 0,01 | 18,1 | 1,8 | 28,8 | 4,1 |
| | 0,004 | 0,8 | 0,7 | 3,8 | 2,4 |
| | 0,001 | 0,2 | 0,1 | 0,8 | 0,3 |
| 4:1 | 1 | 87,9 | 1,9 | 90,1 | 0 |
| | 0,3 | 80,2 | 2,2 | 84 | 0,1 |
| | 0,1 | 43,4 | 0 | 60,4 | 0,1 |
| | 0,03 | 46,2 | 0,5 | 46,1 | 0 |
| | 0,01 | 11,3 | 2,3 | 26,7 | 4,9 |
| | 0,004 | 0,4 | 0,2 | 1,5 | 0,4 |
| | 0,001 | 0,4 | 0,1 | 0,5 | 0,3 |
| 8:1 | 1 | 89,2 | 0 | 87,5 | 0 |
| | 0,3 | 76,7 | 3,9 | 78,6 | 3,1 |
| | 0,1 | 59,5 | 9,4 | 59,4 | 1,1 |
| | 0,03 | 36,4 | 7 | 45,3 | 0,5 |
| | 0,01 | 8,2 | 1,2 | 18,7 | 2,9 |
| | 0,004 | 0,6 | 0,6 | 2,6 | 0,3 |
| | 0,001 | 0,1 | 0 | 0,6 | 0,2 |

**Ejemplo 7. Edición *in vitro* de guías pegiladas modificadas (ARNpg) en PMH usando LNP**

[001054] Se analizó el ARNpg modificado con el mismo sitio diana en el gen TTR del ratón para evaluar la eficiencia de edición en células de PMH.

[001055] Las células de PMH se prepararon, se trataron y se analizaron como se describe en el ejemplo 1, a menos que se indique lo contrario. Se usaron células PMH de In Vitro ADMET Laboratories (n.° de lote MC148) y se colocaron en placas en una densidad de 15 000 células/pocillo. Las formulaciones de LNP se prepararon tal como se

describe en el Ejemplo 1. Las LNP se prepararon con una composición lipídica en una relación molar de 50 % lípido A, 38 % colesterol, 9 % DSPC y 3 % PEG2k-DMG. Las LNP fueron formuladas con una relación molar de amina lipídica a ARN fosfato (N:P) de aproximadamente 6 y un ARNg como se indica en la Tabla 17, o un ARNm.

[001056] Los PMH en 100 ul de medios se trataron con LNP para 30 ng de ARNm total (ARNm P) en peso y LNP para ARNg en las cantidades indicadas en la Tabla 17. Las muestras se ejecutaron en duplicado. Los resultados de media de edición para PMH se muestran en la Tabla 17 y en la Figura 13.

**Tabla 17. Media de porcentaje de edición en PMH**

| ID de guía | ARNsg de LNP (ng/uL) | Media % edición | SD | ID de guía | ARNsg de LNP (ng/uL) | Media % edición | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| G021844 | 0,7 | 96,6 | 0,5 | G023416 | 0,7 | 91,5 | 1,8 |
| | 0,23 | 95,0 | 0,5 | | 0,23 | 84,8 | 0,1 |
| | 0,08 | 80,0 | 5,9 | | 0,08 | 56,4 | 2,7 |
| | 0,03 | 51,9 | 1,9 | | 0,03 | 28,2 | 3,6 |
| | 0,009 | 13,9 | 0,4 | | 0,009 | 10,0 | 1,7 |
| | 0,003 | 4,6 | 0,9 | | 0,003 | 3,2 | 0,0 |
| | 0,001 | 0,8 | 0,1 | | 0,001 | 0,8 | 0,3 |
| | 0,0003 | 0,2 | 0,1 | | 0,0003 | 0,2 | 0,0 |
| | 0,0001 | 0,1 | 0,0 | | 0,0001 | 0,1 | 0,0 |
| | 0,00004 | 0,2 | 0,1 | | 0,00004 | 0,1 | 0,0 |
| | 0,00001 | 0,1 | 0,0 | | 0,00001 | 0,1 | 0,0 |
| | 0 | 0,1 | 0,0 | | 0 | 0,1 | 0,0 |
| G023413 | 0,7 | 96,4 | 0,4 | G023417 | 0,7 | 90,5 | 1,8 |
| | 0,23 | 92,5 | 0,7 | | 0,23 | 71,6 | 0,2 |
| | 0,08 | 73,9 | 0,9 | | 0,08 | 30,9 | 6,7 |
| | 0,03 | 36,4 | 2,6 | | 0,03 | 12,8 | 1,3 |
| | 0,009 | 10,3 | 1,5 | | 0,009 | 4,8 | 1,5 |
| | 0,003 | 2,4 | 0,7 | | 0,003 | 0,4 | 0,4 |
| | 0,001 | 0,6 | 0,1 | | 0,001 | 0,2 | 0,1 |
| | 0,0003 | 0,3 | 0,0 | | 0,0003 | 0,1 | 0,0 |
| | 0,0001 | 0,1 | 0,0 | | 0,0001 | 0,1 | 0,1 |
| | 0,00004 | 0,1 | 0,0 | | 0,00004 | 0,1 | 0,0 |
| | 0,00001 | 0,1 | 0,0 | | 0,00001 | 0,1 | 0,0 |

| ID de guía | ARNsg de LNP (ng/uL) | Media % edición | SD | ID de guía | ARNsg de LNP (ng/uL) | Media % edición | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0,1 | 0,0 | | 0 | 0,1 | 0,0 |
| G023414 | 0,7 | 96,5 | 0,2 | G023418 | 0,7 | 96,8 | 0,3 |
| | 0,23 | 92,7 | 0,4 | | 0,23 | 90,8 | 1,7 |
| | 0,08 | 74,1 | 2,7 | | 0,08 | 63,3 | 1,8 |
| | 0,03 | 45,7 | 1,5 | | 0,03 | 27,7 | 2,4 |
| | 0,009 | 13,7 | 0,7 | | 0,009 | 8,8 | 0,5 |
| | 0,003 | 4,3 | 1,3 | | 0,003 | 1,9 | 0,6 |
| | 0,001 | 0,7 | 0,1 | | 0,001 | 0,7 | 0,2 |
| | 0,0003 | 0,2 | 0,0 | | 0,0003 | 0,2 | 0,1 |
| | 0,0001 | 0,2 | 0,1 | | 0,0001 | 0,1 | 0,0 |
| | 0,00004 | 0,2 | 0,1 | | 0,00004 | 0,1 | 0,0 |
| | 0,00001 | 0,1 | 0,0 | | 0,00001 | 0,1 | 0,0 |
| | 0 | 0,1 | 0,0 | | 0 | 0,2 | 0,1 |
| G023415 | 0,7 | 96,5 | 0,5 | G023419 | 0,7 | 96,6 | 0,6 |
| | 0,23 | 92,6 | 0,7 | | 0,23 | 93,4 | 1,3 |
| | 0,08 | 73,1 | 0,2 | | 0,08 | 71,1 | 3,3 |
| | 0,03 | 34,4 | 0,8 | | 0,03 | 29,0 | 4,6 |
| | 0,009 | 14,2 | 0,2 | | 0,009 | 9,7 | 4,1 |
| | 0,003 | 3,9 | 0,4 | | 0,003 | 2,3 | 0,5 |
| | 0,001 | 0,5 | 0,2 | | 0,001 | 0,4 | 0,0 |
| | 0,0003 | 0,2 | 0,0 | | 0,0003 | 0,1 | 0,0 |
| | 0,0001 | 0,2 | 0,0 | | 0,0001 | 0,2 | 0,0 |
| | 0,00004 | 0,1 | 0,0 | | 0,00004 | 0,2 | 0,0 |
| | 0,00001 | 0,1 | 0,0 | | 0,00001 | 0,1 | 0,0 |
| | 0 | 0,1 | 0,0 | | 0 | 0,1 | 0,0 |

**Ejemplo 8. Evaluación de las modificaciones químicas de la secuencia guía en PMH**

[001057] Se probó la eficiencia de edición del ARN guía pegilado (ARNpg) con modificaciones químicas en la secuencia guía en dos regiones TTR distintas del ratón (Exón 1 y Exón 3) en PMH. Los PMH (In Vitro ADMET Laboratories) fueron preparados como se describe en el Ejemplo 1 con una densidad de 20 000 células/pocillo. La lipofección de ARNm Nme2 Cas9 (ARNm O; SEQ ID NO: 367) y ARNg dirigidos a dos locus distintos en TTR de ratón, como se indica en la Tabla 18, utilizaron composiciones lipídicas premezcladas como se describe en el Ejemplo 1. Los lipoplejos se utilizaron para

tratar células con ARNm de 100 ng/100 ul Nme2 y con ARNg a las concentraciones indicadas en la Tabla 18. Las células se incubaron en medio de mantenimiento + 10% FBS (Corning n.° 35-010-CF) a 37 °C por 72 horas. Después de la incubación, se aisló ADN genómico y se realizó análisis de NGS como se describe en el Ejemplo 1.

[001058] Se determinó la eficiencia de edición para diversos patrones de modificación de guías a tres concentraciones de ARNg (3 nM, 8 nM o 25 nM). Se incluyeron muestras duplicadas en el ensayo. Los resultados de la media de edición se muestran en la Tabla 18 y las Fig. 14A-14B para las guías de ensayo con el diseño de ARNpg N79 (G023066 o G023067) que carecen de un 2'-OMe en posiciones nucleotídicas especificadas en la región de unión del ARNg. En la Tabla 19 y las Fig. 14C-14D se muestra una media de porcentaje de edición para guías de ensayo con diseños de ARNpg de fin de moldeo (G023070 o G023104) con modificaciones adicionales de 2'-OMe en la posición de nucleótido especificada en la región de unión del objetivo del ARNg. «ND» en la tabla representa valores que no se pudieron detectar debido a un fallo experimental.

**Tabla 18. Media de porcentaje de edición para ARNpg N79 sin modificación con 2'-OMe en la posición especificada en la secuencia guía. ND = no se han presentado datos debido a fallos técnicos.**

| | | | **Concentraciones de ARNg** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | **3 nM** | | **8 nM** | | **25 nM** | |
| **Locus** | **Modificación de secuencia de guía** | **Guía** | **Media % edición** | **SD** | **Media % edición** | **SD** | **Media % edición** | **SD** |
| Exón-1 | Alto mod ARNpg | G023067 | ND | ND | 61,8 | 0,3 | 76,3 | 4,6 |
| | No-Mod | G023069 | 5,1 | 0,4 | 13,0 | 0,2 | 33,8 | 0,3 |
| | Modo final | G023070 | 23,7 | 3,9 | 48,1 | 0,3 | 61,2 | 2,0 |
| | POSICIÓN 4 | G023078 | 36,5 | 4,1 | 50,7 | 3,5 | 69,5 | 0,1 |
| | POSICIÓN 5 | G023079 | 57,7 | 0,5 | 63,2 | 3,5 | 71,2 | 3,0 |
| | POSICIÓN 8 | G023080 | 47,3 | 4,2 | 46,1 | 2,9 | 78,4 | 0,2 |
| | POSICIÓN 9 | G023081 | 50,4 | 2,2 | 46,8 | 5,6 | 57,4 | 4,1 |
| | POSICIÓN 11 | G023082 | 31,2 | 2,3 | 39,3 | 1,9 | 50,7 | 3,6 |
| | POSICIÓN 13 | G023083 | 46,5 | 3,7 | 49,2 | 3,8 | 46,6 | 9,2 |
| | POSICIÓN 18 | G023084 | 46,8 | 1,8 | 47,7 | 7 | 60,7 | 4,1 |
| | POSICIÓN 22 | G023085 | 9,5 | 2,6 | 35,2 | 5,8 | 49,6 | 3,9 |
| Exón-3 | Alto mod ARNpg | G023066 | 38,8 | 4,0 | 79,2 | 4,2 | 88,0 | 1,0 |

| Locus | Modificación de secuencia de guía | Guía | Concentraciones de ARNg | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 3 nM | | 8 nM | | 25 nM | |
| | | | Media % edición | SD | Media % edición | SD | Media % edición | SD |
| | No-Mod | G023103 | 1,3 | 0,5 | 20 | 0,2 | 37,3 | 1,6 |
| | Modo final | G023104 | 20,3 | 4,7 | 50,1 | 4,9 | 62,1 | 5,1 |
| | POSICIÓN 4 | G023112 | 56,7 | 3,8 | 64,3 | 3,2 | 77,2 | 2,0 |
| | POSICIÓN 5 | G023113 | 41,0 | 8,9 | 68,4 | 1,3 | 81,8 | 1,8 |
| | POSICIÓN 8 | G023114 | 56,3 | 2,2 | 76,8 | 14 | 87,5 | 0,5 |
| | POSICIÓN 9 | G023115 | 59,5 | 9,0 | 63,6 | 1,9 | 80,8 | 0,9 |
| | POSICIÓN 11 | G023116 | 49,4 | 10,3 | 49,5 | 7,1 | 67,8 | 0,2 |
| | POSICIÓN 13 | G023117 | 49,0 | 9,4 | 55,1 | 5,7 | 70,3 | 1,2 |
| | POSICIÓN 18 | G023118 | 52,9 | 7,3 | 56,6 | 6,0 | 74,4 | 3,4 |
| | POSICIÓN 22 | G023119 | 21,7 | 4,1 | 30,5 | 3,3 | 40,8 | 1,2 |

