

COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN UN POLIPÉPTIDO VARIANTE Y USOS DE LAS MISMAS SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos 63/158,741 presentada el 9 de marzo de 2021, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos 63/294,224 presentada el 28 de diciembre de 2021, cuyo contenido completo se incorpora a la presente mediante esta referencia.

LISTA DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene una Lista de Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Dicha copia en ASCII, creada el 7 de marzo de 2022, se denomina A2186-7046WO_SL.txt y tiene un tamaño de 38,750 bytes.

ANTECEDENTES

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés) y los genes asociados a CRISPR (Cas), conocidos en conjunto como sistemas CRISPR-Cas o CRISPR/Cas, son sistemas inmunitarios adaptativos en arqueas y bacterias que defienden especies particulares frente a elementos genéticos extraños.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona determinadas ventajas y avances sobre la técnica anterior frente a los antecedentes anteriores.

Aunque la presente invención descrita en la presente no se limita a ventajas o funcionalidades específicas, la invención proporciona un polipéptido variante que comprende una alteración con respecto a un polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3, y en donde la alteración es una sustitución de la Tabla 2. En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y/o una sustitución D719R.

En determinadas realizaciones, el polipéptido variante comprende a) una sustitución P14R, una sustitución E311R y una sustitución D32R; b) una sustitución P14R, una sustitución E311R y una sustitución G223R; c) una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R y una sustitución I61R; o d) una sustitución D32R, una sustitución N109R, una sustitución E311R y una sustitución D719R. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende c) una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R y una sustitución I61R.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende además una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución P14G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

En un aspecto, la descripción proporciona un polipéptido variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución de una o más de las posiciones P14, E311, D32, I61, G223, N109 y D719 con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En un aspecto, la descripción proporciona un polipéptido variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una o más de las siguientes sustituciones: P14R, E311R, D32R, I61R, G223R, N109R y D719R.

5 En un aspecto, la descripción proporciona un polipéptido variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución de una o más de las posiciones K208, D302, D590, E154, D567, L38, D145, C13, T338, P14, D55, K221, K35 y E736 con respecto a la SEQ ID NO: 3.

10 En un aspecto, la descripción proporciona un polipéptido variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una o más de las siguientes sustituciones: K208G, D302G, D590G, E154G, D567G, L38G, D145G, C13G, T338G, P14G, D55G, K221G, K35G y E736G.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en P14 (por ejemplo, una sustitución P14R). En determinadas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en E311 (por ejemplo, una sustitución de E311R). En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en D32 (por ejemplo, una sustitución D32R). En determinadas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en I61 (por ejemplo, una sustitución I61R). En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en G223 (por ejemplo, una sustitución G223). En determinadas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en N109 (por ejemplo, una sustitución N109R). En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en D719 (por ejemplo, una sustitución D719R).

20 En determinadas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), una E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), una D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), una I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), una G223 (por ejemplo, una sustitución G223), una N109 (por ejemplo, una sustitución N109R), una D719 (por ejemplo, una sustitución D719R) o cualquier combinación de las mismas.

25 En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una E311R) y D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante P14R, E311R, D32R).

30 En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una E311R) y G223 (por ejemplo, una sustitución G223R) con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante P14R, E311R, G223R).

35 En determinadas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) e I61 (por ejemplo, una sustitución I61R) con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante P14R, E311R, D32R y I61R).

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en la posición D32R (por ejemplo, una sustitución D32R), N109 (por ejemplo, una N109R), E311 (por ejemplo, una sustitución

E311R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R) con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante D32R, N109R, E311R y D719R).

En determinadas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo, una sustitución P14G), D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G), o cualquier combinación de las mismas.

En realizaciones particulares, el polipéptido variante presenta una mayor formación de complejos binarios con una guía de ARN, en relación con un polipéptido precursor. En determinadas realizaciones, el complejo binario que comprende el polipéptido variante presenta una estabilidad aumentada, con respecto a un complejo binario precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una actividad nucleasa aumentada, con respecto a un polipéptido precursor.

