

REIVINDICACIONES

Se reivindica lo siguiente:

1. Un ARN guía (ARNg) que comprende un conector interno.
2. El ARNg de la reivindicación 1, 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.
3. El ARNg de la reivindicación 1 o 2, 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.
4. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el conector interno sustituye 2 a 12 nucleótidos.
5. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el conector interno está en una región de repetición y antirrepetición del ARNg.
6. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el conector interno sustituye al menos 4 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.
7. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el conector interno sustituye hasta 28 nucleótidos de la región de repetición y antirrepetición del ARNg.
8. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el conector interno está en una región de horquilla del ARNg.
9. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el conector interno está en una región nexo del ARNg.
10. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, 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.
11. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 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.

12. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el conector interno sustituye una horquilla de ARNg.

13. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el ARNg es un ARN guía único (ARNsg).

14. 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.

15. El ARNg de la reivindicación 14, en donde el primer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30 átomos, opcionalmente, de aproximadamente 15 a 21 átomos.

16. El ARNg de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en donde el primer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la región de tallo superior.

17. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde el primer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la región de tallo superior.

18. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la región de tallo superior.

19. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en donde el primer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo de la región de tallo superior.

20. El ARNg de cualquiera de las modalidades 14 a 19, en donde el segundo conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 6 a 18 átomos, opcionalmente, aproximadamente de 6 a 12 átomos.
21. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, en donde el tercer conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 9 a 30, opcionalmente, de aproximadamente 12 a 21 átomos.
22. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, en donde el tercer conector interno sustituye un bucle, o parte de este, de la horquilla 1.
23. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, en donde el tercer conector interno sustituye el bucle y el tallo, o parte de estos, de la horquilla 1.
24. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, en donde el tercer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle de la horquilla 1.
25. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, en donde el tercer conector interno sustituye todos los nucleótidos que constituyen el bucle y el tallo de la horquilla 1.
26. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25, en donde la región de horquilla 2 del ARNsg no contiene ningún conector interno.
27. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26, en donde el ARNsg es un ARNsg de Cas9 *S. pyogenes*.
28. El ARNg de cualquiera de las modalidades 14 a 27, en donde el ARNsg comprende una porción conservada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 400.
29. El ARNg de la reivindicación 28, en donde
 - 1) 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;
 - 2) 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;
 - 3) 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;

- 4) 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; o
 - 5) 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.
30. El ARNg de la reivindicación 28 o 29,
- 1) en donde los nucleótidos 36 a 37 (N6-N7 de la región nexa) sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 400;
 - 2) 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;
 - 3) 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;
 - 4) 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; o
 - 5) 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.
31. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, en donde se eliminan los nucleótidos 77 a 80 con respecto a la SEQ ID NO: 400.
32. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 27, en donde el ARNs comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 201.
33. El ARNg de la reivindicación 32, en donde
- 1) 2, 3 o 4 de los nucleótidos 33 a 36 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.
 - 2) los nucleótidos 32 a 37 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201;
 - 3) los nucleótidos 31 a 38 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201;
 - 4) los nucleótidos 30 a 39 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201; o
 - 5) los nucleótidos 29 a 40 sustituyen el primer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.
34. El ARNg de la reivindicación 32 o 33, en donde

- 1) los nucleótidos 55 a 56 sustituyen el segundo conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.
 - 2) 2, 3 o 4 de los nucleótidos 50 a 53 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.
 - 3) los nucleótidos 49 a 54 sustituyen el tercer conector interno con respecto a la SEQ ID NO: 201.
35. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, en donde se eliminan los nucleótidos 77 a 80 con respecto a la SEQ ID NO: 201.
36. El ARNg de la reivindicación 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.

37. 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.

38. El ARNg de la reivindicación 36 o la reivindicación 37, en donde al menos 10 nucleótidos son nucleótidos modificados.

39. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, 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.

40. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39, 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.

41. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 40, en donde se eliminan uno o más de los nucleótidos 144 y 145 con respecto a la SEQ ID NO: 500.

42. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 41, en donde se eliminan ambos nucleótidos 144 y 145 con respecto a la SEQ ID NO: 500.

43. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 42, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada carece de 2 a 28 nucleótidos.

44. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 43, en donde la región de repetición y antirrepetición carece de 12 a 28, opcionalmente, 18 a 24, nucleótidos.

45. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 44, 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.

46. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 45, 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.

47. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 46, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una porción dúplex de 11 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.

48. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 47, en donde la región de repetición y antirrepetición acortada tiene una porción dúplex simple.

49. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 48, 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.
50. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 49, en donde el primer conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 49 a 52.
51. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 50, 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.
52. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 51, en donde la región de horquilla 1 acortada tiene una porción dúplex simple.
53. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 52, en donde se eliminan uno o dos pares de bases de la región de horquilla 1 acortada.
54. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 53, en donde el tallo de la región de horquilla 1 acortada tiene una longitud de siete u ocho nucleótidos con emparejamiento de bases.
55. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 54, en donde se eliminan una o más posiciones 85 u 86 y uno o más de los nucleótidos 91 o 92 de la región de horquilla 1 acortada.
56. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 55, 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.
57. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 56, en donde el segundo conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 87 a 90.
58. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 56, en donde el segundo conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 81 a 95.
59. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 58, en donde la región de horquilla 1 acortada tiene de 2 a 15 nucleótidos modificados.
60. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 59, en donde la región de horquilla 2 acortada carece de 2 a 18, opcionalmente de 2 a 16 nucleótidos.

61. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 60, 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.
62. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 61, en donde la región de horquilla 2 acortada comprende una región no emparejada.
63. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 62, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene dos porciones dúplex.
64. El ARNg de cualquiera de la reivindicación 63, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una porción dúplex de 4 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.
65. El ARNg de la reivindicación 63 o 64, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una porción dúplex de 4 a 8 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.
66. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 63 a 65, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene una porción a dúplex de 4 a 6 nucleótidos con emparejamiento de bases de longitud.
67. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 66, en donde el vástago superior de la región de horquilla acortada 2 comprende uno, dos, tres, o cuatro pares de bases.
68. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 67, en donde se eliminan todas las posiciones 113-121 y 126-134 de la región de horquilla 2 acortada.
69. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 68, 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.
70. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 69, en donde el tercer conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 122 a 125.
71. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 70, en donde el tercer conector interno sustituye al menos parte o todos los nucleótidos 112 a 135.
72. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 71, en donde la región de horquilla 2 acortada tiene de 2 a 15 nucleótidos modificados.

73. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 72, en donde la región guía del ARNg comprende al menos dos nucleótidos modificados, opcionalmente, al menos cuatro nucleótidos modificados.

74. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 73,

- 1) que comprende una modificación de extremo 3' y comprende una modificación en la región de tallo superior de la región de repetición y antirrepetición;
- 2) que comprenda una modificación del extremo 3' y una modificación en la región de la horquilla 1, o
- 3) que comprende una modificación del extremo 3' y una modificación en la región de horquilla 2.

75. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 74,

- 1) que comprende una modificación de extremo 5' y comprende una modificación en la región de tallo superior de la región de repetición y antirrepetición;
- 2) que comprende una modificación del extremo 5' y una modificación en la región de horquilla 1;
- 3) que comprende una modificación del extremo 5' y una modificación en la región de horquilla 2;
- 4) 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';
- 5) que comprende una modificación del extremo 5', una modificación en la región de horquilla 1 y una modificación del extremo 3';
- 6) que comprenda 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', o
- 7) 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'.

76. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 74 a 75, 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.

77. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 76, 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.

78. Un ARN guía único (ARNsg) que comprende cualesquiera de las SEQ ID NO: 1001 a 1012 o cualesquiera de las secuencias que se muestran en la Tabla 4A.

79. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 78, 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: 1001 a 1012 o cualesquiera de las secuencias que se muestran en la Tabla 4A.

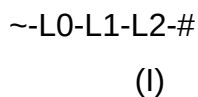
80. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 79, el que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 o 70 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1001 a 1002 y 710 a 759 tal como se muestran 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 en la Tabla 4A es idéntica o equivalente a la modificación que se muestra en el identificador de la secuencia de referencia en la Tabla 4B.

81. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 80, 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: 1001 a 1002 y 710 a 759 tal como se muestran en las Tablas 4A-4B, donde X es el primer nucleótido de la región conservada.

82. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42 y 44 a 81, que comprende además una cola 3' que comprende un nucleótido modificado con 2'-O-Me.
83. El ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 82, en donde el ARNg dirige una nucleasa a una secuencia objetivo para su unión.
84. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 83, en donde el ARNg dirige una nucleasa a una secuencia objetivo para inducir un corte bicatenario en la secuencia diana.
85. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 84, en donde el ARNg dirige una nucleasa a una secuencia objetivo para inducir un corte monocatenario en la secuencia diana.
86. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 82 a 84, en donde la nucleasa es una NmeCas9.
87. La composición de la reivindicación 86, en donde el Nme Cas9 es un Nme1 Cas9, un Nme2 Cas9, o un Nme3 Cas9.
88. El ARNg de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el ARNg comprende una sustitución conservadora, por ejemplo, para preservar el emparejamiento de bases.
89. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 88, en donde el enlazador interno tiene una longitud de puente de alrededor de 6 Angstrom a 37 Angstrom.
90. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 89, en donde el conector interno comprende 1 a 10 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.
91. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 90, en donde el conector interno comprende al menos dos subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.
92. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 91, en donde el conector interno comprende 3 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

93. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 92, en donde el conector interno comprende 6 subunidades de etilenglicol enlazadas de forma covalente entre sí.