**Tabla 19. Media de porcentaje de edición para los ARNpg modificados finales con una modificación adicional 2'-OMe en la posición especificada en la región de unión de los ARNpg. ND = no se han presentado datos debido a fallos técnicos.**

| Locus | Modificación de secuencia de guía | Guía | Concentraciones de ARNg | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 3 nM | | 8 nM | | 25 nM | |
| | | | Media % edición | SD | Media % edición | SD | Media % edición | SD |
| Exón-1 | Alto mod ARNpg | G023067 | ND | ND | 61,8 | 0,3 | 76,3 | 4,6 |
| | No-Mod | G023069 | 5,1 | 0,4 | 13,0 | 0,2 | 33,8 | 0,3 |
| | Modo final | G023070 | 23,7 | 3,9 | 48,1 | 0,3 | 61,2 | 2,0 |
| | POSICIÓN 4 | G023071 | 22,4 | 4,0 | 51,0 | 5,3 | 54,2 | 0,6 |
| | POSICIÓN 5 | G023072 | 18,8 | 2,1 | 45,8 | 5,3 | 60,5 | 1,2 |
| | POSICIÓN 8 | G023120 | 65,3 | 26 | 41,3 | 5,0 | 38,6 | 7,2 |
| | POSICIÓN 9 | G023073 | 31,1 | 3,1 | 47,7 | 1,0 | 62,4 | 6,3 |
| | POSICIÓN 11 | G023074 | 24,0 | 5,6 | 52,0 | 1,7 | 66,5 | 1,4 |
| | POSICIÓN 13 | G023075 | ND | ND | 48,2 | 3,6 | 62,5 | 0,8 |
| | POSICIÓN 18 | G023076 | 17,2 | 1,6 | 43,1 | 0,2 | 48,1 | 2,8 |
| | POSICIÓN 22 | G023077 | 30,6 | 2,5 | 59,1 | 7,2 | ND | ND |
| Exón-3 | Alto mod ARNpg | G023066 | 38,8 | 4,0 | 79,2 | 4,2 | 88,0 | 1,0 |
| | No-Mod | G023103 | 1,3 | 0,5 | 20,0 | 0,2 | 37,3 | 1,6 |

| Locus | Modificación de secuencia de guía | Guía | Concentraciones de ARNg | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 3 nM | | 8 nM | | 25 nM | |
| | | | Media % edición | SD | Media % edición | SD | Media % edición | SD |
| | Modo final | G023104 | 20,3 | 4,7 | 50,1 | 4,9 | 62,1 | 5,1 |
| | POSICIÓN 4 | G023105 | 7,0 | 1,4 | 52,6 | 6,8 | 51,6 | 2,2 |
| | POSICIÓN 5 | G023106 | 22,8 | 4,2 | ND | ND | 63,8 | 3,4 |
| | POSICIÓN 8 | G023122 | 34,6 | 5,4 | 53,2 | 6,5 | 66,9 | 1,9 |
| | POSICIÓN 9 | G023107 | 19,3 | 5,1 | ND | ND | ND | ND |
| | POSICIÓN 11 | G023108 | 27,1 | 7,5 | 49,6 | 6,8 | 50,5 | 0,7 |
| | POSICIÓN 13 | G023109 | 13,6 | 2,8 | 41,6 | 3,4 | ND | ND |
| | POSICIÓN 18 | G023110 | 25,1 | 8,8 | 46,2 | 3,9 | 54,1 | 1,1 |
| | POSICIÓN 22 | G023111 | 22,3 | 6,6 | 56,8 | 1,1 | 61,2 | 3,9 |

**Ejemplo 9. Respuesta a la dosis de variantes de NLS Nme2 usando LNP en PMH**

[001059] Se analizaron ARNm mensajeros que codifican ORF de Nme2Cas9 con diferentes ubicaciones del NLS para evaluar la eficiencia de la edición en hepatocitos primarios de ratón (PMH). El ensayo probó guías dirigidas al locus TTR del ratón e incluyó diseños de ARNsg y ARNpg.

[001060] Los PMH se prepararon como en el Ejemplo 1 con una densidad de 20 000 células/pocillo. Las LNP se prepararon generalmente como se describe en el ejemplo 1 con una sola especie de ARN como carga, como se indica en la Tabla 20. Las LNP se prepararon con la composición lipídica en una proporción molar de 50% de Lípido A, 38% de Colesterol, 9% de DSPC y 3% de PEG2k-DMG. Las LNP fueron formuladas con una relación molar de amina lipídica a ARN fosfato (N:P) de aproximadamente 6.

[001061] Las células fueron tratadas con 60 ng/100 ul de LNP que contenía ARNg en peso de ARN y con LNP que contenía ARNm como se indica en la Tabla 20. Las células se incubaron durante 72 horas a 37 ℃ en medio E de Williams (Gibco, A1217601) con suplementos de mantenimiento y suero fetal bovino al 10%. Después de 72 horas de incubación a 37 ℃, las células fueron cosechadas y la edición fue evaluada por NGS como se describe en el ejemplo 1. En la Tabla 20 y la Figura 15 se muestran los datos medios de edición porcentual.

**Tabla 20. Media de porcentaje de edición en el locus TTR de ratón en hepatocitos primarios de ratón.**

| Muestra | ARNm LNP (ARN ng) | Media % edición | SD | N |
|---|---|---|---|---|
| ARNm P (2xNLS) G021536 | 40,000 | 92,30 | 0,85 | 3 |
| | 13,330 | 82,67 | 1,61 | 3 |
| | 4,440 | 62,27 | 2,96 | 3 |
| | 1,480 | 32,80 | 4,54 | 3 |
| | 0,490 | 11,23 | 1,37 | 3 |
| | 0,160 | 3,40 | 0,71 | 3 |
| | 0,050 | 0,80 | 0,22 | 3 |
| | 0,018 | 0,30 | 0,08 | 3 |
| | 0,006 | 0,20 | 0,08 | 3 |
| | 0,002 | 0,13 | 0,05 | 3 |
| | 0,001 | 0,13 | 0,05 | 3 |
| | 0,000 | 0,10 | 0,00 | 3 |
| ARNm P (2xNLS) G021844 (ARNpg) | 40,000 | 96,17 | 0,12 | 3 |
| | 13,330 | 91,83 | 0,34 | 3 |
| | 4,440 | 75,37 | 6,80 | 3 |
| | 1,480 | 44,53 | 13,11 | 3 |
| | 0,490 | 18,30 | 5,77 | 3 |
| | 0,160 | 5,50 | 1,43 | 3 |
| | 0,050 | 1,63 | 0,71 | 3 |
| | 0,018 | 0,33 | 0,05 | 3 |
| | 0,006 | 0,17 | 0,05 | 3 |
| | 0,002 | 0,07 | 0,05 | 3 |
| | 0,001 | 0,10 | 0,00 | 3 |
| | 0,000 | 0,07 | 0,05 | 3 |
| ARNm M (1xNLS) G021536 | 40,000 | 84,27 | 1,23 | 3 |
| | 13,330 | 66,23 | 5,39 | 3 |
| | 4,440 | 33,80 | 5,14 | 3 |
| | 1,480 | 10,17 | 5,51 | 3 |
| | 0,490 | 4,20 | 0,92 | 3 |
| | 0,160 | 1,10 | 0,45 | 3 |
| | 0,050 | 0,33 | 0,17 | 3 |
| | 0,018 | 0,23 | 0,09 | 3 |
| | 0,006 | 0,10 | 0,00 | 3 |
| | 0,002 | 0,10 | 0,00 | 3 |
| | 0,001 | 0,10 | 0,00 | 3 |
| | 0,000 | 0,07 | 0,05 | 3 |
| ARNm M (1xNLS) | 40,000 | 88,83 | 0,37 | 3 |

| Muestra | ARNm LNP (ARN ng) | Media % edición | SD | N |
|---|---|---|---|---|
| G021844 (ARNpg) | 13,330 | 74,37 | 4,63 | 3 |
| | 4,440 | 39,00 | 3,72 | 3 |
| | 1,480 | 16,40 | 2,52 | 3 |
| | 0,490 | 4,03 | 0,77 | 3 |
| | 0,160 | 1,27 | 0,05 | 3 |
| | 0,050 | 0,23 | 0,05 | 3 |
| | 0,018 | 0,20 | 0,08 | 3 |
| | 0,006 | 0,10 | 0,00 | 3 |
| | 0,002 | 0,10 | 0,00 | 3 |
| | 0,001 | 0,10 | 0,00 | 3 |
| | 0,000 | 0,10 | 0,00 | 3 |

**Ejemplo 10. Respuesta a la dosis de variantes NLS de Nme2 con LNP en PMH**

[001062] Se analizaron ARNm mensajeros que codifican ORF de Nme2Cas9 con diferentes ubicaciones del NLS para evaluar la eficiencia de la edición en hepatocitos primarios de ratón (PMH).

[001063] Los PMH (Gibco, MC148) se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 con una densidad de 20 000 células/pocillo. Las LNP se prepararon generalmente como se describió en el Ejemplo 1 con una única especie de ARN como carga. Las LNP se prepararon con la composición lipídica en una proporción molar de 50% de Lípido A, 38% de Colesterol, 9% de DSPC y 3% de PEG2k-DMG. Las LNP fueron formuladas con una relación molar de amina lipídica a ARN fosfato (N:P) de aproximadamente 6.

[001064] Se trataron las células con 30 ng en peso de ARN/100 ul de LNP que contiene ARNg G021844 y LNP que contiene ARNm tal como se indica en la Tabla 21. Las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas en medio E de Williams (Gibco, A1217601) con complementos de mantenimiento y suero fetal bovino al 10 %. Después de 72 horas de incubación a 37 °C, se recolectaron células y se evaluó la edición mediante NGS como se describen en el Ejemplo 1. Se muestran los datos de media de edición porcentual en la Tabla 21 y la Figura 16.

**Tabla 21. Media de porcentaje de edición en PMH tratados con LNP.**

| ARNm | ARNm LNP (ng/uL) | Media | SD | N | $EC_{50}$ (ng/uL) |
|---|---|---|---|---|---|

| ARNm | ARNm LNP (ng/uL) | Media | SD | N | $EC_{50}$ (ng/uL) |
|---|---|---|---|---|---|
| ARNm C | 0,30 | 86,30 | 4,46 | 3 | 0,0082 |
| | 0,10 | 84,17 | 5,52 | | |
| | 0,03 | 75,80 | 1,91 | | |
| | 0,01 | 43,90 | 14,36 | | |
| | 0,004 | 34,03 | 8,64 | | |
| | 0,001 | 15,63 | 4,35 | | |
| | 0,0004 | 6,17 | 2,41 | | |
| | 0,0001 | 3,47 | 0,62 | | |
| | 0,00005 | 2,37 | 0,34 | | |
| | 0,00002 | 3,00 | 0,64 | | |
| | 0,00001 | 2,60 | 0,57 | | |
| | 0,00 | 2,70 | 0,16 | | |
| mRN J | 0,30 | 91,30 | 2,92 | 3 | 0,0053 |
| | 0,10 | 89,60 | 4,23 | | |
| | 0,03 | 80,93 | 8,17 | | |
| | 0,01 | 62,85 | 14,35 | | |
| | 0,004 | 39,95 | 5,15 | | |
| | 0,001 | 16,70 | 3,79 | | |
| | 0,0004 | 7,73 | 2,98 | | |
| | 0,0001 | 4,23 | 0,95 | | |
| | 0,00005 | 2,80 | 0,70 | | |
| | 0,00002 | 3,23 | 0,54 | | |
| | 0,00001 | 2,67 | 0,48 | | |
| | 0,00 | 3,60 | 0,57 | | |
| ARNm Q | 0,30 | 90,67 | 4,40 | 3 | 0,0065 |
| | 0,10 | 86,77 | 5,43 | | |
| | 0,03 | 80,27 | 6,65 | | |
| | 0,01 | 56,90 | 5,48 | | |
| | 0,004 | 35,45 | 1,35 | | |
| | 0,001 | 12,63 | 3,16 | | |
| | 0,0004 | 5,17 | 0,56 | | |
| | 0,0001 | 2,73 | 0,17 | | |
| | 0,00005 | 2,97 | 0,41 | | |
| | 0,00002 | 2,73 | 0,21 | | |
| | 0,00001 | 2,87 | 0,56 | | |
| | 0,00 | 2,43 | 0,82 | | |

| ARNm | ARNm LNP (ng/uL) | Media | SD | N | $EC_{50}$ (ng/uL) |
|---|---|---|---|---|---|
| ARNm N | 0,30 | 93,93 | 2,20 | 3 | 00045 |
| | 0,10 | 90,97 | 1,77 | | |
| | 0,03 | 82,80 | 8,24 | | |
| | 0,01 | 68,67 | 10,18 | | |
| | 0,004 | 42,07 | 2,25 | | |
| | 0,001 | 24,13 | 4,21 | | |
| | 0,0004 | 10,60 | 0,94 | | |
| | 0,0001 | 4,67 | 0,66 | | |
| | 0,00005 | 3,30 | 1,84 | | |
| | 0,00002 | 3,37 | 0,69 | | |
| | 0,00001 | 2,53 | 0,90 | | |
| | 0,00 | 2,33 | 1,48 | | |
| ARNm P | 0,30 | 94,47 | 1,04 | 3 | 0,0036 |
| | 0,10 | 95,03 | 0,96 | | |
| | 0,03 | 91,27 | 2,36 | | |
| | 0,01 | 74,77 | 6,91 | | |
| | 0,004 | 50,57 | 4,89 | | |
| | 0,001 | 22,67 | 0,25 | | |
| | 0,0004 | 8,27 | 0,74 | | |
| | 0,0001 | 4,93 | 0,70 | | |
| | 0,00005 | 3,37 | 0,74 | | |
| | 0,00002 | 2,93 | 0,68 | | |
| | 0,00001 | 2,87 | 0,05 | | |
| | 0,00 | 2,87 | 0,45 | | |
| ARNm M | 0,30 | 92,00 | 0,80 | 3 | 0,0093 |
| | 0,10 | 91,40 | 1,90 | | |
| | 0,03 | 79,70 | 0,70 | | |
| | 0,01 | 53,10 | 6,80 | | |
| | 0,004 | 22,47 | 14,28 | | |
| | 0,001 | 8,20 | 4,20 | | |
| | 0,0004 | 4,57 | 1,57 | | |
| | 0,0001 | 2,73 | 0,31 | | |
| | 0,00005 | 3,07 | 0,21 | | |
| | 0,00002 | 2,93 | 0,09 | | |
| | 0,00001 | 2,77 | 0,66 | | |
| | 0,00 | 3,47 | 1,09 | | |

| ARNm | ARNm LNP (ng/uL) | Media | SD | N | $EC_{50}$ (ng/uL) |
|---|---|---|---|---|---|
| ARNm O | 0,30 | 89,40 | 7,00 | 3 | 0,0042 |
| | 0,10 | 86,83 | 12,52 | | |
| | 0,03 | 78,17 | 15,41 | | |
| | 0,01 | 64,83 | 12,48 | | |
| | 0,004 | 47,33 | 9,03 | | |
| | 0,001 | 20,67 | 7,12 | | |
| | 0,0004 | 8,60 | 2,95 | | |
| | 0,0001 | 2,47 | 1,33 | | |
| | 0,00005 | 4,13 | 0,37 | | |
| | 0,00002 | 2,80 | 0,62 | | |
| | 0,00001 | 11,13 | 231 | | |
| | 0,00 | 6,13 | 2,16 | | |

**Ejemplo 11. Edición *in vivo* usando LNP de ARNm y ARNpg**

[001065] Se evaluó *in vivo* la eficiencia de edición de los ARNpg modificados. Cuatro nucleótidos en cada uno de los bucles de la región de repetición y antirrepetición, la horquilla 1 y la horquilla 2 fueron sustituidos por los conectores de polietilenglicol Spacer-18.