En un aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un polipéptido variante descrito en el presente documento, en donde la composición comprende además una guía de ARN o un ácido nucleico que codifica la guía de ARN, en donde la guía de ARN comprende una secuencia repetitiva directa y una secuencia espaciadora. En determinadas realizaciones, la secuencia repetitiva directa es al menos 90% (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13 o comprende una secuencia que tiene al menos 90% (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de identidad con la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la secuencia repetitiva directa es al menos 95% (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13 o comprende una secuencia que tiene al menos 95% (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de identidad con la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la secuencia repetitiva directa es una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13 o comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora comprende de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora se une a una secuencia de cadena diana de un ácido nucleico diana, y en donde una secuencia de cadena no diana de la secuencia de ácido nucleico diana es adyacente a una secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, la secuencia PAM es 5'-TTR-3', 5'-NTTR-3', 5'-NTTN-3', 5'-RTTR-3', 5'-ATTR-3' o 5'-RTTG-3', en donde N es cualquier nucleótido, Y es C o T, y R es A o G. En ciertas realizaciones, la secuencia PAM es 5'-TTG-3', 5'-TTA-3', 5'-ATTG-3', 5'-TTTA-3' o 5'-TTTG-3'.

En determinadas realizaciones, el polipéptido variante comprende además una señal de localización nuclear (NLS).

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende además un marcador de péptido, una proteína fluorescente, un dominio de edición de base, un dominio de metilación de ADN, un dominio de modificación de residuo de histona, un factor de localización, un factor de modificación de la transcripción, un factor de control dependiente de la luz, un factor químicamente inducible o un factor de visualización de cromatina.

En un aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido variante y/o la guía de ARN descrita en cualquier parte del presente documento. En algunas realizaciones, el ácido nucleico tiene codones optimizados para la expresión en una célula. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico se une operativamente a un promotor. En algunas realizaciones, el ácido nucleico está en un vector. En determinadas realizaciones, el vector comprende un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector de fago, un vector adenoviral, un vector adenoasociado o un vector del herpes simple.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante está presente en un sistema de suministro que comprende una nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula lipídica), un liposoma, un exosoma, una microvesícula o un cañón génico.

En un aspecto, la descripción proporciona una célula que comprende el polipéptido variante o la composición de cualquier aspecto o realización anterior.

En algunas realizaciones, la célula es una célula eucariota. En determinadas realizaciones, la célula es una célula de mamífero o una célula vegetal. En determinadas realizaciones, la célula es una célula humana.

En un aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un polipéptido variante o un complejo que comprende el polipéptido variante, en donde el polipéptido variante comprende una alteración con respecto a un polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3, y en donde el polipéptido variante o el complejo presenta una actividad enzimática potenciada, una actividad de unión potenciada, una especificidad de unión potenciada y/o una estabilidad potenciada, con respecto a un polipéptido precursor o un complejo que comprende el polipéptido precursor.

En algunas realizaciones, la alteración es una sustitución de la Tabla 2.

En determinadas realizaciones, la sustitución es una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y/o una sustitución D719R.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende a) una sustitución P14R, una sustitución E311R y una sustitución D32R; b) una sustitución P14R, una sustitución E311R y una sustitución G223R; c) una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R y una sustitución I61R; o d) una sustitución D32R, una sustitución N109R, una sustitución E311R y una sustitución D719R.

En determinadas realizaciones, el polipéptido variante comprende además una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución P14G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

En algunas realizaciones, la actividad enzimática potenciada es la actividad nucleasa potenciada.

En determinadas realizaciones, el polipéptido variante presenta una actividad de unión potenciada a una guía de ARN, con respecto al polipéptido precursor.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una especificidad de unión potenciada a una guía de ARN, con respecto al polipéptido precursor.

En algunas realizaciones, el complejo que comprende el polipéptido Cas12i4 variante es un complejo binario variante que comprende además una guía de ARN, y el complejo binario variante presenta una actividad de unión potenciada a un ácido nucleico diana (por ejemplo, actividad de unión en la diana), con respecto a un complejo binario precursor.

10 En aun otra realización, el complejo que comprende el polipéptido variante es un complejo binario variante que comprende además una guía de ARN, y el complejo binario variante presenta una especificidad de unión potenciada a un ácido nucleico diana (por ejemplo, especificidad de unión en la diana), con respecto a un complejo binario precursor.