94. El ARNg de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 93, en donde el conector interno comprende una estructura de fórmula (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 $-\text{[E}^1\text{-(R}^1\text{)]}_m-$, 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 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 C₁₋₃ o es un aceptor de enlace de hidrógeno.

95. El ARNg de la reivindicación 94, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol.

96. El ARNg de la reivindicación 94 o la reivindicación 95, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol que tiene de 1 a 10 unidades de etilenglicol.

97. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 94 a 96, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol que tiene de 3 a 6 unidades de etilenglicol.

98. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 94 a 97, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol con 3 unidades de etilenglicol.

99. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 94 a 97, en donde el conector interno comprende un conector de polietilenglicol con 6 unidades de etilenglicol.

100. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 99, 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.

101. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o 78 a 100, en donde el ARNg es un ARN 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.

102. El ARNg de la reivindicación 101, en donde los al menos 5 a 10 nucleótidos ausentes son consecutivos.

103. El ARNg de la reivindicación 101 o 102, en donde los al menos 5 a 10 nucleótidos ausentes

- 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 e incluyen 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.

104. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o 78 a 103, 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'.

105. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o 78 a 104, 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.

106. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o 78 a 105, 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

(aa) se suprime o se sustituye una o varias de las posiciones H1-1, H1-2 o H1-3 en relación con la 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.

107. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o 78 a 106, 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 y 11 nucleótidos de la región de tallo superior acortada incluyen hasta 4 sustituciones con respecto a la SEQ ID NO: 400.

108. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 35 o 78 a 107 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.

109. El ARNg de la reivindicación 106, en donde la horquilla 1 sustituida y acortada carece de 1 a 4 nucleótidos y se sustituyen los nucleótidos H1-4 a H1-9 con un conector interno.

110. El ARNg de la reivindicación 106, en donde la horquilla 1 sustituida y acortada carece de uno o dos de los pares de nucleótidos siguientes: H1-1 y H1-12, H1-2 y H1-11, o H1-3 y H1-10; y los nucleótidos H1-4 a H1-9 se sustituyen con un conector interno.

111. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o 78 a 110, 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.

112. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o 78 a 111, que comprende una región de tallo superior acortada, en donde la región de tallo superior acortada carece de 1 a 6 nucleótidos.

113. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 o 78 a 111, el que comprende una región de tallo superior acortada, en donde la región de tallo superior acortada carece de 7 a 10 nucleótidos y 2 nucleótidos son sustituidos por un conector interno. El ARNg de la reivindicación 381, en donde el tronco superior no comprende una porción dúplex troncal superior.

114. El ARNg de la reivindicación 112 o 113, en donde el conector interno tiene una longitud de puente de aproximadamente 3-30 átomos, opcionalmente 12-21 átomos, 6-18 átomos, o 6-12 átomos.

115. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 114, en la que la composición comprende un amortiguador.

116. El ARN guía de la reivindicación 115, 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).

117. El ARN guía de la reivindicación 115 o 116, en donde la modificación comprende un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

118. El ARN guía de la reivindicación 117, en donde

- (i) 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;
- (ii) 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;
- (iii) 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;

- (iv) 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;
- (v) 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; o
- (vi) 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.

- 119. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 118, en donde el nucleótido 3' del ARNg es un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado.
- 120. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 119, en donde el ARNg comprende una cola 3'.
- 121. El ARNg de la reivindicación 120, en donde la cola 3' comprende al menos 1 a 10 nucleótidos, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos.
- 122. El ARNg de la reivindicación 120 o 121, en donde la cola 3' termina con un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado.
- 123. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 120 a 122, en donde la cola 3' es de 1 nucleótido de longitud.
- 124. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 120 a 123, en donde la cola 3' consiste en un nucleótido que comprende un uracilo o un uracilo modificado.
- 125. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 120 a 124, en donde la cola 3' comprende una modificación de cualesquiera uno o más de los nucleótidos presentes en la cola 3'.
- 126. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 120 a 125, 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. .
- 127. El ARNg de la reivindicación 125 o 126, en donde la cola 3' está totalmente modificada.
- 128. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 119, en donde el ARNg no comprende una cola 3'.

129. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 129, en donde el ARNg comprende una modificación de extremo 3' o una modificación de extremo 5'.

130. El ARNg de la reivindicación 129, en donde la modificación de extremo 3' o 5' comprende o comprende además un nucleótido modificado con 2'-O-metil (2'-Ome).