[001066] Las LNP se prepararon generalmente como se describió en el Ejemplo 1 con una única especie de ARN como carga. Las LNP contenían una proporción molar de 50% de lípido A, 38% de colesterol, 9% de DSPC y 3% de PEG2k-DMG. Las LNP fueron formuladas con una relación molar de amina lipídica a ARN fosfato (N:P) de aproximadamente 6.

[001067] Se administraron LNP que contenían ARNg dirigido al gen de TTR indicadas en la Tabla 22 a ratones hembra CD-1 (n=5) en una dosis de 0,1 mg/kg o 0,3 mg/kg de ARN total tal como se describió anteriormente. La LNP que contenía ARNm (ARNm M; SEQ ID NO: 365) y la LNP que contenía ARNpg (G021846 o G021844) se administraron simultáneamente en una proporción de 1:2 en peso de ARN, respectivamente. Los ratones fueron sacrificados 7 días después de la dosis.

[001068] La eficacia de la edición, la reducción de la TTR sérica y el porcentaje de TSS para las LNP que contienen los ARNpg indicados se muestran en la Tabla 22 y se ilustran en las Fig. 17A a C, respectivamente.

**Tabla 22. Edición hepática, proteína TTR sérica e inactvación de la proteína TTR**

| Guía | Dosis (mg/kg) | Media % edición | SD | Media de TTR en suero (ug/ml) | SD | Media %TSS | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TSS | NA | 0,1 | 0 | 733,1 | 131,2 | 100 | 17,9 |
| G021846 | 0,1 | 21,9 | 2,8 | 369,5 | 56,2 | 50,4 | 7,7 |
| | 0,3 | 33,8 | 2,9 | 269,8 | 21,3 | 36,8 | 2,6 |
| G021844 | 0,1 | 59,6 | 3,9 | 84,1 | 26,6 | 11,5 | 3,6 |
| | 0,3 | 71,6 | 1,8 | 24,4 | 9,2 | 3,3 | 1,2 |

[001069] Se evaluó un ARNpg (G021844) del estudio descrito anteriormente en ratones con ARNm alternativos en diferentes niveles de dosis. Las LNP se prepararon generalmente como se describió en el Ejemplo 1 con una única especie de ARN como carga. Las LNP que contenían ARNpg (G21844) o ARNm (ARNm P o ARNm M) se formularon como se describe en el Ejemplo 1. Las LNP utilizadas fueron preparadas con una proporción molar de 50% de lípido A, 38% de colesterol, 9% de DSPC y 3% de PEG2k-DMG. Las LNP fueron formuladas con una relación molar de amina lipídica a ARN fosfato (N:P) de aproximadamente 6. Tanto G000502 como G021844 tienen como diana el exón 3 del gen TTR del ratón. Se administraron dosis de la LNP que contenía ARNpg y la LNP que contenía ARNm simultáneamente en base al peso combinado de ARN en una proporción de 2:1 guía:ARNm en peso de ARN, respectivamente. Se coformuló una LNP adicional con G000502 y ARNm de SpyCas9 en una proporción de 1:2 en peso, respectivamente, una relación preferida entre la guía y el ARNm de SpyCas9.

[001070] Las LNP con carga de ARN como se indica en la Tabla 23 se administraron a ratones hembra CD-1 (n=4) a una dosis de 0,1 mg/kg o 0,03 mg/kg de ARN total. La eficiencia de edición para las LNP que contienen los ARNg indicados se muestran en el cuadro 23 y se ilustran en las figuras 17D-17E.

**Tabla 23. Edición hepática e inactivación de la proteína TTR en suero**

| Guía | ARNm | Dosis (mg/kg) | Media % edición | SD | Media de TTR en suero (ug/ml) | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TSS | TSS | NA | 0,12 | 0,04 | 937,4 | 100,5 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| G000502 | SpyCas9 | 0,1 | 44,50 | 6,9 | 370,7 | 80,1 |
| G021844 | ARNm P (SEQ ID NO: 368) | 0,03 | 37,70 | 2,9 | 398,7 | 41,9 |
| | | 0,1 | 65,40 | 2,2 | 92,8 | 27,5 |
| | ARNm M (SEQ ID NO: 365) | 0,03 | 32,02 | 2,1 | 527,4 | 93,6 |
| | | 0,1 | 62,50 | 17,4 | 268,6 | 236,8 |

**Ejemplo 12. Edición *in vivo* con NmeCas9 y ARNsg o ARNpg**

[001071] La eficiencia de edición de los ARNpg modificados probados con Nme2Cas9 fue evaluada en un modelo de ratón. Todos los ARNsg de Nme evaluados comprendían la misma secuencia guía de 24 nucleótidos dirigida a la mTTR.

[001072] Las LNP se prepararon generalmente como se describió en el Ejemplo 1 con una única especie de ARN como carga. Las LNP utilizadas fueron preparadas con una proporción molar de 50% de lípido A, 38% de colesterol, 9% de DSPC y 3% de PEG2k-DMG. Las LNP fueron formuladas con una relación molar de amina lipídica a ARN fosfato (N:P) de aproximadamente 6. Las LNP fueron mezcladas en una relación de 2:1 en peso de ARNg a carga de ARNm. La dosis se calcula en base al peso de ARN combinado de ARNg y ARNm. La solución de transporte y almacenamiento (TSS) utilizada en la preparación de la LNP se dosificó en el experimento como un control negativo solo para el vehículo.

[001073] Se utilizaron ratones hembra CD-1 de 6 a 10 semanas de edad en cada estudio en ratones (n = 5 por grupo, excepto control de TSS n = 4). Las formulaciones se administraron por vía intravenosa mediante inyección en la vena de la cola de acuerdo con las dosis indicadas en la Tabla 24. Los animales fueron observados periódicamente para detectar efectos adversos durante al menos 24 horas después de la administración de la dosis. Seis días después del tratamiento, los animales fueron sacrificados por punción cardíaca bajo anestesia con isoflurano y se recogió tejido hepático para su análisis posterior. Se colectaron muestras por punción hepáticas con un peso de entre 5 y 15 mg para el aislamiento del ADN genómico y el ARN total. Las muestras de ADN genómico se analizaron con secuenciación NGS, tal como se describe en el ejemplo 1. La eficiencia de edición para las LNP que contienen los ARNm y ARNg indicados se muestra en la Tabla 24 y se ilustra en la Figura 18.

**Tabla 24. Media de porcentaje de edición en hígado de ratón**

| ARNm | ARNg | Dosis (mg/kg) | Media % edición | SD | N |
|---|---|---|---|---|---|
| TSS | TSS | - | 0,08 | 0,05 | 4 |
| ARNm P (2x N término NLS, HiBit) | G021536 (101-nt Nme ARNsg) | 0,03 | 21,68 | 6,87 | 5 |
| | | 0,1 | 63,22 | 3,28 | 5 |
| ARNm P (2x N término NLS, HiBit) | G021844 (ARNpg de Nme 93-nt) | 0,03 | 36,28 | 9,45 | 5 |
| | | 0,1 | 66,44 | 3,55 | 5 |
| ARNm O (2 x NLS a N plazo) | G021844 (ARNpg de Nme 93-nt) | 0,03 | 40,88 | 14,16 | 5 |
| | | 0,1 | 66,02 | 5,01 | 5 |

**Ejemplo 13. Edición de bases *in vivo* con ARNg**

[001074] La eficiencia de edición de los ARNg modificados con diferentes ARNm fueron probados con la construcción del editor de bases Nme en el modelo de ratón. Las LNP se prepararon generalmente como se describió en el Ejemplo 1 con una única especie de ARN como carga. Las LNP utilizadas fueron preparadas con una proporción molar de 50% de lípido A, 38% de colesterol, 9% de DSPC y 3% de PEG2k-DMG. Las LNP fueron formuladas con una relación molar de aminas lipídicas a fosfato de ARN (N:P) de aproximadamente 6. Las LNP utilizadas fueron formuladas como se describe en el Ejemplo 1, excepto que cada componente, ARN guía o ARNm fue formulado individualmente en una LNP, y la LNP se mezcló antes de la administración como se describe en la Tabla 25. Para las muestras de editores de base Nme2Cas9 y Nme2Cas9, se mezclaron LNP en una proporción de 2:1 en peso de ARNg a carga de ARNm del editor. En el caso de muestras de editores de base SpyCas9, se mezclaron LNP en una relación de 1:2 en peso de ARNg con carga de ARNm de editor. La dosis, como se indica en la Tabla 31 y la Figura 14, se calcula con base en el peso de ARN combinado de ARNg y ARNm del editor. Las muestras del editor de base se trataron con 0,03 mg/kg adicionales de ARNm de UGI. La solución de transporte y almacenamiento (TSS) utilizada en la preparación de la LNP se dosificó en el experimento como un control negativo solo para el vehículo.

[001075] Se utilizaron ratones hembra CD-1 de 6 a 10 semanas de edad en cada estudio en ratones (n = 5 por grupo, excepto control de TSS n = 4). Las formulaciones se administraron por vía intravenosa mediante inyección en la vena de la cola de acuerdo con

las dosis mencionadas en la Tabla 25. Los animales fueron observados periódicamente para detectar efectos adversos durante al menos 24 horas después de la administración de la dosis. Seis días después del tratamiento, se sometió a los animales a eutanasia mediante punción cardíaca con isoflurano como anestesia y se recogió tejido hepático para su análisis posterior. Se colectaron muestras por punción hepáticas con un peso de entre 5 y 15 mg para el aislamiento del ADN genómico y el ARN total. El ADN genómico se extrajo utilizando un kit de aislamiento de ADN (ZymoResearch, D3010) y las muestras se analizaron con secuenciación NGS, como se describe en el ejemplo 1. La eficiencia de edición de las LNP que contienen los ARNg indicados se muestra en el cuadro 25 y se ilustra en la figura 19.

**Tabla 25. Media de porcentaje de edición en hígado de ratón**

| Muestra | Dosis (mg/kg) | % de C a T | | | % de C a A/G | | | % indel | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Media | SD | n | Media | SD | n | Media | SD | n |
| TSS | 0 | 0,00 | 0,00 | 4 | 0,10 | 0,00 | 4 | 0,08 | 0,05 | 4 |
| ARNm O + G021844 (Nme2Cas9 + ARNpg) | 0,03 | 0,00 | 0,00 | 5 | 0,08 | 0,04 | 5 | 40,88 | 14,16 | 5 |
| | 0,1 | 0,00 | 0,00 | 5 | 0,02 | 0,04 | 5 | 66,02 | 5,01 | 5 |
| ARNm S + ARNm G + G021844 (Editor de base Nme2 + UGI + ARNpg) | 0,03 | 25,60 | 5,28 | 5 | 3,50 | 0,76 | 5 | 11,14 | 2,18 | 5 |
| | 0,1 | 46,34 | 1,53 | 5 | 5,74 | 0,33 | 5 | 13,52 | 0,90 | 5 |
| ARNm E + ARNm G + G000502 (SpyBC22n + UGI + ARNsg) | 0,03 | 9,28 | 2,82 | 5 | 0,94 | 0,54 | 5 | 7,34 | 1,61 | 5 |
| | 0,1 | 30,72 | 8,51 | 5 | 2,86 | 0,23 | 5 | 15,60 | 2,58 | 5 |

**Ejemplo 14. Edición *in vitro* en células de hepatoma humano utilizando ARNpg modificados**

[001076] Los ARN guía dirigidos a la misma secuencia diana en el locus genómico de HEK3 con varias secuencias de andamiaje se diseñaron con truncamientos del tallo superior como se muestra en la Tabla 2B. Los ARNg fueron lipoinfectados en células de hepatoma humano (Huh7) para determinar la eficiencia de edición de la siguiente manera. Las células se sembraron a una densidad de 15 000 células/pocillo. Se utilizó el reactivo Lipofectamina™ MessengerMAX™ (Thermofisher) y se prepararon muestras de acuerdo con el protocolo del fabricante con 50 ng de ARNm SpyCas9 (SEQ ID NO: 323)/reacción y una concentración guía inicial de 50 nM. Cada ARN guía se diluyó 5 veces en serie para obtener una respuesta a la dosis de 6 puntos. Se incluyeron muestras duplicadas en el ensayo. Los resultados de media de edición con desviación estándar (SD) se muestran en la Tabla 26 y en la Fig. 20.

