

REIVINDICACIONES

1. Un ARN guía (ARNg) que es un ARN guía simple corto (ARNsg corto) que comprende una región guía y una porción conservada de un ARNsg, en donde la porción conservada comprende una región del tallo superior que es de los nucleótidos 9-20 de la secuencia de SEQ ID NO: 400, y una región horquilla que es de los nucleótidos 49-76 de la secuencia de SEQ ID NO: 400, donde la región horquilla carece de 5-10 nucleótidos, en donde los 5-10 nucleótidos comprenden los nucleótidos 54-61 de SEQ ID NO:400, los nucleótidos 53-60 de SEQ ID NO:400; los nucleótidos 54-58 de SEQ ID NO: 400, o los nucleótidos 53-56 de SEQ ID NO: 400, y donde el ARNsg corto comprende (i) una modificación en el extremo 5', (ii) una modificación en el extremo 3', o (iii) una modificación en el extremo 5' y una modificación en el extremo 3' y además comprende modificaciones 2'-O-metilo (2'-O-Me) en los nucleótidos 10, 11, o 12 en la región del tallo superior, además donde la modificación en el extremo 3' o 5' comprende un nucleótido modificado seleccionado entre 2'-O-metilo (2'-OMe), un nucleótido modificado con 2'-O-(2-metoxietilo) (2'-O-moe), un nucleótido modificado con 2'-flúor(2'-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, un nucleótido modificado abásico invertido, o combinaciones de estos.
2. El ARNg de la Reivindicación 1, donde el ARNsg corto comprende una cola 3' que comprende 1 a 4 nucleótidos de uridina y sigue el extremo 3' de la porción conservada.
3. El ARNg de las Reivindicaciones 1 o 2, que comprende (i) una modificación en la región horquilla; (ii) una modificación en el extremo 3', y una modificación en la región horquilla; (iii) una modificación en el extremo 3', una modificación en la región horquilla, y una modificación en el extremo 5'; (iv) una modificación en el extremo 5', y una modificación en la región horquilla; o combinaciones de dos o más de (i)-(iv).
4. El ARNg de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, donde
 - (i) la modificación en la región horquilla comprende un nucleótido modificado seleccionado entre un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-OMe), un nucleótido modificado con 2'-flúor(2'-F), un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos, o combinaciones de estos;
 - (ii) la modificación en el extremo 3' y/o 5' comprende o además comprende un

nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-OMe);

(iii) la modificación en el extremo 3' y/o 5' comprende o además comprende un nucleótido modificado con 2'-flúor (2'-F);

(iv) la modificación en el extremo 3' y/o 5' comprende o además comprende un enlace fosforotioato (PS) entre nucleótidos;

(v) la modificación en el extremo 3' y/o 5' comprende o además comprende un nucleótido modificado abásico invertido;

(vi) la modificación en la región horquilla comprende o además comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo (2'-OMe);

(vii) la modificación en la región horquilla comprende o además comprende un nucleótido modificado con 2'-flúor (2'-F); o

(viii) combinaciones de una o más de (i)-(vii).

5. El ARNg de la Reivindicación 1, en donde el ARNsg corto comprende modificaciones en al menos los nucleótidos 49-53 y 62-73 de SEQ ID NO: 400.

6. El ARNg de la Reivindicación 1 que comprende cualquiera de
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 306),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 307),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 315),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 316),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 323),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 324),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*m

G*mC (SEQ ID NO: 328),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmGmAmAmAmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU
CAmAmCmUmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC (SEQ ID NO:
329),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAfAfCfUfUfGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 341),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfG*mU*fG*mC (SEQ
ID NO: 342),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 345),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 346),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 347),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 348),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 350),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 351),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 353), que
incluyen las modificaciones m: 2'-O-Me, *: enlace PS, y f: 2'-F, en donde las Ns en la
secuencia colectivamente forman la región guía, y en donde x indica 14, 15, 16 o 17
nucleótidos contiguos; o
mN*mN*mN*NNN*N*fN*fN*fN*fNfNfNfNfNf(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmA
mAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*
mG*mC (SEQ ID NO: 354) incluyendo las modificaciones m: 2'-O-Me, *: enlace PS, y f: 2'-F,

en donde las Ns en la secuencia colectivamente forman la región guía, y en donde x indica 1, 2, o 3 nucleótidos.