131. El ARNg de la reivindicación 129 o la reivindicación 130, en donde la modificación de extremo 3' o 5' comprende o comprende además un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos.

132. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 131, que comprende una modificación en la región de horquilla.

133. El ARNg de la reivindicación 132, el 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 modificado con 2'-fluoro (2'-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos o una combinación de estos.

134. El ARNg de la reivindicación 132 o 133, en donde la modificación en la región de horquilla comprende o comprende además un nucleótido modificado con 2'-O-metil (2'-Ome).

135. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 132 a 134, en donde la modificación en la región de horquilla comprende o también comprende un nucleótido modificado con 2'-fluoro (2'-F).

136. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 135, el que comprende una modificación en la región de tallo superior.

137. El ARNg de la reivindicación 136, en donde la modificación del tallo superior comprende cualquiera uno o más de:

- i. una modificación de cualesquiera uno o más US1-US12 en la región de 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 de tallo superior.

138. El ARNg de la reivindicación 136 o 137, 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. un nucleótido modificado con 2'-O,4'-C-etileno (ENA);
- vi. un nucleótido bloqueado (LNA);
- vii. un nucleótido desbloqueado (UNA); y
- viii. combinaciones de uno o más de (i.) – (iii.).

139. Un ARN guía único (ARNsg) que comprende cualesquiera de las SEQ ID NO: 211 a 230 o cualesquiera de las secuencias que se muestran en las Tablas 2A a 2C.

140. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 139, 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: 211 a 230 o cualesquiera de las secuencias que se muestran en las Tablas 2A a 2C.

141. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 140, 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: 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.

142. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 141, 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.

143. Una composición que comprende un ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 142 asociada con una nanopartícula lipídica (LNP).

144. Una composición que comprende el ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 142, o la composición de la reivindicación 143, que además comprende una nucleasa o un ARNm que codifica la nucleasa.

145. Una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 142.

146. Una composición de LNP que comprende un ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 35 y 73 a 142 y un ARNm que codifica SpyCas9.

147. La composición de LNP de la reivindicación 145 o la reivindicación 146, 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)amino)octanoato de nonilo.

148. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 145 a 147, 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.

149. La composición de la reivindicación 144 a 148, en donde la nucleasa comprende una proteína o un ácido nucleico que codifica la nucleasa.

150. La composición de la reivindicación 149, en donde la nucleasa es una nucleasa Cas.

151. La composición de la reivindicación 150, en donde la nucleasa de Cas es una Cas9.

152. La composición de la reivindicación 151, en donde la Cas9 es Cas9 de *S. pyogenes* (SpyCas9).

153. La composición de la reivindicación 151, en donde la Cas9 es una NmeCas9, opcionalmente en donde la NmeCas9 es una Nme1Cas9, una Nme2Cas9, o una Nme3Cas9.

154. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 144 a 153, en donde la nucleasa es una cleavasa, una nickasa o una nucleasa catalíticamente inactiva, o es una proteína de fusión que comprende una desaminasa.

155. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 144 a 154, 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.

156. La composición de la reivindicación 155, en donde el ARNm comprende la secuencia comprende la secuencia de cualesquiera de las reivindicaciones SEQ ID NO:321 a 323, 361, 363 a 372 y 374 a 382.

157. Una formulación farmacéutica que comprende el ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 142, o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 143 a 156 y un portador farmacéuticamente aceptable.

158. Un método para modificar un ADN objetivo comprende administrar a una célula cualesquiera uno o más de los siguientes:

- i. el ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 142;
- ii. la composición de cualquiera de las reivindicaciones 143-156; y
- iii. la formulación farmacéutica de la reivindicación 157.

159. El método de la reivindicación 158, en donde el método resulta en una inserción o delección en un gen.

160. El método de la reivindicación 158 o 159 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.

161. El ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 142, la composición de las reivindicaciones 143 a 156, o la formulación farmacéutica de la reivindicación 157 para uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

162. El uso del ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 142, la composición de las reivindicaciones 143 a 156, o la formulación farmacéutica de la reivindicación 157 en la producción de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno.
163. Una composición que comprende el ARNg de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 142, en donde la composición no comprende una posición no enlazada del ARNg.
164. Un soporte sólido unido covalentemente al conector al ARNg de cualquiera de las modalidades 1 a 142.
165. Un método para sintetizar un ARNg que comprende un conector interno, en donde es un proceso sintético único.
166. Un método para sintetizar un ARNg, en donde se incorpora un conector interno en línea durante la síntesis.
167. 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.
168. El método de la reivindicación 167, en donde el enlace covalente se realiza usando química de fosforamidita.