**Tabla 26. Edición *in vitro* en células Huh7**

| **ID de guía** | | **ARNg (nM)** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **0,016** | **0,08** | **0,4** | **2** | **10** | **50** |
| G030924 | **% indel** | 79,40 | 80,45 | 84,95 | 78,00 | 89,35 | 76,65 |
| | **SD** | 0,71 | 3,18 | 0,21 | 11,88 | 1,91 | 1,77 |
| G030925 | **% indel** | 81,00 | 83,75 | 86,95 | 90,00 | 90,20 | 76,50 |
| | **SD** | 2,83 | 1,48 | 0,49 | 0,42 | 1,70 | 3,54 |
| G030926 | **% indel** | 85,30 | 87,90 | 89,70 | 91,85 | 92,80 | 77,80 |
| | **SD** | 1,98 | 1,27 | 0,28 | 0,21 | 0,14 | 2,12 |
| G030927 | **% indel** | 82,05 | 85,80 | 87,40 | 88,90 | 90,90 | 79,00 |
| | **SD** | 4,45 | 1,56 | 1,70 | 0,57 | 0,57 | 0,99 |
| G030928 | **% indel** | 66,70 | 78,15 | 81,25 | 85,35 | 88,15 | 80,45 |
| | **SD** | 3,25 | 0,64 | 3,18 | 2,05 | 0,35 | 2,19 |
| G030929 | **% indel** | 74,60 | 88,00 | 80,85 | 82,55 | 84,25 | 79,65 |
| | **SD** | 2,83 | 16,97 | 4,31 | 1,48 | 1,06 | 1,63 |
| G025989 | **% indel** | 80,60 | 81,90 | 84,90 | 87,35 | 88,90 | 74,40 |
| | **SD** | 1,27 | 2,26 | 0,85 | 1,06 | 0,14 | 0,71 |
| G030930 | **% indel** | 75,25 | 79,60 | 80,90 | 83,05 | 86,15 | 72,45 |
| | **SD** | 0,21 | 2,26 | 3,11 | 0,64 | 0,21 | 2,33 |

**Ejemplo 15. Modalidades adicionales**

[001077] Los siguientes elementos numerados proporcionan apoyo adicional y descripciones de las modalidades aquí descritas.

[001078] El elemento 1 es un ARN guía (ARNg) que comprende un conector interno.

[001079] El elemento 2 es el ARNg del elemento 1, en donde el conector interno sustituye al menos 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 o 28 nucleótidos del ARNg.

[001080] El elemento 3 es el ARNg del elemento 1 o 2, en donde el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 3 a 30 átomos, opcionalmente, de 12 a 21 átomos, y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg.

[001081] El elemento 4 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 3, en donde el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 18 átomos, opcionalmente, de 6 a 12 átomos y el conector sustituye al menos 2 nucleótidos del ARNg.

[001082] El elemento 5 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 4, en donde el conector interno sustituye 2 a 12 nucleótidos.

[001083] El elemento 6 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 5, en donde el conector interno está en una región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[001084] El elemento 7 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 6, en donde el conector interno sustituye al menos 4 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[001085] El elemento 8 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 7, en donde el conector interno sustituye hasta 28 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[001086] El elemento 9 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 8, en donde el conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[001087] El elemento 10 es el ARNg de cualquiera de uno de los elementos 1 a 9, en donde el conector interno está en una región de horquilla del ARNg.

[001088] El elemento 11 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 10, en donde el conector interno sustituye al menos 2 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg.

[001089] El elemento 12 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 11, en donde el conector interno sustituye hasta 22 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg.

[001090] El elemento 13 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 12, en donde el conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de la región de horquilla del ARNg.

[001091] El elemento 14 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 13, en donde el conector interno sustituye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 pares de bases de la región de horquilla del ARNg.

[001092] El elemento 15 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 14, en donde el conector interno está en una región nexo del ARNg.

[001093] El elemento 16 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 15, en donde el conector interno sustituye 1 o 2 nucleótidos de la región nexo del ARNg.

[001094] El elemento 17 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 16, en donde el conector interno está en una región de horquilla entre una primera porción del ARNg y una segunda porción del ARNg, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[001095] El elemento 18 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 17, en donde el conector interno une una primera porción de un dúplex y una segunda porción de un dúplex, en donde el dúplex comprende de 2 a 10 pares de bases.

[001096] El elemento 19 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 18, en donde el ARNg comprende dos conectores internos.

[001097] El elemento 20 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 18, en donde el ARNg comprende tres conectores internos.

[001098] El elemento 21 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 20, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición está en una horquilla entre una primera porción y una segunda porción de la región de repetición y antirrepetición, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[001099] El elemento 22 el ARNg del elemento 21, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye 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 o 28 nucleótidos de la horquilla.

[001100] El elemento 23 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 22, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye al menos 4 nucleótidos de la horquilla.

[001101] El elemento 24 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 23, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye hasta 28 nucleótidos de la horquilla.

[001102] El elemento 25 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 24, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye de 4 a 20 nucleótidos de la horquilla.

[001103] El elemento 26 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 25, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye de 4 a 14 nucleótidos de la horquilla.

[001104] El elemento 27 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 26, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye de 4 a 6 nucleótidos de la horquilla.

[001105] El elemento 28 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 27, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla.

[001106] El elemento 29 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 28, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla.

[001107] El elemento 30 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 27, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla.

[001108] El elemento 31 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 27, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y al menos 1 nucleótido del tallo de la horquilla.

[001109] El elemento 32 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 31, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[001110] El elemento 33 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 32, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y al menos 2 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[001111] El elemento 34 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 32, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[001112] El elemento 35 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 32, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 pares de bases del tallo de la horquilla.

[001113] El elemento 36 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 32, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye todos los nucleótidos del bucle de la horquilla.

[001114] El elemento 37 es el ARNg de cualquiera de los elementos 21 a 32, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye todos los nucleótidos que consistuyen el bucle y el tallo de la horquilla.

[001115] El elemento 38 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 37, en donde el conector interno sustituye 1 o 2 nucleótidos de la región nexo del ARNg.

[001116] El elemento 39 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 38, en donde el conector interno sustituye una horquilla del ARNg.

[001117] El elemento 40 es el ARNg del elemento 39, en donde el conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de la horquilla.

[001118] El elemento 41 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 40, en donde el conector interno sustituye de 2 a 22 nucleótidos de la horquilla.

[001119] El elemento 42 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 41, en donde el conector interno sustituye de 2 a 12 nucleótidos de la horquilla.

[001120] El elemento 43 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 42, en donde el conector interno sustituye de 2 a 6 nucleótidos de la horquilla.

[001121] El elemento 44 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 43, en donde el conector interno sustituye de 2 a 4 nucleótidos de la horquilla.

[001122] El elemento 45 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 44, en donde el conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla.

[001123] El elemento 46 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 45, en donde el conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla.

[001124] El elemento 47 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 46, en donde el conector interno sustituye 2, 3, 4 o 5 nucleótidos del bucle de la horquilla.

[001125] El elemento 48 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 47, en donde el conector interno sustituye el bucle de la horquilla y al menos 1 nucleótido del tallo de la horquilla.

[001126] El elemento 49 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 48, en donde el conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[001127] El elemento 50 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 49, en donde el conector interno sustituye el bucle de la horquilla y al menos 2 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[001128] El elemento 51 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 50, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y al menos 18 nucleótidos del tallo de la horquilla.

[001129] El elemento 52 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 51, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 pares de bases del tallo de la horquilla.

[001130] El elemento 53 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 52, en donde el conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la horquilla.

[001131] El elemento 54 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 53, en donde el conector interno sustituye todos los nucleótidos que consistuyen el bucle y el tallo de la horquilla.

[001132] El elemento 55 es el ARNg de cualquiera de los artículos 39 a 54, en donde la horquilla es una horquilla 1.elementos

[001133] El elemento 56 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 54, en donde la horquilla es una horquilla 2.

[001134] El elemento 57 es el ARNg de cualquiera de los elementos 39 a 54, en donde la horquilla es una horquilla 1 y el conector interno sustituye la horquilla 1.

[001135] El elemento 58 es el ARNg del artículo 57, en donde el ARNg comprende además una horquilla 2 a 3’ de la horquilla 1.

[001136] El elemento 59 es el ARNg del elemento 58, en donde el conector interno sustituye al menos 2 nucleótidos de un bucle de la horquilla 2.

[001137] El elemento 60 es el ARNg del elemento 58 o 59, en donde el conector interno no sustituye a la horquilla 2.

[001138] El elemento 61 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 60, que comprende además una región guía.

[001139] El elemento 62 es el ARNg del elemento 61, en donde la región guía tiene 17, 18, 19, o 20 nucleótidos de longitud.

[001140] El elemento 63 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 62, en donde el ARNg es un ARN guía único (ARNsg).

[001141] El elemento 64 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 62, en donde el ARNg comprende un ARNtracr (ARNtr).

[001142] El elemento 65 es un ARN guía (ARNg), en donde el ARNg es un ARN guía único (ARNsg) que comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región nexo, una región horquilla 1 y una región horquilla 2, y comprende al menos uno de:

1) un primer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de una región del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición;

2) un segundo conector interno que sustituye 1 o 2 nucleótidos de la región de nexo; y

3) un tercer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la horquilla 1.

[001143] El elemento 66 es el ARNg del elemento 65, en donde el ARNsg comprende el primer conector interno y el segundo conector interno.

[001144] El elemento 67 es el ARNg del elemento 65, en donde el ARNsg comprende el primer conector interno y el tercer conector interno.

[001145] El elemento 68 es el ARNg del elemento 65, en donde el ARNsg comprende el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[001146] El elemento 69 es el ARNg del elemento 65, en donde el ARNsg comprende el primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[001147] El elemento 70 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 69, en donde el primer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente, de aproximadamente 15 a 21 átomos.

[001148] El elemento 71 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 70, en donde el primer conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de tallo superior.

[001149] El elemento 72 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 71, en donde el primer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la región de tallo superior.

[001150] El elemento 73 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 72, en donde el primer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la región de tallo superior.

[001151] El elemento 74 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 73, en donde el primer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la región de tallo superior.

[001152] El elemento 75 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 74, en donde el primer conector interno sustituye el bucle de la región de tallo superior y al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos del tallo de la región de tallo superior.

[001153] El elemento 76 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 75, en donde el primer conector interno sustituye el bucle de la región de tallo superior y 1, 2, 3 o 4 pares de bases del tallo de la región de tallo superior.

[001154] El elemento 77 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 76, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la región de tallo superior.

[001155] El elemento 78 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 77, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que consistuyen el bucle y el tallo de la región de tallo superior.

[001156] El elemento 79 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 78, en donde el segundo conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 18 átomos, opcionalmente, aproximadamente de 6 a 12 átomos.

[001157] El elemento 80 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 79, en donde el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de la región nexo del ARNsg.

[001158] El elemento 81 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 80, en donde el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de un bucle de la región nexo del ARNsg.

[001159] El elemento 82 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 81, en donde el tercer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30, opcionalmente, de aproximadamente 12 a 21 átomos.

[001160] El elemento 83 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 82, en donde el tercer conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la horquilla 1 del ARNg.

[001161] El elemento 84 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 83, en donde el tercer conector sustituye 1, 2, 3, 4 o 5 pares de bases de la horquilla 1 del ARNg.

[001162] El elemento 85 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 84, en donde el tercer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla 1.

[001163] El elemento 86 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 85, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla 1.

[001164] El elemento 87 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 86, en donde el tercer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla 1.

[001165] El elemento 88 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 87, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y al menos 1 nucleótido del tallo de la horquilla 1.

[001166] El elemento 89 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 88, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 2, 4 o 6 nucleótidos del tallo de la horquilla 1.

[001167] El elemento 90 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 89, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2 o 3 pares de bases del tallo de la horquilla 1.

[001168] El elemento 91 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 90, en donde el tercer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la horquilla 1.

[001169] El elemento 92 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 91, en donde el tercer conector interno sustituye todos los nucleótidos que consistuyen el bucle y el tallo de la horquilla 1.

[001170] El elemento 93 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 92, en donde la región de horquilla 2 del ARNsg no contiene ningún conector interno.

[001171] El elemento 94 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 93, en donde el ARNsg es un ARNsg de Cas9 de *S. pyogenes*.

[001172] El elemento 95 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 94, en donde el ARNsg comprende una porción conservada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 400.

[001173] El elemento 96 es el ARNg del elemento 95, en donde 2, 3 o 4 de los nucleótidos 13 a 16 (US5-US8 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001174] El elemento 97 es el ARNg de cualquiera de los elementos 95 y 96, en donde los nucleótidos 12 a 17 (US4-US9 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001175] El elemento 98 es el ARNg de cualquiera de los elementos 95 a 97, en donde d nucleótidos de 11 a 18 (US3-US10 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001176] El elemento 99 es el ARNg del elemento 95 a 98, en donde los nucleótidos 10 a 19 (US2-US11 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001177] El elemento 100 es el ARNg de cualquiera de los elementos 95 a 99, en donde los nucleótidos 9 a 20 (US1-US10 de la región de tallo superior) sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001178] El elemento 101 es el ARNg de cualquiera de los elementos 95 a 100, en donde los nucleótidos 36 a 37 (N6-N7 de la región nexo) sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001179] El elemento 102 es el ARNg de cualquiera de los elementos 95 a 101, en donde 2, 3 o 4 de los nucleótidos 53 a 56 (H1-5-H1-8 de la horquilla 1) sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001180] El elemento 103 es el ARNg de cualquiera de los elementos 95 a 102, en donde los nucleótidos 52 a 57 (H1-4-H1-9 de la horquilla 1) sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001181] El elemento 104 es el ARNg de cualquiera de los elementos 95 a 103, en donde los nucleótidos 51 a 58 (H1-3-H1-10 de la horquilla 1) sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001182] El elemento 105 es el ARNg de cualquiera de los elementos 95 a 104, en donde los nucleótidos 50 a 59 (H1-1-H1-12 de la horquilla 1) sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001183] El elemento 106 es el ARNg de cualquiera de los elementos 95 a 105, en donde se eliminan los nucleótidos 77 a 80 con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001184] El elemento 107 es el ARNg de cualquiera de los elementos 65 a 94, en donde el ARNsg comprende una secuencia de SEQ ID NO: 201.