15 En algunas realizaciones, el complejo que comprende el polipéptido variante es un complejo binario variante que comprende además una guía de ARN, y el complejo binario variante presenta una estabilidad potenciada, con respecto a un complejo binario precursor.

En determinadas realizaciones, el complejo binario variante y un ácido nucleico diana forman un complejo ternario variante, y el complejo ternario variante presenta una estabilidad aumentada, con respecto a un complejo ternario precursor.

20 En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta además una formación de complejos binarios potenciada, interacciones proteína-ARN potenciadas y/o una disociación disminuida de una guía de ARN, con respecto al polipéptido precursor.

25 En determinadas realizaciones, el complejo binario variante presenta además una disociación disminuida de un ácido nucleico diana y/o una unión fuera de la diana disminuida a un ácido nucleico no diana, con respecto al complejo binario precursor.

En algunas realizaciones, la actividad enzimática potenciada, la actividad de unión potenciada, la especificidad de unión potenciada y/o la estabilidad potenciada se producen en un intervalo de temperaturas, por ejemplo, de 20 °C a 65 °C (por ejemplo, de 20 °C a 30 °C, de 30 °C a 40 °C, de 40 °C a 50 °C, de 50 °C a 60 °C o de 60 °C a 65 °C).

30 En determinadas realizaciones, la actividad enzimática potenciada, la actividad de unión potenciada, la especificidad de unión potenciada y/o la estabilidad potenciada se producen en un intervalo de tiempos de incubación.

35 En algunas realizaciones, la actividad enzimática potenciada, la actividad de unión potenciada, la especificidad de unión potenciada y/o la estabilidad potenciada se producen en un tampón que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 8.6 (por ejemplo, de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 8.0, de aproximadamente 7.8 a 8.3 o de aproximadamente 8.0 a 8.6).

En determinadas realizaciones, la actividad enzimática potenciada, la actividad de unión potenciada, la especificidad de unión potenciada y/o la estabilidad potenciada se producen cuando un valor

de T_m del polipéptido variante, el complejo binario variante o el complejo ternario variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor, el complejo binario precursor o el complejo ternario precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende un dominio RuvC o un dominio RuvC dividido.

En determinadas realizaciones, el polipéptido precursor comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3.

En determinadas realizaciones, la guía de ARN comprende una secuencia repetitiva directa y una secuencia espaciadora.

En algunas realizaciones, la secuencia repetitiva directa es al menos 90% (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13 o comprende una secuencia que tiene al menos 90% (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de identidad con la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones, la secuencia repetitiva directa es al menos 95% (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13 o comprende una secuencia que tiene al menos 95% (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de identidad con la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la secuencia repetitiva directa es una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13 o comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 15.

En determinadas realizaciones, la secuencia espaciadora comprende entre 15 y 35 nucleótidos de longitud.

En determinadas realizaciones, la secuencia espaciadora comprende complementariedad con una secuencia de cadena diana de un ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una secuencia de cadena no diana adyacente a una secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM). En determinadas realizaciones, la secuencia PAM es 5'-TTR-3', 5'-NTTR-3', 5'-NTTN-3', 5'-RTTR-3', 5'-ATTR-3' o 5'-RTTG-3', en donde N es cualquier nucleótido, Y es C o T, y R es A o G. En algunas realizaciones, la secuencia PAM es 5'-TTG-3', 5'-TTA-3', 5'-ATTG-3', 5'-TTTA-3' o 5'-TTTG-3'.

En determinadas realizaciones, el polipéptido variante comprende además un marcador de péptido, una proteína fluorescente, un dominio de edición de base, un dominio de metilación de ADN, un dominio de modificación de residuo de histona, un factor de localización, un factor de modificación de la transcripción, un factor de control dependiente de la luz, un factor químicamente inducible o un factor de visualización de cromatina.

En un aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido variante del aspecto anterior o realizaciones de este, en donde opcionalmente el ácido nucleico tiene codones optimizados para la expresión en una célula.

En algunas realizaciones, la célula es una célula eucariota.

En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero o una célula vegetal. En determinadas realizaciones, la célula es una célula humana.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el polipéptido variante se une operativamente a un promotor.

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el polipéptido variante está en un vector.

5 En algunas realizaciones, el vector comprende un vector retrovílico, un vector lentivílico, un vector de fago, un vector adenovílico, un vector adenoasociado o un vector del herpes simple.