7. El ARNg de la Reivindicación 1, que comprende ácidos nucleicos que tienen al menos 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, o 90% de identidad con los ácidos nucleicos de cualquiera de

mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 306),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 307),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 315),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 316),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 323),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 324),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*m
G*mC (SEQ ID NO: 328),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmGmAmAmAmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU
CAmAmCmUmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC (SEQ ID NO:
329),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAfAfCfUfUfGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 341),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfG*mU*fG*mC (SEQ
ID NO: 342),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA

GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 345),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 346),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 347),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 348),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 350),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
(SEQ ID NO: 351),
mN*mN*mN*(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA
GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (SEQ ID NO: 353),
incluyendo la modificación m: 2'-O-Me, *: enlace PS, o f: 2'-F, en donde las Ns en la
secuencia colectivamente forman la región guía y en donde x indica 14, 15, 16 o 17
nucleótidos contiguos; o
mN*mN*mN*NNN*N*fN*fN*fN*fNfNfNfNf(N)xGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmA
mAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*
mG*mC (SEQ ID NO: 354) incluyendo las modificaciones m: 2'-O-Me, *: enlace PS, y f: 2'-F,
en donde las Ns en la secuencia colectivamente forman la región guía, y en donde x indica
1, 2, o 3 nucleótidos.

8. El ARNg de cualquiera de las Reivindicaciones 1-7, donde el ARNg comprende
modificaciones y/o nucleótidos sin modificar en 18, 19, o 20 de los nucleótidos 1-20 del
extremo 5' del terminal 5' que coinciden con el patrón de modificación en los nucleótidos
1-20 de cualquiera de los ARNg de SEQ ID NOs: 1-54, 201-254, 301-354, 401-535, 601,
607-732, 801, 807-932, 1001, 1007-1132, 1205-1212, 1322-1406, 1417-1501, 1511-1596,
3018-3059, 3063-3104, 3108-3149, 3153-3194, 3198-3239, 3243-3284, 3295-3341, 3343-
3385 o 3388-3430.

9. El ARNg de cualquiera de las Reivindicaciones 1-8, donde el ARNg comprende un

patrón de modificación que coincide con al menos 90% del patrón de modificación de cualquiera de los ARNg de SEQ ID NOs: 6, 7, 15, 16, 23, 24, 28, 29, 31, 41, 42, 45-48, 50, 51, 53, 54, 206, 207, 215, 216, 223, 224, 228, 229, 231, 241, 242, 245-248, 250, 251, 253, 254, 306, 307, 315, 316, 323, 324, 328, 329, 331, 341, 342, 345-348, 350, 351, 353, 354, 3153-3194, 3198-3239, 3243-3284, 3295-3341, 3343-3385 o 3388-3430.

10. El ARNg de cualquiera de las Reivindicaciones 1-9, en donde el ARNg comprende una secuencia que es al menos 90 a 99% idéntica a la SEQ ID NO: 206 o 306.

11. El ARNg de cualquiera de las Reivindicaciones 1-10, en donde el ARNg comprende la SEQ ID NO: 206 o 306.

12. Una composición LNP que comprende un ARNg de cualquiera de las Reivindicaciones 1-11.

13. Una composición que comprende un ARNg de cualquiera de las Reivindicaciones 1-11 asociado con una nanopartícula lipídica (LNP).

14. Una composición que comprende el ARNg de cualquiera de las Reivindicaciones 1-11, o la composición de las Reivindicaciones 12 o 13, que además comprende una nucleasa o un ARNm que codifica la nucleasa.

15. La composición de la Reivindicación 14, donde la nucleasa es una proteína Cas.

16. La composición de la Reivindicación 15, donde la proteína Cas es una Cas9.

17. La composición de la Reivindicación 16, donde la Cas9 es una Cas9 *S. pyogenes* o una Cas9 *S. aureus*.

18. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 14-17, donde la nucleasa es una nickasa o una dCas.

19. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 14-18, donde el ARNm comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 3499-3527 o 3529-3546.

20. Una formulación farmacéutica que comprende el ARNg de cualquiera de las Reivindicaciones 1-11 o la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 12-19 y un portador farmacéuticamente aceptable.

21. Un método *in vitro* para modificar un ADN diana que comprende, suministrar una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica una proteína Cas, y cualquiera o cualesquiera de los siguientes a una célula:

- i. el ARNg de cualquiera de las Reivindicaciones 1-11;
- ii. la composición de cualquiera de las Reivindicaciones 12-19; y
- iii. la formulación farmacéutica de la Reivindicación 20.

22. El método de la Reivindicación 21, donde el método resulta en una inserción o delección en un gen.

23. El método de la Reivindicación 21 o 22, que además comprende suministrar a la célula un molde, donde al menos una parte del molde se incorpora en un ADN diana en o cerca de un sitio de rotura bicatenario inducido por la proteína Cas.