[001185] El elemento 108 es el ARNg del elemento 107, en donde 2, 3 o 4 de los nucleótidos 33 a 36 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[001186] El elemento 109 es el ARNg de cualquiera de los elementos 107 a 108, en donde los nucleótidos 32 a 37 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[001187] El elemento 110 es el ARNg de cualquiera de los elementos 107 a 109, en donde los nucleótidos 31 a 38 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[001188] El elemento 111 es el ARNg de cualquiera de los elementos 107 a 110, en donde los nucleótidos 30 a 39 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[001189] El elemento 112 es el ARNg de cualquiera de los elementos 107 a 111, en donde los nucleótidos 29 a 40 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[001190] El elemento 113 es el ARNg de cualquiera de los elementos 107 a 112, en donde los nucleótidos 55 a 56 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[001191] El elemento 114 es el ARNg de cualquiera de los elementos 107 a 113, en donde 2, 3 o 4 de los nucleótidos 50 a 53 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[001192] El elemento 115 es el ARNg de cualquiera de los elementos 107 a 114, en donde los nucleótidos 49 a 54 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[001193] El elemento 116 es el ARNg de cualquiera de los elementos 107 a 115, en donde se eliminan los nucleótidos 77 a 80 con respecto a la SEQ ID NO: 201.

[001194] El elemento 117 es un ARN guía (ARNg), en donde el ARNg es un ARN guía único (ARNsg) que comprende una región guía y una porción conservada en 3’ con respecto a la región guía,

en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región de horquilla 1, y una región de horquilla 2, y también comprende al menos uno de:

1) un primer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de una región del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición del ARNsg;

2) un segundo conector interno que sustituye 1 o 2 nucleótidos de la horquilla 1 del ARNsg; o

3) un tercer conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la horquilla 2 del ARNsg.

[001195] El elemento 118 es el ARNg del elemento 117, en donde el ARNsg comprende el primer conector interno y el segundo conector interno.

[001196] El elemento 119 es el ARNg del elemento 117, en donde el ARNsg comprende el primer conector interno y el tercer conector interno.

[001197] El elemento 120 es el ARNg del elemento 117, en donde el ARNsg comprende el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[001198] El elemento 121 es el ARNg del elemento 117, en donde el ARNsg comprende el primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[001199] El elemento 122 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 121, en donde el primer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente, de aproximadamente 15 a 21 átomos.

[001200] El elemento 123 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 122, en donde el primer conector interno está en una horquilla entre una primera porción del ARNsg y una segunda porción del ARNsg, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[001201] El elemento 124 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 123, en donde el primer conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de tallo superior.

[001202] El elemento 125 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 124, en donde el primer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la región de tallo superior.

[001203] El elemento 126 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 125, en donde el primer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la región de tallo superior.

[001204] El elemento 127 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 126, en donde el primer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la región de tallo superior.

[001205] El elemento 128 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 127, en donde el primer conector interno sustituye el bucle de la región de tallo superior y al menos 2, 4, 6 u 8 nucleótidos del tallo de la región de tallo superior.

[001206] El elemento 129 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 128, en donde el primer conector interno sustituye el bucle de la región de tallo superior y 1, 2, 3 o 4 pares de bases del tallo de la región de tallo superior.

[001207] El elemento 130 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 129, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la región de tallo superior.

[001208] El elemento 131 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 130, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que consistuyen el bucle y el tallo de la región de tallo superior.

[001209] El elemento 132 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 131, en donde el segundo conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 18 átomos, opcionalmente, aproximadamente de 6 a 12 átomos.

[001210] El elemento 133 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 132, en donde el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de la horquilla 1 del ARNsg.

[001211] El elemento 134 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 133, en donde el segundo conector interno sustituye 2 nucleótidos de una región de tallo de la región nexo del ARNsg.

[001212] El elemento 135 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 134, en donde el tercer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30, opcionalmente, de aproximadamente 12 a 21 átomos.

[001213] El elemento 136 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 135, en donde el tercer conector interno sustituye 4, 6, 8, 10 o 12 nucleótidos de la horquilla 2 del ARNg.

[001214] El elemento 137 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 136, en donde el tercer conector sustituye 1, 2, 3, 4 o 5 pares de bases de la horquilla 2 del ARNg.

[001215] El elemento 138 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 137, en donde el tercer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla 2.

[001216] El elemento 139 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 138, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla 2.

[001217] El elemento 140 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 139, en donde el tercer conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla 2.

[001218] El elemento 141 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 140, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y al menos 1 nucleótido del tallo de la horquilla 2.

[001219] El elemento 142 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 141, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 2, 4 o 6 nucleótidos del tallo de la horquilla 2.

[001220] El elemento 143 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 142, en donde el conector interno en la región de repetición y antirrepetición sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2 o 3 nucleótidos del tallo de la horquilla 2.

[001221] El elemento 144 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 143, en donde el tercer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la horquilla 2.

[001222] El elemento 145 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 144, en donde el tercer conector interno está en una horquilla entre una primera porción del ARNsg y una segunda porción del ARNsg, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[001223] El elemento 146 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 145, en donde el ARNg es un ARN guía de Cas9 de *S. aureus* (SauCas9) y no incluye el tercer conector interno.

[001224] El elemento 147 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 146, en donde el ARNg es un ARN guía de Cas9 de *C. diphtheriae* (CdiCas9), un ARN guía de Cas9 de *S. thermophilus* (St1Cas9) o un ARN guía de Cas9 de *Acidothermus cellulolyticus* (AceCas9).

[001225] El elemento 148 es el ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 147, en donde el ARNsg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 202.

[001226] El elemento 149 es el ARNg del elemento 148, en donde 22, 3 o 4 de los nucleótidos 35 a 38 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[001227] El elemento 150 es el ARNg de cualquiera de los elementos 148 a 149, en donde los nucleótidos 34 a 39 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[001228] El elemento 151 es el ARNg de cualquiera de los elementos 148 a 150, en donde los nucleótidos 33 a 40 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[001229] El elemento 152 es el ARNg de cualquiera de los elementos 148 a 151, en donde los nucleótidos 32 a 41 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[001230] El elemento 153 es el ARNg de cualquiera de los elementos 148 a 152, en donde los nucleótidos 31 a 42 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[001231] El elemento 154 es el ARNg de cualquiera de los elementos 148 a 153, en donde los nucleótidos 61 a 62 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[001232] El elemento 155 es el ARNg de cualquiera de los elementos 148 a 154, en donde 2, 3 o 4 de los nucleótidos 84 a 87 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[001233] El elemento 156 es el ARNg de cualquiera de los elementos 148 a 155, en donde los nucleótidos 83 a 88 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[001234] El elemento 157 es el ARNg de cualquiera de los elementos 148 a 156, en donde los nucleótidos 82 a 89 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[001235] El elemento 158 es el ARNg de cualquiera de los elementos 148 a 157, en donde los nucleótidos 81 a 90 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[001236] El elemento 159 es el ARNg de cualquiera de los elementos 148 a 158, en donde se eliminan los nucleótidos 97 a 100 con respecto a la SEQ ID NO: 202.

[001237] El elemento 160 es un ARN guía (ARNg) que comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición, una región de horquilla 1 y una región de horquilla 2, y comprende un primer conector interno que sustituye al menos 2

nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición y un segundo conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la horquilla 2.

[001238] El elemento 161 es el ARNg del elemento 160, en donde el primer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente, de aproximadamente 15 a 21 átomos.

[001239] El elemento 162 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 161, en donde el primer conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[001240] El elemento 163 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 162, en donde el primer conector interno está en una región horquilla entre una primera porción del ARNsg y una segunda porción de la región de repetición y antirrepetición, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[001241] El elemento 164 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 163, en donde el primer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[001242] El elemento 165 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 164, en donde el primer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[001243] El elemento 166 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 165, en donde el primer conector interno sustituye 1, 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[001244] El elemento 167 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 166, en donde el primer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos del tallo superior de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[001245] El elemento 168 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 167, en donde el primer conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 pares de bases del tallo superior de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[001246] El elemento 169 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 168, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos constituyen el bucle de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[001247] El elemento 170 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 169, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo superior de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición.

[001248] El elemento 171 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 169, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la región de repetición y antirrepetición, y el tallo superior de la horquilla de la región de repetición y antirrepetición comprende al menos un par de bases o no más de uno, dos o tres pares de bases.

[001249] El elemento 172 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 171, en donde el segundo conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30, opcionalmente, de aproximadamente 12 a 21 átomos.

[001250] El elemento 173 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 172, en donde el segundo conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de la horquilla 2 del ARNg.

[001251] El elemento 174 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 173, en donde el segundo conector interno sustituye una región de bucle de la horquilla 2.

[001252] El elemento 175 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 174, en donde el segundo conector interno sustituye una región de bucle y parte de una región de tallo de la horquilla 2.

[001253] El elemento 176 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 175, en donde el segundo conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla 2.

[001254] El elemento 177 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 176, en donde el segundo conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla 2.

[001255] El elemento 178 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 177, en donde el segundo conector interno sustituye 2, 3 o 4 nucleótidos del bucle de la horquilla 2.

[001256] El elemento 179 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 178, en donde el segundo conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la horquilla 2.

[001257] El elemento 180 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 179, en donde el segundo conector interno sustituye el bucle de la horquilla 2 y al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos del tallo de la horquilla 2.

[001258] El elemento 181 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 180, en donde el segundo conector interno sustituye el bucle de la horquilla y 1, 2 o 3 pares de bases del tallo de la horquilla 2

[001259] El elemento 182 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160-181, en donde el ARNg es un ARN guía de St1Cas9.

[001260] El elemento 183 es el ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 182, en donde el ARNsg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 204.

[001261] El elemento 184 es el ARNg del elemento 183, en donde los nucleótidos 41 a 44 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[001262] El elemento 185 es el ARNg de cualquiera de los elementos 183 a 184, en donde los nucleótidos 101 a 103 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[001263] El elemento 186 es el ARNg de cualquiera de los elementos 183 a 185, en donde los nucleótidos 100 a 104 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[001264] El elemento 187 es el ARNg de cualquiera de los elementos 183 a 186, en donde los nucleótidos 99 a 105 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[001265] El elemento 188 es el ARNg de cualquiera de los elementos 183 a 187, en donde los nucleótidos 98 a 106 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[001266] El elemento 189 es el ARNg de cualquiera de los elementos 183 a 188, en donde se sustituyen 2 a 18 de los nucleótidos entre los nucleótidos 94 a 111 con respecto a la SEQ ID NO: 204.

[001267] El elemento 190 es un ARN guía (ARNg) que comprende una región guía y una porción conservada 3' con respecto a la región guía, en donde la porción conservada comprende una región de repetición y antirrepetición y una región horquilla, y comprende un conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición.

[001268] El elemento 191 es el ARNg del elemento 190, en donde el primer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente, de aproximadamente 12 a 21 átomos.

[001269] El elemento 192 es el ARNg de cualquiera de los elementos 190 o 191, en donde el primer conector interno sustituye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[001270] El elemento 193 es el ARNg de cualquiera de los elementos 190 a 192, en donde el primer conector interno está en una región horquilla entre una primera porción del ARNsg y una segunda porción de la región de repetición y antirrepetición, en donde la primera porción y la segunda porción juntas forman una porción dúplex.

[001271] El elemento 194 es el ARNg de cualquiera de uno de los elementos 190 a 193, en donde el ARNg es un ARN guía de Cas9 *C. jejuni* (CjeCas9).

[001272] El elemento 195 es el ARNg de cualquiera de los elementos 190 a 194, en donde el ARNg es un ARN guía de CjeCas9 y el conector interno está presente solo en la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[001273] El elemento 196 es el ARNg de cualquiera de los elementos 190 a 195, en donde el ARNsg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 207.

[001274] El elemento 197 es el ARNg del elemento 196, en donde los nucleótidos 33 a 36 sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 207.

[001275] El elemento 198 es el ARNg de cualquiera de los elementos 196 a 197, en donde 1, 2, 3, 4, 5 o 6 pares de bases de los nucleótidos 27 a 32 y 37 a 42 sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 207.

[001276] El elemento 199 es el ARNg de cualquiera de los elementos 190 a 193, en donde el ARNg es un ARN guía de Cas9 de *Francisella novicida* (FnoCas9).

[001277] El elemento 200 es el ARNg del elemento 199, en donde el ARNsg comprende una secuencia de SEQ ID NO: 208.

[001278] El elemento 201 es el ARNg del elemento 200, en donde 2, 3 o 4 de los nucleótidos 40 a 43 sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 208.

[001279] El elemento 202 es el ARNg de cualquiera de los elementos 200 a 201, en donde los nucleótidos 39 a 44 sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 208.

[001280] El elemento 203 es un ARN guía (ARNg) que comprende una región de repetición y antirrepetición, y un conector interno que sustituye al menos 2 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición.

[001281] El elemento 204 es el ARNg del elemento 203, en donde el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente, aproximadamente 15 a 21 átomos.

[001282] El elemento 205 es el ARNg de cualquiera de los elementos 203 a 204, en donde el conector interno sustituye 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.

[001283] El elemento 206 es la composición de cualquiera de los elementos 203 a 205, en donde el ARNg es un ARN guía de Cpf1.

[001284] El elemento 207 es la composición del elemento 206, en donde el ARN guía de Cpf1 es un ARN guía de Cpf1 (LbCpf1) de la bacteria *Lachnospiraceae*, o un ARN guía de Cpf1 de *Acidaminococcus sp.* (AsCpf1).