En determinadas realizaciones, el polipéptido variante está presente en una composición de administración que comprende una nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula lipídica), un liposoma, un exosoma, una microvesícula o un cañón génico.

10 En un aspecto, la descripción proporciona un método para editar un gen en una célula, en donde el método comprende poner en contacto la célula con el polipéptido o composición variante de cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores.

En un aspecto, la descripción proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido variante de cualquiera de los aspectos previos de las realizaciones.

15 En determinadas realizaciones, la secuencia de la molécula de ácido nucleico es un 95% idéntica a la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2 o 21-27. En algunas realizaciones, la secuencia de la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2 o 21-27. En determinadas realizaciones, la secuencia de la molécula de ácido nucleico es un 95% idéntica a la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las
20 SEQ ID NO: 22, 23, o 25.

Aunque la presente invención descrita en la presente no se limita a ventajas o funcionalidades específicas, la invención proporciona un polipéptido variante y/o una composición que comprende un polipéptido variante, en donde el polipéptido variante comprende una alteración con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3, y en donde el polipéptido variante o un complejo que comprende el
25 polipéptido variante presenta actividad enzimática potenciada, actividad de unión potenciada, especificidad de unión potenciada y/o estabilidad potenciada en relación con el polipéptido precursor o un complejo que comprende el polipéptido precursor.

En algunos aspectos, la actividad enzimática potenciada es la actividad nucleasa potenciada.

30 En algunos aspectos, el polipéptido variante presenta una actividad de unión potenciada a una guía de ARN, con respecto al polipéptido precursor.

En algunos aspectos, el polipéptido variante presenta una especificidad de unión potenciada a una guía de ARN, con respecto al polipéptido precursor.

35 En algunos aspectos, el polipéptido variante y una guía de ARN forman un complejo binario variante, y el complejo binario variante presenta actividad de unión potenciada a un ácido nucleico diana (por ejemplo, actividad de unión en la diana) en relación con un complejo binario precursor.

En algunos aspectos, el polipéptido variante y una guía de ARN forman un complejo binario variante, y el complejo binario variante presenta especificidad de unión potenciada a un ácido nucleico diana (por ejemplo, especificidad de unión en la diana) en relación con un complejo binario precursor.

En algunos aspectos, el polipéptido variante y una guía de ARN forman un complejo binario variante, y el complejo binario variante presenta estabilidad potenciada en relación con un complejo binario precursor.

5 En algunos aspectos, el complejo binario variante y un ácido nucleico diana forman un complejo ternario variante, y el complejo ternario variante presenta una estabilidad aumentada, con respecto a un complejo ternario precursor.

En algunos aspectos, el polipéptido variante presenta además una formación de complejos binarios potenciada, interacciones proteína-ARN potenciadas y/o una disociación disminuida de una guía de ARN, con respecto al polipéptido precursor.

10 En algunos aspectos, el complejo binario variante presenta además una disociación disminuida del ácido nucleico diana y/o una unión fuera de la diana disminuida a un ácido nucleico no diana, con respecto al complejo binario precursor.

15 En algunos aspectos, la actividad enzimática potenciada, la actividad de unión potenciada, la especificidad de unión potenciada y/o la estabilidad potenciada se producen en un intervalo de temperaturas, por ejemplo, de 20 °C a 65 °C (por ejemplo, de 20 °C a 30 °C, de 30 °C a 40 °C, de 40 °C a 50 °C, de 50 °C a 60 °C o de 60 °C a 65 °C).

En algunos aspectos, la actividad enzimática potenciada, la actividad de unión potenciada, la especificidad de unión potenciada y/o la estabilidad potenciada se producen en un intervalo de tiempos de incubación.

20 En algunos aspectos, la actividad enzimática potenciada, la actividad de unión potenciada, la especificidad de unión potenciada y/o la estabilidad potenciada se producen en un tampón que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 8.6 (por ejemplo, de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 8.0, de aproximadamente 7.8 a 8.3 o de aproximadamente 8.0 a 8.6).

25 En algunos aspectos, la actividad enzimática potenciada, la actividad de unión potenciada, la especificidad de unión potenciada y/o la estabilidad potenciada se producen cuando un valor de T_m del polipéptido variante, el complejo binario variante o el complejo ternario variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor, el complejo binario precursor o el complejo ternario precursor.