[001285] El elemento 208 es el ARNg de cualquiera de los elementos 203 a 207, en donde el ARNsg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 209 y los nucleótidos 11 a 14 o 12 a 15 u opcionalmente 12 a 14 sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 209.

[001286] El elemento 209 es la composición de cualquiera de los elementos 203 a 205, en donde el ARN guía es un ARN guía de *Eubacterium siraeum* (EsCas13d).

[001287] El elemento 210 es el ARNg de cualquiera de los elementos 203 a 205 y 209, en donde el ARNsg comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 210 y los nucleótidos 9 a 16, u opcionalmente 10 a 15, o al menos 2 nucleótidos de estos sustituyen el conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 210.

[001288] El elemento N211 es el ARNg del elemento 1, en donde el conector interno es un primer conector interno, un segundo conector interno o un tercer conector interno, y el ARNg comprende una región guía y una región conservada que comprende uno o más de:

(a) una región de repetición y antirrepetición acortada, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 2 a 24 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 37 a 64 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 36 se enlaza con el nucleótido 65 mediante (i) un primer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos; o

(b) una región de horquilla 1 acortada, en donde la horquilla 1 acortada carece de 2 a 10, opcionalmente, 2 a 8 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 82 a 95 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 81 se enlaza con el nucleótido 96 mediante (i) un segundo conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos; o

(c) una región de horquilla 2 acortada, en donde la horquilla 2 acortada carece de 2 a 18, opcionalmente, 2 a 16 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 113 a 134 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 112 se enlaza con el nucleótido 135 mediante (i) un tercer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos;

en donde se eliminan uno de los nucleótidos 144 y 145 o ambos opcionalmente en comparación con la SEQ ID NO: 500.

[001289] El elemento N212 es un ARN guía (ARNg) que comprende una región guía y una región conservada que comprende uno o más de:

(a) una región de repetición y antirrepetición acortada, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 2 a 24 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 37 a 64 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 36 se enlaza con el nucleótido 65 mediante (i) un primer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos; o

(b) una región de horquilla 1 acortada, en donde la horquilla 1 acortada carece de 2 a 10, opcionalmente, 2 a 8 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 82 a 95 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 81 se enlaza con el nucleótido 96 mediante (i) un segundo conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos; o

(c) una región de horquilla 2 acortada, en donde la horquilla 2 acortada carece de 2 a 18, opcionalmente, 2 a 16 nucleótidos, en donde

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 113 a 134 y, opcionalmente, se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 112 se enlaza con el nucleótido 135 mediante (i) un tercer conector interno que solo o en combinación con nucleótidos sustituye 4 nucleótidos o (ii) al menos 4 nucleótidos;

en donde se eliminan uno de los nucleótidos 144 y 145 o ambos opcionalmente en comparación con la SEQ ID NO: 500;

en donde el ARNg comprende al menos uno del primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[001290] El elemento N213 es el ARNg del elemento N211 o N212, en donde el ARNg comprende al menos dos del primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[001291] El elemento N214 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N213, en donde el ARNg comprende el primer conector interno, el segundo conector interno y el tercer conector interno.

[001292] El artículo N215 es el ARNg de cualquiera de los artículos N211-N214, en donde al menos 10 nucleótidos son nucleótidos modificados.

[001293] El elemento N216 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N215, en donde la región guía tiene (i) una inserción de un nucleótido o una eliminación de 1 a 4 nucleótidos entre las posiciones 1 a 24 con respecto a la SEQ ID NO: 500 o (ii) una longitud de 24 nucleótidos.

[001294] El elemento N217 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N216, en donde la región guía tiene una longitud de 25, 24, 23, 22, 21 o 20 nucleótidos, opcionalmente en donde la región guía tiene una longitud de 25, 24, 23 o 22 nucleótidos en las posiciones 1 a 24 de la SEQ ID NO: 500.

[001295] El elemento N218 es el ARNg del elemento N217, en donde la región guía tiene una longitud de 23 o 24 nucleótidos en las posiciones 1 a 24 de la SEQ ID NO: 500.

[001296] El elemento N219 es el ARNg de cualquiera de uno de los artículos N211-N218, en donde el ARNg comprende además una cola 3'.

[001297] El artículo N220 es el ARNg del artículo N219, en donde la cola de 3' comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos.

[001298] El artículo N221 es el ARNg del artículo N220, en donde la cola 3’ comprende 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos.

[001299] El elemento N222 es el ARNg de cualquiera de uno de los elementos N219-N221, en donde la cola 3’ termina con un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado.

[001300] El elemento N223 es el ARNg de cualquiera de uno de los elementos N219-N222, en donde la cola 3’ es de 1 nucleótido de longitud.

[001301] El elemento N224 es el ARNg de cualquiera de los elementos N219 a N223, en donde la cola 3' consiste en un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado.

[001302] El elemento N225 es el ARNg de cualquiera de los elementos N219 a N224, en donde la cola 3' comprende una modificación de cualesquiera uno o más de los nucleótidos presentes en la cola 3'.

[001303] El elemento N226 es el ARNg de cualquiera de los elementos N219 a N225, en donde la modificación de la cola 3' es uno o más de nucleótidos modificados con 2'-O-metilo (2'-OMe) y un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

[001304] El elemento N227 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores N219-226, caracterizado porque la cola 3’ está totalmente modificada.

[001305] El elemento N228 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N227, en donde el nucleótido 3’ del ARNg es un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado.

[001306] El elemento N229 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211-N228, en donde uno o más de los nucleótidos 144 y 145 se eliminan con relación a la SEQ ID NO: 500.

[001307] El elemento N230 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N229, en donde se eliminan ambos nucleótidos 144 y 145 con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[001308] El elemento N231 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N218, en donde el ARNg no comprende una cola 3'.

[001309] El elemento N232 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211-N231, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 2 a 28 nucleótidos.

[001310] El elemento N233 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N232, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de 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 o 50 nucleótidos.

[001311] El elemento N234 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N233, en donde la región de repetición y antirrepetición carece de 12 a 28, opcionalmente, 18 a 24, nucleótidos.

[001312] El elemento N235 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N234, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos.

[001313] El elemento N236 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N235, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 nucleótidos.

[001314] El elemento N237 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N236, en donde los nucleótidos 37 a 64 de la SEQ ID NO: 500 forman el tallo superior y se eliminan uno o más pares de bases del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición.

[001315] El elemento N238 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N237, en donde el tallo superior de la región de repetición y antirrepetición acortada comprende no más de uno, dos, tres o cuatro pares de bases.

[001316] El elemento N239 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N238, en donde se eliminan todas las posiciones 39 a 48 y todas las posiciones 53 a 62 del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición acortada y, opcionalmente, se sustituye el nucleótido 38 o 63.

[001317] El elemento N240 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N239, en donde se eliminan todas las posiciones 38 a 63 del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición y, opcionalmente, se sustituye el nucleótido 37 o 64.

[001318] El elemento N241 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N240, en donde se eliminan todos los nucleótidos 37 a 64 del tallo superior de la región de repetición y antirrepetición y, opcionalmente, se sustituye el nucleótido 36 o 65.

[001319] El elemento N242 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N241, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una porción dúplex de 11 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.

[001320] El elemento N243 es el ARNg de una cualquiera de los elementos N211 a N242, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una única porción dúplex.

[001321] El elemento N244 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N243, en donde el tallo superior de la región de repetición y antirrepetición acortada incluye una o más sustituciones con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[001322] El elemento N245 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N244, en donde el primer conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 49 a 52.

[001323] El elemento N246 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N245, en donde se eliminan los nucleótidos 37 a 64 y el primer conector interno enlaza directamente el nucleótido 36 con el nucleótido 65.

[001324] El elemento N247 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N245, en donde se eliminan los nucleótidos 38 a 63 y el primer conector interno enlaza directamente el nucleótido 37 al nucleótido 64.

[001325] El elemento N248 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N245, en donde se eliminan los nucleótidos 39 a 62 y el primer conector interno enlaza directamente el nucleótido 38 con el nucleótido 63.

[001326] El elemento N249 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N248, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene 8 a 22 nucleótidos modificados.

[001327] El elemento N250 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211-N249, en donde la región de horquilla 1 acortada carece de 2 a 10, opcionalmente de 2 a 8 o 2 a 4 nucleótidos.

[001328] El elemento N251 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N250, en donde la región de horquilla 1 acortada tiene una longitud de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 nucleótidos.

[001329] El elemento N252 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N251, en donde la región de horquilla 1 acortada tiene una porción dúplex de 4 a 8, opcionalmente, de 7 a 8, nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.

[001330] El elemento N253 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211-N252, en donde la región de horquilla 1 acortada tiene una porción dúplex simple.

[001331] El elemento N254 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211-N253, en donde se eliminan uno o dos pares de bases de la región de horquilla 1 acortada.

[001332] El elemento N255 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N254, en donde el tallo de la región de horquilla 1 acortada tiene una longitud de siete u ocho nucleótidos con emparejamiento de bases.

[001333] El elemento N256 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N255, en donde se eliminan una o más posiciones 85 a 86 y uno o más de los nucleótidos 91 a 92 de la región de horquilla 1 acortada.

[001334] El elemento N257 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211-N256, en donde se eliminan los nucleótidos 86 y 91 de la región de horquilla 1 acortada.

[001335] El elemento N258 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N257, en donde uno o más de los nucleótidos 82 a 95 de la región de horquilla 1 acortada se sustituye con respecto a la SEQ ID NO: 500.

[001336] El elemento N259 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N258, en donde el segundo conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 87 a 90.

[001337] El elemento N260 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N259, en donde el segundo conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 81 a 95.

[001338] El elemento N261 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211-N260, en donde la región de horquilla 1 acortada tiene 2 a 15 nucleótidos modificados.

[001339] El elemento N262 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211-N261, en donde la región de horquilla 2 acortada carece de 2 a 18, opcionalmente de 2 a 16, nucleótidos.

[001340] El elemento N263 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N262, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos.

[001341] El elemento N264 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N263, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 nucleótidos.

[001342] El elemento N265 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N264, en donde se eliminan una o más posiciones 113 o 121 y uno o más de los nucleótidos 126 o 134 de la región de horquilla 2 acortada.

[001343] El elemento N266 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211-N265, en donde la región horquilla 2 acortada comprende una región no emparejada.

[001344] El elemento N267 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211-N266, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene dos porciones dúplex.

[001345] El elemento N268 es el ARNg del elemento N267, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una porción dúplex de 4 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.

[001346] El elemento N269 es el ARNg de los elementos N267 a 268, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una porción dúplex de 4 a 8 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.

[001347] El elemento N270 es el ARNg de los elementos N267 a 269, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una porción dúplex de 4 a 6 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.

[001348] El elemento N271 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211-N270, en donde el tallo superior de la región horquilla 2 acortada comprende uno, dos, tres o cuatro pares de bases.

[001349] El elemento N272 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N271, en donde se elimina al menos un par de nucleótidos 113 y 134, nucleótidos 114 y 133, nucleótidos 115 y 132, nucleótidos 116 y 131, nucleótidos 117 y 130, nucleótidos 118 y 129, los nucleótidos 119 y 128, los nucleótidos 120 y 127 y los nucleótidos 121 y 126.

[001350] El elemento N273 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N272, en donde se eliminan todas las posiciones 113 a 121 y 126 a 134 de la región de horquilla 2 acortada.

[001351] El elemento N274 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N273, en donde uno o más de los nucleótidos 113 a 134 de la región de horquilla 2 acortada se sustituye con respecto a la SEQ ID NO: 1.

[001352] El elemento N275 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N274, en donde el tercer conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 122 a 125.

[001353] El elemento N276 es el ARNg de cualquiera de los elementos N211 a N275, en donde el tercer conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 112 a 135.

[001354] El elemento 211 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 210 y N1 a N276, en donde el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 Angstrom a 37 Angstrom.

[001355] El elemento 212 es el ARNg de cualquiera de uno de los elementos 1 a 211, en donde el conector interno comprende al menos dos subunidades de etilenglicol unidas covalentemente entre sí.

[001356] El elemento 213 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 212, en donde el conector interno comprende 1 a 10 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

[001357] El elemento 214 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 213, en donde el conector interno comprende de 3 a 10 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

[001358] El elemento 215 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 214, en donde el conector interno comprende de 3 a 6 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

[001359] El elemento 216 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 215, en donde el conector interno comprende 3 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

[001360] El elemento 217 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 216, en donde el conector interno comprende 6 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

[001361] El elemento 218 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 217, en donde el conector interno comprende una estructura de fórmula (I):

~-L0-L1-L2-#

(I)

en donde:

~ indica un enlace a un sustituyente 3' del nucleótido anterior;

# indica un enlace a un sustituyente 5' del siguiente nucleótido;

L0 es nulo o alifático $C_{1-3}$;

L1 es $–[E^1-(R^1)]_m-$, donde

cada $R^1$ es independientemente un grupo alifático $C_{1-5}$, opcionalmente sustituido con 1 o 2 $E^2$,

cada $E^1$ y $E^2$ son aceptores independientes de enlaces de hidrógeno, o se eligen independientemente de hidrocarburos cíclicos e hidrocarburos heterocíclicos, y

cada m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y

L2 es nulo, alifático $C_{1-3}$ o es un aceptor del enlace de hidrógeno.

[001362] El elemento 219 es el ARNg del elemento 218, en donde m es 6, 7, 8, 9, o 10.

[001363] El elemento 220 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218-219, en donde m es 1, 2, 3, 4 o 5.

[001364] El elemento 221 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 220, en donde m es 1, 2, o 3.

[001365] El elemento 222 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 221, en donde L0 es nulo.

[001366] El elemento 223 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 221, en donde L0 es $-CH_2-$ o $-CH_2CH_2-$.

[001367] El elemento 224 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 223, en donde L2 es cero.

[001368] El elemento 225 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 223, en donde L2 es -O-, -S-, $-CH_2-$ o $-CH_2CH_2-$.