30 En otros aspectos, la alteración comprende una alteración de la secuencia de aminoácidos con respecto al polipéptido precursor que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3, en donde la alteración comprende una o más (*por ejemplo*, una, dos, tres, cuatro, cinco o más) sustituciones, inserciones, deleciones y/o adiciones en comparación con el polipéptido precursor que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:3.

35 En algunos aspectos, la alteración comprende una alteración de la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia polipeptídica precursora expuesta en la SEQ ID NO: 3, en donde la alteración comprende una o más de las sustituciones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 2.

En algunos aspectos, la alteración comprende una sustitución de arginina, lisina, glutamina, asparagina, histidina, alanina o glicina.

En algunos aspectos, la alteración es una sustitución de aminoácidos seleccionada de P14R, E311R, D32R, I61R, G223R, N109R y/o D719R.

5 En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de
10 secuencia comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición E311 (por ejemplo, una sustitución E311R) con
15 respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición E311 (por ejemplo, una sustitución E311R) con
20 respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que
25 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

30 En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición I61 (por ejemplo, una sustitución I61R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de
35 secuencia comprende una sustitución en la posición I61 (por ejemplo, una sustitución I61R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición G223 (por ejemplo, una sustitución G223R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición G223 (por ejemplo, una sustitución G223R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D719 (por ejemplo, una sustitución D719R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D719 (por ejemplo, una sustitución D719R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la alteración es una combinación de sustituciones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 3.

En algunos aspectos, la combinación de sustituciones de aminoácidos comprende las sustituciones expuestas en a) P14R, E311R, D32R; b) P14R, E311R, G223R; c) P14R, E311R, D32R, I61R; o d) D32R, N109R, E311R, D719R.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende un aminoácido que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una E311R) y D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante P14R, E311R, D32R).

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende un aminoácido que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una E311R) y G223 (por ejemplo, una sustitución G223R) con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante P14R, E311R, G223R).

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende un aminoácido que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) e I61 (por ejemplo, una sustitución I61R) con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante P14R, E311R, D32R y I61R).

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende un aminoácido que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D32R (por ejemplo, una sustitución D32R), N109 (por ejemplo, una N109R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R) e D719 (por ejemplo, una sustitución D719R) con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante D32R, N109R, E311R y D719R).

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D302 (por ejemplo, una sustitución D302G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D302 (por ejemplo, una sustitución D302G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D590 (por ejemplo, una sustitución D590G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo,

sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D590 (por ejemplo, una sustitución D590G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

5 En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición E154 (por ejemplo, una sustitución E154G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, 10 sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición E154 (por ejemplo, una sustitución E154G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una 15 secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D567 (por ejemplo, una sustitución D567G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, 20 sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D567 (por ejemplo, una sustitución D567G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID 25 NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición L38 (por ejemplo, una sustitución L38G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de 30 secuencia comprende una sustitución en la posición L38 (por ejemplo, una sustitución L38G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D145 (por ejemplo, una sustitución D145G) con 35 respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de

secuencia comprende una sustitución en la posición D145 (por ejemplo, una sustitución D145G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

5 En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición C13 (por ejemplo, una sustitución C13G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de
10 secuencia comprende una sustitución en la posición C13 (por ejemplo, una sustitución C13G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición T338 (por ejemplo, una sustitución T338G) con
15 respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición T338 (por ejemplo, una sustitución T338G) con
20 respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que
25 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

30 En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D55 (por ejemplo, una sustitución D55G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo,
35 sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D55 (por ejemplo, una sustitución D55G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición K221 (por ejemplo, una sustitución K221G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición K221 (por ejemplo, una sustitución K221G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición E736 (por ejemplo, una sustitución E736G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición E736 (por ejemplo, una sustitución E736G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, el polipéptido variante comprende un dominio RuvC o un dominio RuvC dividido.

En algunos aspectos, el polipéptido variante comprende uno o más residuos catalíticos (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico). En algunos aspectos, el uno o más residuos catalíticos comprenden D328 y E530. En algunos aspectos, el uno o más residuos catalíticos comprenden además D684, D646 o D621.

En algunos aspectos, la composición o complejo que comprende el polipéptido variante comprende además una guía de ARN, y la guía de ARN comprende una secuencia de repetitiva directa y una secuencia espaciadora.

En algunos aspectos, la guía de ARN comprende una secuencia repetitiva directa y una secuencia espaciadora.

En algunos aspectos, la secuencia repetitiva directa comprende una secuencia de nucleótidos con al menos el 95% de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13.

En algunos aspectos, la secuencia repetitiva directa es el complemento inverso de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13.

5 En algunos aspectos, la secuencia espaciadora comprende entre 15 y 35 nucleótidos de longitud.

En algunos aspectos, el ácido nucleico diana comprende una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótidos en la secuencia espaciadora.

10 En algunos aspectos, el ácido nucleico diana es adyacente a una secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM), donde la secuencia PAM comprende una secuencia de nucleótidos expuesta como 5'-NTTR-3', 5'-NTTN-3', 5'-RTTR-3', 5'-ATTR-3' o 5'-RTTG-3', donde N es cualquier nucleótido y R es A o G. En algunos aspectos, la secuencia PAM comprende una secuencia de nucleótidos expuesta como 5'-GTTA-3', 5'-TTTG-3', 5'-CTTG-3', 5'-GTTG-3', 5'-TTTA-3', 5'-CTTA-3', 5'-ATTG-3', 5'-ATTA-3', 5'-ACTG-3', 5'-CATA-3', 5'-TTGA-3' o 5'-TATA-3'.

En algunos aspectos, el ácido nucleico diana es ADN monocatenario o ADN bicatenario).

15 En algunos aspectos, el polipéptido variante comprende además un marcador de péptido, una proteína fluorescente, un dominio de edición de base, un dominio de metilación de ADN, un dominio de modificación de residuo de histona, un factor de localización, un factor de modificación de la transcripción, un factor de control dependiente de la luz, un factor químicamente inducible o un factor de visualización de cromatina.

20 En algunos aspectos, un ácido nucleico que codifica el polipéptido variante está optimizado por codones para la expresión en una célula

En algunos aspectos, el ácido nucleico que codifica el polipéptido variante se une operativamente a un promotor.

En algunos aspectos, el ácido nucleico que codifica el polipéptido variante está en un vector.

25 En algunos aspectos, el vector comprende un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector de fago, un vector adenoviral, un vector adenoasociado o un vector del herpes simple.

En algunos aspectos, la composición está presente en una composición de administración que comprende una nanopartícula, un liposoma, un exosoma, una microvesícula, o una pistola genética.

30 La invención proporciona además una célula que comprende el polipéptido variante y/o la composición descrita en el presente documento. En algunos aspectos, la célula es una célula eucariota o una célula procariota. En algunos aspectos, la célula es una célula de mamífero o una célula vegetal. En algunos aspectos, la célula es una célula humana.

La invención proporciona además un método para preparar el polipéptido variante y/o la composición descrita en el presente documento.

35 La invención proporciona además un método para complejar el polipéptido variante con la guía de ARN descrita en el presente documento.

La invención proporciona además un método para complejar el complejo binario variante con el ácido nucleico diana, descrito en el presente documento.

La invención proporciona además un método de administración del polipéptido variante y/o la composición descrita en el presente documento.

La invención proporciona además una composición que comprende un polipéptido variante, o un complejo que comprende el polipéptido variante y una guía de ARN, en donde el polipéptido variante comprende una alteración con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3, y en donde el polipéptido variante o el complejo presenta una actividad enzimática potenciada, una actividad de unión potenciada, una especificidad de unión potenciada y/o una estabilidad potenciada, con respecto a un polipéptido precursor o un complejo que comprende el polipéptido precursor y la guía de ARN.

En algunos aspectos, la actividad enzimática potenciada es la actividad nucleasa potenciada.

En algunos aspectos, el polipéptido variante presenta una actividad de unión potenciada a la guía de ARN, con respecto al polipéptido precursor.

En algunos aspectos, el polipéptido variante presenta una especificidad de unión potenciada a la guía de ARN, con respecto al polipéptido precursor.