[001369] El elemento 226 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 225, en donde la cantidad de átomos en la cadena más corta de átomos en la vía de ~ a # en la estructura de Fórmula (I) es 30 o menos, 27 o menos, 24 o menos, 21 o menos, o tiene 18 o menos, o tiene 15 o menos, o tiene 12 o menos, o tiene 10 o menos.

[001370] El elemento 227 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 226, en donde la cantidad de átomos en la cadena más corta de átomos en la vía de ~ a # en la estructura de la Fórmula (I) es de 6 a 30, opcionalmente, de 9 a 30, opcionalmente, 9 a 21.

[001371] El elemento 228 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 227, en donde el número de átomos en la cadena más corta de átomos en la vía de ~ a # en la estructura de la Fórmula (I) es 9.

[001372] El elemento 229 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 227, en donde la cantidad de átomos en la cadena más corta de átomos en la vía de ~ a # en la estructura de la Fórmula (I) es 18.

[001373] El elemento 230 es el ARNg de cualquiera de los elemento 218 a 229, en donde cada grupo alifático $C_{1-3}$ y cada grupo alifático $C_{1-5}$ están saturados.

[001374] El elemento 231 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 229, en donde al menos un grupo alifático $C_{1-5}$ es un alquileno $C_{1-4}$, o en donde al menos dos grupos alifáticos $C_{1-5}$ son alquileno $C_{1-4}$, o en donde al menos tres grupos alifáticos $C_{1-5}$ son un alquileno $C_{1-4}$.

[001375] El elemento 232 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 231, en donde al menos un $R^1$ se selecciona de -$CH_2$ -, -$CH_2CH_2$ -, -$CH_2CH_2CH_2CH_2$-.

[001376] El elemento 233 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 231, en donde cada $R^1$ se selecciona independientemente de -$CH_2$-, -$CH_2CH_2$-, -$CH_2CH_2CH_2$- o -$CH_2CH_2CH_2CH_2$-.

[001377] El elemento 234 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 233, en donde cada $R^1$ es -$CH_2CH_2$-.

[001378] El elemento 235 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 234, en donde al menos un grupo alifático $C_{1-5}$ es un alquenileno $C_{1-4}$, o en donde al menos dos grupos alifáticos $C_{1-5}$ son alquenileno $C_{1-4}$, o en donde al menos tres grupos alifáticos $C_{1-5}$ son un alquenileno $C_{1-4}$.

[001379] El elemento 236 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 235, en donde al menos un $R^1$ se selecciona de -CHCH-, -CHCHCH$_2$- o -$CH_2$CHCH$_2$-.

[001380] El elemento 237 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 236, en donde cada $E^1$ se selecciona independientemente de -O-, -S-, -NH-, -NR-, -C(O)-O-, -OC(O)O-, -C(O)-NR-, -OC(O)-NR-, -NC(O)-NR-, -P(O)$_2$O-, -OP(O)$_2$O-, -OP(R)(O)O-, -OP(O)(S)O-, -S(O)$_2$-, hidrocarburos cíclicos e hidrocarburos heterocíclicos.

[001381] El elemento 238 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 237, en donde cada $E^1$ se elige independientemente de -O-, -S-, -NH-, -NR-, -C(O)-O-, -OC(O)O-, -P(O)$_2$O-, -OP(O)$_2$O- y -OP(R)(O)O.

[001382] El elemento 239 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 238, en donde cada $E^1$ es -O-.

[001383] El elemento 240 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 238, en donde cada $E^1$ es -S-.

[001384] El elemento 241 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 240, en donde al menos un grupo alifático $C_{1-5}$ en $R^1$ se sustityte opcionalmente con un $E^2$ .

[001385] El elemento 242 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 241, en donde cada $E^2$ se selecciona independientemente de -OH, -OR, -ROR, -SH, -SR, -C(O)-R,

-C(O)-OR, -OC(O)-OR, -C(O)-H, -C(O)-OH, $-OPO_3$, $-PO_3$, $-RPO_3$, $-S(O)_2$-R, $-S(O)_2$-OR, $-RS(O)_2$-R, $-RS(O)_2$-OR, $-SO_3$, hidrocarburos cíclicos e hidrocarburos heterocíclicos.

[001386] El elemento 243 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 242, en donde cada $E^2$ se elige independientemente de -OH, -OR, -SH, -SR, -C(O)-R, -C(O)-OR, -OC(O)-OR, $-OPO_3$, $-PO_3$, $-RPO_3$ y $-SO_3$.

[001387] El elemento 244 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 243, en donde cada $E^2$ es -OH u OR.

[001388] El elemento 245 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 243, en donde cada $E^2$ es -SH o SR.

[001389] El elemento 246 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 245, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol.

[001390] El elemento 247 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 246, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol que tiene de 1 a 10 unidades de etilenglicol.

[001391] El elemento 248 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 247, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol tiene de 3 a 6 unidades de etilenglicol.

[001392] El elemento 249 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 248, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol con 3 unidades de etilenglicol.

[001393] El elemento 250 es el ARNg de cualquiera de los elementos 218 a 248, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol con 6 unidades de etilenglicol.

[001394] El elemento 251 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 250, en donde el ARNg es un ARN guía corto que comprende una porción conservada acortada y el conector interno sustituye al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos.

[001395] El elemento 252 es el ARNg de cualquiera de los elementos precedentes, en donde el ARNg es un ARN guía corto-simple (ARNsg corto) que comprende una porción conservada de un ARNsg que comprende una región de horquilla, en donde la región de horquilla carece de al menos 5 a 10 nucleótidos.

[001396] El elemento 253 es el ARNg de cualquiera de los elementos precedentes, en donde los al menos 5 a 10 nucleótidos que faltan son consecutivos.

[001397] El elemento 254 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, en donde carece de al menos 5 a 10 nucleótidos.

i. están dentro de la horquilla 1;

ii. están dentro de la horquilla 1 y la «N» entre la horquilla 1 y la horquilla 2;

iii. están dentro de la horquilla 1 y los dos nucleótidos inmediatamente 3' de la horquilla 1;

iv. incluyen al menos una parte de la horquilla 1;

v. están dentro de la horquilla 2;

vi. incluyen al menos una parte de la horquilla 2;

vii. están dentro de la horquilla 1 y la horquilla 2;

viii. incluyen al menos una parte de la horquilla 1 e incluyen la N entre la horquilla 1 y la horquilla 2;

ix incluyen al menos una parte de la horquilla 2 e incluyen la N entre la horquilla 1 y la horquilla 2;

x. incluyen al menos una parte de la horquilla 1, incluyen la N entre la horquilla 1 y la horquilla 2, e incluyen al menos una parte de la horquilla 2;

xi. están dentro de la horquilla 1 o la horquilla 2, lo que incluye opcionalmente la N entre la horquilla 1 y la horquilla 2;

xii. son consecutivos;

xiii. son consecutivos e incluyen la «N» entre la horquilla 1 y la horquilla 2;

xiv. son consecutivos y abarcan al menos una parte de la horquilla 1 y una parte de la horquilla 2;

xv. son consecutivos y abarcan al menos una parte de la horquilla 1 y la N entre la horquilla 1 y la horquilla 2; o

xvi. son consecutivos y abarcan al menos una parte de la horquilla 1 y dos nucleótidos inmediatamente 3' de la horquilla 1.

[001398] El elemento 255 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, en donde el ARNg es un ARN de guía único corto (ARNsg-corto) que comprende una porción conservada de un ARNsg que comprende una región de horquilla, en donde la región de horquilla carece de al menos 5 a 10 nucleótidos y en donde el ARNsg-corto comprende una modificación de extremo 5' o una modificación de extremo 3'.

[001399] El elemento 256 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, en donde los al menos 5 a 10 nucleótidos comprenden los nucleótidos 54 a 61 de la SEQ ID

NO: 400, los nucleótidos 53 a 60 de la SEQ ID NO: 400, o los nucleótidos 54 a 58 de la SEQ ID NO: 400, opcionalmente, en donde el ARNsg-corto comprende las modificaciones al menos H1-1 a H1-5 y H2-1 a H2-12.

[001400] El elemento 257 es el ARNg de cualquiera de los elementos precedentes, el que comprende una región de horquilla 1 acortada o una región de horquilla 1 sustituida y opcionalmente acortada, en donde

(i) al menos uno de los siguientes pares de nucleótidos está sustituido en la horquilla 1 sustituida y opcionalmente acortada con nucleótidos de emparejamiento Watson-Crick: H1-1 y H1-12, H1-2 y H1-11, H1 -3 y H1-10, o H1-4 y H1-9, y la región de horquilla 1 opcionalmente carece de

(aa) uno o dos cualesquiera de H1-5 a H1-8,

(bb) uno, dos o tres de los siguientes pares de nucleótidos: H1-1 y H1-12, H1-2 y H1-11, H1-3 y H1-10 o H1-4 y H1-9, o

(cc) 1 a 8 nucleótidos de la región de la horquilla 1, o

(ii) la región de horquilla 1 acortada carece de 6 a 8 nucleótidos, preferiblemente 6 nucleótidos; y

(A) una o más de las posiciones H1-1, H1-2 o H1-3 se eliminan o se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 400 o

(B) una o más de las posiciones H1-6 a H1-10 están sustituidas con respecto a la SEQ ID NO: 400; o

(iii) la región de horquilla 1 acortada carece de 5 a 10 nucleótidos, preferiblemente 5 a 6 nucleótidos, y una o más de las posiciones N18, H1-12 o n están sustituidas con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001401] El elemento 258 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, el que comprende una región de tallo superior acortada, en donde la región de tallo superior acortada carece de 1 a 6 nucleótidos y en donde los 6, 7, 8, 9, 10 u 11 nucleótidos de la región de tallo superior acortada incluyen hasta 4 sustituciones con respecto a la SEQ ID NO: 400.

[001402] El elemento 259 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, el que comprende una sustitución con respecto a la SEQ ID NO: 400 en una o más de LS6, LS7, US3, US10, B3, N7, N15, N17, H2-2 y H2-14, en donde el nucleótido sustituyente no es una pirimidina seguida de una adenina, ni una adenina precedida por una pirimidina.

[001403] El elemento 260 es el ARNg de cualquiera de los elemento precedentes, el que comprende una región de tallo superior, en donde la modificación de tallo superior comprende una modificación a cualquiera de uno o más de US1-US12 en la región de tallo superior.

[001404] El elemento 261 es el ARNg de cualquiera de los elementos precedentes, el que comprende una región de tallo superior acortada, en donde la región de tallo superior acortada carece de 1 a 6 nucleótidos.

[001405] El elemento 262 es el ARNg de cualquiera de los elemento precedentes, en donde el ARNg comprende una modificación.

[001406] El elemento 263 es el ARN guía del elemento 262, en donde la modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-O-Me), un nucleótido modificado con 2'-F, un nucleótido modificado con 2'-H (ADN), un nucleótido modificado con 2'-O,4'-C-etileno (ENA), un nucleótido bloqueado (LNA) o un nucleótido desbloqueado (UNA).

[001407] El elemento 264 es el ARN guía del elemento 262 o 263, en donde la modificación comprende un enlace de fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

[001408] El elemento 265 es el ARN guía de cualquiera de los elementos 262 a 264, en donde el ARN guía es un ARNsg y la modificación comprende una modificación en uno o más de los cinco nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

[001409] El elemento 266 es el ARN guía de cualquiera de los elementos 262 a 265, en donde el ARN guía es un ARNsg y la modificación comprende una modificación en uno o más de los cinco nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

[001410] El elemento 267 es el ARN guía de cualquiera de los elementos 262 a 266, en donde el ARN guía es un ARNsg y la modificación comprende un enlace PS entre cada uno de los cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

[001411] El elemento 268 es el ARN guía de cualquiera de los elementos 262 a 267, en donde el ARN guía es un ARNsg y la modificación comprende un enlace PS entre cada uno de los cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

[001412] El elemento 269 es el ARN guía de cualquiera de los elementos 262 a 268, en donde el ARN guía es un ARNsg y la modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-Me en cada uno de los tres primeros nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

[001413] El elemento 270 es el ARN guía de cualquiera de los elementos 262 a 269, en donde el ARN guía es un ARNsg y la modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-Me en cada uno de los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

[001414] El elemento 271 es el ARNg de cualquiera de los elementos precedentes, en donde el ARNg comprende una cola 3’.

[001415] El elemento 272 es el ARNg del elemento 271, en donde la cola 3’ comprende al menos 1 a 10 nucleótidos.

[001416] El elemento 273 es el ARNg de cualquiera de los elementos 271-272, en donde la cola 3’ termina con un nucleótido con una base de uracilo.

[001417] El elemento 274 es el ARNg de cualquiera de los elementos 271 a 273, en donde la cola 3’ tiene 1 nucleótido de longitud y es un nucleótido con una base de uracilo.

[001418] El elemento 275 es el ARNg de cualquiera de los elementos precedentes, en donde el nucleótido 3’ del ARNg es un nucleótido con una base de uracilo.

[001419] El elemento 276 es el ARNg de cualquiera de los elementos 271 a 274, en donde la cola 3' comprende una modificación de cualesquiera uno o más de los nucleótidos presentes en la cola 3'.

[001420] El elemento 277 es el ARNg del elemento 276, en donde la cola 3’ está totalmente modificada.

[001421] El elemento 278 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 270, en donde el ARNg no comprende una cola 3'.

[001422] El elemento 279 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, en donde el ARNg comprende una modificación de extremo 3'.

[001423] El elemento 280 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, en donde el ARNg comprende una modificación de extremo 5' y una modificación de extremo 3'.

[001424] El elemento 281 es el ARNg de cualquiera de los elementos 279 a 280, en donde la modificación de extremo 3' o 5' comprende una modificación de extremo protectora, opcionalmente, un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con a 2'-O-metilo (2'-OMe), un nucleótido modificado con a 2’-O-(2-metoxietilo) (2’-O-moe), un nucleótido modificado con 2’-fluoro (2’-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado abásico invertido o una combinación de estos.