En algunos aspectos, el polipéptido variante y la guía de ARN forman un complejo binario variante, y el complejo binario variante presenta actividad de unión potenciada a un ácido nucleico diana (por ejemplo, actividad de unión en la diana) en relación con un complejo binario precursor.

En algunos aspectos, el polipéptido variante y la guía de ARN forman un complejo binario variante, y el complejo binario variante presenta especificidad de unión potenciada a un ácido nucleico diana (por ejemplo, especificidad de unión en la diana) en relación con un complejo binario precursor.

En algunos aspectos, el polipéptido variante y la guía de ARN forman un complejo binario variante, y el complejo binario variante presenta estabilidad potenciada en relación con un complejo binario precursor.

En algunos aspectos, el complejo binario variante y un ácido nucleico diana forman un complejo ternario variante, y el complejo ternario variante presenta una estabilidad aumentada, con respecto a un complejo ternario precursor.

En algunos aspectos, el polipéptido variante presenta además una formación de complejos binarios potenciada, interacciones proteína-ARN potenciadas y/o una disociación disminuida de la guía de ARN, con respecto al polipéptido precursor.

En algunos aspectos, el complejo binario variante presenta además una disociación disminuida del ácido nucleico diana y/o una unión fuera de la diana disminuida a un ácido nucleico no diana, con respecto al complejo binario precursor.

En algunos aspectos, la actividad enzimática potenciada, la actividad de unión potenciada, la especificidad de unión potenciada y/o la estabilidad potenciada se producen en un intervalo de temperaturas, por ejemplo, de 20 °C a 65 °C.

En algunos aspectos, la actividad enzimática potenciada, la actividad de unión potenciada, la especificidad de unión potenciada y/o la estabilidad potenciada se producen en un intervalo de tiempos de incubación.

En algunos aspectos, la actividad enzimática potenciada, la actividad de unión potenciada, la especificidad de unión potenciada y/o la estabilidad potenciada se producen en un tampón que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 8.6 (por ejemplo, de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 8.0, de aproximadamente 7.8 a 8.3 o de aproximadamente 8.0 a 8.6).

5 En algunos aspectos, la actividad enzimática potenciada, la actividad de unión potenciada, la especificidad de unión potenciada y/o la estabilidad potenciada se producen cuando un valor de T_m del polipéptido variante, el complejo binario variante o el complejo ternario variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor, el complejo binario precursor o el complejo ternario precursor.

10 En otros aspectos, la alteración comprende una alteración de la secuencia de aminoácidos con respecto al polipéptido precursor que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3, en donde la alteración comprende una o más (*por ejemplo*, una, dos, tres, cuatro, cinco o más) sustituciones, inserciones, deleciones y/o adiciones en comparación con el polipéptido precursor que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:3.

15 En algunos aspectos, la alteración comprende una alteración de la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia polipeptídica precursora expuesta en la SEQ ID NO: 3, en donde la alteración comprende una o más de las sustituciones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 2.

En algunos aspectos, la alteración comprende una sustitución de arginina, lisina, glutamina, asparagina, histidina, alanina o glicina.

20 En algunos aspectos, el polipéptido variante comprende un dominio RuvC o un dominio RuvC dividido.

En algunos aspectos, el polipéptido variante comprende uno o más residuos catalíticos (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico). En algunos aspectos, el uno o más residuos catalíticos comprenden D328 y E530. En algunos aspectos, el uno o más residuos catalíticos comprenden además D684, D646 o D621.

25 En algunos aspectos, la guía de ARN comprende una secuencia repetitiva directa y una secuencia espaciadora.

En algunos aspectos, la secuencia repetitiva directa comprende una secuencia de nucleótidos con al menos el 95% de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13.

30 En algunos aspectos, la secuencia repetitiva directa es el complemento inverso de una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13.

En algunos aspectos, la secuencia espaciadora comprende entre 15 y 35 nucleótidos de longitud.

En algunos aspectos, el ácido nucleico diana comprende una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótidos en la secuencia espaciadora.