[001425] El elemento 282 es el ARNg de cualquiera de los artículos 279 a 281, en donde la modificación del extremo 3’ o 5’ comprende o comprende adicionalmente un nucleótido modificado con 2’-O-metilo (2’-Ome).

[001426] El elemento 283 es el ARNg de cualquiera de los elementos 279 a 282, en donde la modificación de extremo 3' o 5' comprende o también comprende un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F).

[001427] El elemento 284 es el ARNg de cualquiera de los elementos 279 a 283, en donde la modificación del extremo 3’ o 5’ comprende o adicionalmente comprende un enlace de fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

[001428] El elemento 285 es el ARNg de cualquiera de los elementos 279 a 284, en donde la modificación del extremo 3’ o 5’ comprende o adicionalmente comprende un nucleótido modificado abásico invertido.

[001429] El elemento 286 es el ARNg de cualquiera de los elementos precedentes, que comprende una modificación en la región de horquilla.

[001430] El elemento 287 es el ARNg de cualquiera del elemento 286, en donde la modificación en la región de horquilla comprende un nucleótido modificado seleccionado de un nucleótido modificado con 2’-O-metilo (2’-Ome), un nucleótido modificado con 2’-fluoro (2’-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos o combinaciones de estos.

[001431] El elemento 288 es el ARNg del elemento 286 o 287, que comprende además una modificación de extremo 3’.

[001432] El elemento 289 es el ARNg del elemento 286 o 287, que comprende además una modificación de extremo 3’ y una modificación de extremo 5’.

[001433] El elemento 290 es el ARNg del elemento 286 o 287, que también comprende una modificación de extremo 5'.

[001434] El elemento 291 es el ARNg de cualquiera de los elementos 286 a 290, en donde la modificación en la región de horquilla comprende o comprende adicionalmente un nucleótido modificado de 2’-O-metilo (2’-Ome).

[001435] El elemento 292 es el ARNg de cualquiera de los elementos 286 a 291, en donde la modificación en la región de horquilla comprende o también comprende un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F).

[001436] El elemento 293 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, el que comprende una modificación en la región de tallo superior.

[001437] El elemento 294 es el ARNg del elemento 293, en donde la modificación del tallo superior comprende cualquiera uno o más de:

i. una modificación de uno o más de US1-US12 en la región de tallo superior, y

ii. una modificación de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o los 12 nucleótidos en la región superior del tallo.

El elemento 295 es el ARNg del elemento 293, en donde la modificación de tallo superior comprende uno o más de:

i. un nucleótido modificado con 2'-OMe;
ii. un nucleótido modificado con 2'-O-moe;
iii. un nucleótido modificado con 2'-F;
iv. un nucleótido modificado con 2'-H (ADN);
v. nucleótidos modificados con 2′-O,4′-C-etileno (ENA);
vi. un nucleótido bloqueado (LNA);
vii. nucleótido desbloqueado (UNA); y
viii. combinaciones de uno o más de (i.) – (iii.).

[001438] El elemento 296 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, en donde la modificación comprende una modificación YA.

[001439] El elemento 297 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, que comprende una modificación de YA de uno o más sitios de YA de la región guía.

[001440] El elemento 298 es el ARNg de cualquiera de los elementos 296 a 297, en donde la modificación de YA comprende una sustitución de la pirimidina de un sitio de YA con una no pirimidina.

[001441] El elemento 299 es el ARNg de cualquiera de los elementos 296 a 297, en donde la modificación YA comprende una sustitución de la adenina de un sitio YA con una no adenina.

[001442] El elemento 300 es el ARNg de cualquiera de los elementos 296 a 298, que comprende una modificación de YA, en donde la modificación comprende una modificación con 2'-fluoro, 2'-H, 2'-OMe, ENA, UNA, inosina o PS.

[001443] El elemento 301 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, que comprende una modificación YA de uno o más sitios YA de región conservada.

[001444] El elemento 302 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, en donde la modificación YA comprende

[001445] (i) una modificación con 2'-OMe, opcionalmente de la pirimidina del sitio YA;

[001446] (ii) una modificación con 2'-fluoro, opcionalmente de la pirimidina del sitio YA; o

[001447] (iii) una modificación PS, opcionalmente de la pirimidina del sitio YA.

[001448] El elemento 303 es el ARNg de cualquiera de los elementos 61 a 302, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 o 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 8, 20 a 75, 101 a 108 y 120 a 175.

[001449] El elemento 304 es el ARNg de cualquiera de los elementos 61 a 303, el que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 o 70 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 8, 20 a 75, 101 a 108 y 120 a 175, en donde la modificación en cada nucleótido del ARNg que corresponde a un nucleótido del identificador de la secuencia de referencia en la Tabla 2A es idéntica o equivalente a la modificación que se muestra en el identificador de la secuencia de referencia en la Tabla 2B.

[001450] El elemento 305 es un ARN guía (ARNg) que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 8 y 20 a 75.

[001451] El elemento 306 es el ARNg de cualquiera de los elementos anteriores, incluidas las modificaciones establecidas para un ARN guía en la Tabla 2A o la Tabla 2B.

[001452] El elemento 307 es un ARN guía (ARNg) que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 101 a 108 y 120 a 175, lo que incluye las modificaciones de la Tabla 2A o la Tabla 2B.

[001453] El elemento 308 es el ARNg de cualquiera de los elemento precedentes, en donde el ARNg está asociado con una nanopartícula lipídica (LNP).

[001454] El elemento 309 es una composición que comprende el ARNg de cualquiera de los elementos precedentes.

[001455] El elemento 310 es una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 308.

[001456] El elemento 311 es una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de los elementos 63 a 116 y 211 a 308 y un ARNm que codifica SpyCas9.

[001457] El elemento 312 es una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de los elementos 117 a 159 y 211 a 308 y un ARNm que codifica SauCas9.

[001458] El elemento 313 es una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de los elementos 160 a 189 y 211 a 308 y un ARNm que codifica St1Cas9.

[001459] El elemento 314 es una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de los elementos 190 a 202 y 211 a 308 y un ARNm que codifica CjeCas9 o FnoCas9.

[001460] El elemento 315 es una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de los elementos 203 a 308 y un ARNm que codifica AsCpf1, LbCpf1 o EsCas13d.

[001461] El elemento 316 es la composición de LNP de cualquiera de los elementos 310 a 315, en donde la LNP comprende octadeca-9,12-dienoato de (9z,12z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo u 8-((7,7-bis(octiloxi)heptil)(2-hidroxietil)anubi)octanoato de nonilo.

[001462] El elemento 317 es la composición de cualquiera de los elementos 310 a 316, en donde la LNP comprende una relación molar de una amina lipídica catiónica a fosfato de ARN (N:P) de alrededor de 4,5 a 6,5, opcionalmente, N:P de alrededor de 6,0.

[001463] El elemento 318 es la composición del elemento 309 a 317, en donde la nucleasa comprende una proteína o un ácido nucleico que codifica la nucleasa.

[001464] El elemento 319 es la composición del elemento 318, en donde la nucleasa es una nucleasa Cas.

[001465] El elemento 320 es la composición del elemento 319, en donde la nucleasa de Cas es una Cas9.

[001466] El elemento 321 es la composición del elemento 320, en donde la Cas9 es Cas9 de *S. pyogenes* (SpyCas9).

[001467] El elemento 322 es la composición del elemento 320, en donde la Cas9 es Cas9 de *S. aureus* (SauCas9).

[001468] El elemento 323 es la composición del elemento 320, en donde la Cas9 es Cas9 de *C. diphtheriae* (CdiCas9).

[001469] El elemento 324 es la composición del elemento 320, en donde el Cas9 es Cas9 de *Streptococcus thermophilus* (St1Cas9).

[001470] El elemento 325 es la composición del elemento 320, en donde el Cas9 es Cas9 de *A.cellulolyticus* (AceCas9).

[001471] El elemento 326 es la composición del elemento 320, en donde la Cas9 es Cas9 de *C. jejuni* (CjeCas9).

[001472] El elemento 327 es la composición del elemento 320, en donde la Cas9 es Cas9 de *R. palustris* (RpaCas9).

[001473] El elemento 328 es la composición del elemento 320, en donde la Cas9 es Cas9 de *R. rubrum* (RruCas9).

[001474] El elemento 329 es la composición del elemento 320, en donde la Cas9 es Cas9 de *A. naeslundii* (AnaCas9).

[001475] El elemento 330 es la composición del elemento 320, en donde la Cas9 es Cas9 de *Francisella novicida* (FnoCas9).

[001476] El elemento 330.1 es la composición del elemento 320, donde la proteína Cas es una Cas9 de *Neisseria meningitidis* (NmeCas9).

[001477] El elemento 331 es la composición del elemento 319, en donde la nucleasa Cas es una Cpf1.

[001478] El elemento 332 es la composición del elemento 331, en donde la Cpf1 es Cpf1 de *Lachnospiraceae bacterium* (LbCpf1) o la Cpf1 es *Acidaminococcus sp.* Cpf1 (AsCpf1).

[001479] El elemento 333 es la composición del elemento 319, en donde la proteína Cas es una Cas13d de *Eubacterium siraeum* (EsCas13d).

[001480] El elemento 334 es la composición de cualquiera de los elementos 311 a 329, en donde la nucleasa es una cleavasa, una nickasa o una nucleasa catalíticamente inactiva, o es una proteína de fusión que comprende una desaminasa.

[001481] El elemento 335 es la composición de cualquiera de los elementos 311 a 334, en donde la nucleasa es modificada.

[001482] El elemento 336 es la composición del elemento inmediatamente anterior, en donde la nucleasa modificada comprende una señal de localización nuclear (NLS).

[001483] El elemento 337 es la composición del elemento 311 a 336, en donde el ácido nucleico que codifica la nucleasa se selecciona de:

a. una secuencia de codificación de ADN;
b. un ARNm con un marco abierto de lectura (ORF);
c. una secuencia de codificación en un vector de expresión;
c. una secuencia de codificación en un vector viral.

[001484] El elemento 338 es la composición del elemento inmediatamente anterior, en donde el ARNm comprende la secuencia de uno cualquiera de las SEQ ID NO: 321 a 323.

[001485] El elemento 339 es una formulación farmacéutica que comprende el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 308, o la composición de cualquiera de los artículos 309 a 338 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[001486] El elemento 340 es un método de modificación de un ADN diana que comprende entregar a una célula uno o más de los siguientes:

i. el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 308;

ii. la composición de cualquiera de los elementos 309 a 338; y

iii. la formulación farmacéutica del elemento 339.

[001487] El elemento 341 es el método del elemento 340, en donde el ARNg comprende hasta 110, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45 o 40 nucleótidos.

[001488] El elemento 342 es el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 308, la composición de los elementos 309 a 338, o la formulación farmacéutica del elemento 340 para su uso en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno.

[001489] El elemento 343 es el uso del ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 308, las composiciones de los elementos 309 a 338 o la formulación farmacéutica del elemento 340 en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno.

[001490] El elemento 344 es un ARNg sintetizado químicamente que comprende un conector interno.

[001491] El elemento 345 es una composición que comprende el ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 308, en donde la composición no comprende una porción no ligada del ARNg.

[001492] El elemento 346 es un soporte sólido unido covalentemente al conector del ARNg de cualquiera de los elementos 1 a 308.

[001493] El elemento 347 es un método para sintetizar un ARNg que comprende un conector interno, en donde es un proceso sintético único.

[001494] El elemento 348 es un método para sintetizar un ARNg, en donde se incorpora un conector interno en línea durante la síntesis.

[001495] El elemento 349 es un método para sintetizar un ARNg con una serie de reacciones de acoplamiento secuenciales, en donde las reacciones comprenden:

a) reacción de acoplamiento para el enlace covalente de un primer nucleótido a un segundo nucleótido;

b) una reacción de acoplamiento para el enlace covalente de un conector interno al segundo nucleótido; y

c) una reacción de acoplamiento para el enlace covalente de un tercer nucleótido al conector interno,

en donde la reacción de acoplamiento para los enlaces covalentes es la misma.

[001496] El elemento 350 es el método del elemento 349, en donde el enlace covalente se realiza mediante química de fosforamidita.

[001497] El elemento 351 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de los elementos anteriores, en donde el ARNg se sintetiza químicamente.

[001498] El elemento 352 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de los elementos anteriores, en donde el conector interno se incorpora en el ARNg mediante una reacción de acoplamiento durante la síntesis química del ARNg.

[001499] El elemento 353 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de los elementos anteriores, preparado mediante un proceso que comprende la adición del conector interno mediante la reacción de un conector que comprende un resto fosforamidita con un residuo nucleósido.

[001500] El elemento 354 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso del elemento inmediatamente anterior, en donde el proceso también comprende un nucleótido que comprende un resto fosforamidita con el conector.

[001501] El elemento 355 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de los elementos anteriores, en donde el conector interno se une de forma covalente al nucleótido adyacente mediante un enlace fosfodiéster o fosforotioato.

[001502] El elemento 356 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de los elementos anteriores, en donde no se encuentra presente urea en el conector interno.

[001503] El elemento 357 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de los elementos anteriores, en donde el conector interno no está en la región de la de repetición y antirrepetición del ARNg.

[001504] El elemento 358 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de los elementos anteriores, en donde el ARNg comprende un conector interno que no está en una repetición-antirrepetición de la guía.

[001505] El elemento 359 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de los elementos anteriores, en donde el ARNg es un ARNsg.

[001506] El elemento 360 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o el uso de cualquiera de los elementos anteriores, en donde el conector interno une una región dúplex y sustituye 2 a 12 nucleótidos.

[001507] El elemento 361 es el ARNg, la composición, la formulación, el método o cualquier uso de los elementos anteriores, en donde el ARNg se produce en una síntesis única.