35 En algunos aspectos, el ácido nucleico diana es adyacente a una secuencia de PAM, en donde la secuencia PAM comprende una secuencia de nucleótidos expuesta como 5'-NTTR-3', 5'-NTTN-3', 5'-RTTR-3', 5'-ATTR-3' o 5'-RTTG-3', donde N es cualquier nucleótido y R es A o G. En algunos aspectos, la secuencia PAM comprende una secuencia de nucleótidos expuesta como 5'-GTTA-3', 5'-TTTG-3', 5'-

CTTG-3', 5'-GTTG-3', 5'-TTTA-3', 5'-CTTA-3', 5'-ATTG-3', 5'-ATTA-3', 5'-ACTG-3', 5'-CATA-3', 5'-TTGA-3' o 5'-TATA-3'.

En algunos aspectos, el ácido nucleico diana es ADN monocatenario o ADN bicatenario).

En algunos aspectos, el polipéptido variante comprende además un marcador de péptido, una proteína fluorescente, un dominio de edición de base, un dominio de metilación de ADN, un dominio de modificación de residuo de histona, un factor de localización, un factor de modificación de la transcripción, un factor de control dependiente de la luz, un factor químicamente inducible o un factor de visualización de cromatina.

En algunos aspectos, un ácido nucleico que codifica el polipéptido variante está optimizado por codones para la expresión en una célula

En algunos aspectos, el ácido nucleico que codifica el polipéptido variante se une operativamente a un promotor.

En algunos aspectos, el ácido nucleico que codifica el polipéptido variante está en un vector.

En algunos aspectos, el vector comprende un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector de fago, un vector adenoviral, un vector adenoasociado o un vector del herpes simple.

En algunos aspectos, la composición o complejo está presente en un sistema de administración que comprende una nanopartícula, un liposoma, un exosoma, una microvesícula, o una pistola genética.

La invención proporciona además una célula que comprende el polipéptido variante y/o el complejo descrito en el presente documento. En algunos aspectos, la célula es una célula eucariota o una célula procariota. En algunos aspectos, la célula es una célula de mamífero o una célula vegetal. En algunos aspectos, la célula es una célula humana.

La invención proporciona además un método para preparar el polipéptido variante y/o el complejo descrito en el presente documento.

La invención proporciona además un método para complejar el polipéptido variante con la guía de ARN descrita en el presente documento.

La invención proporciona además un método para complejar el complejo binario variante con el ácido nucleico diana, descrito en el presente documento.

La invención proporciona además un método de administración del polipéptido variante y/o el complejo descrito en el presente documento.

DEFINICIONES

La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a determinadas figuras, pero la invención no se limita a las mismas sino únicamente a las reivindicaciones. En general, los términos que se exponen a continuación en el presente documento deben entenderse en su sentido común, a menos que se indique otra cosa.

A menos que se defina de otro modo, los términos científicos y técnicos que se usan en el presente documento tienen el significado comúnmente entendido por los expertos en la técnica. En el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en este documento tienen prioridad sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. A menos que el contexto requiera lo contrario, los términos

singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. El uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. El uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante.

5 En general, la nomenclatura utilizada en relación con el cultivo celular y tisular, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descrita en el presente documento es bien conocida y se utiliza comúnmente en la técnica. Los métodos y técnicas proporcionados en el presente documento se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos
10 que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento son las conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar
15 se utilizan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

Para que la descripción pueda entenderse más fácilmente, los términos seleccionados se definen a continuación.

Los artículos "un" y "una" se usan en la presente para referirse a uno o más de uno (es decir, a al
20 menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

"Aproximadamente", como se usa en la presente, cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$ y aún más preferentemente $\pm 0.1\%$ del valor
25 especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

Como se usa en el presente documento, el término "complejo" se refiere a una agrupación de dos o más moléculas. En algunas realizaciones, el complejo comprende un polipéptido y una molécula de ácido nucleico que interactúan (por ejemplo, se unen, entran en contacto, se adhieren) entre sí.

Como se usa en el presente documento, la expresión "complejo binario" se refiere a una agrupación
30 de dos moléculas (por ejemplo, un polipéptido y una molécula de ácido nucleico). En algunas realizaciones, un complejo binario se refiere a una agrupación de un polipéptido y un resto de direccionamiento (por ejemplo, una guía de ARN). En algunas realizaciones, un complejo binario se refiere a una ribonucleoproteína (RNP). Como se usa en el presente documento, la expresión "complejo binario variante" se refiere a la agrupación de un polipéptido variante y una guía de ARN. Como se usa en el presente
35 documento, la expresión "complejo binario precursor" se refiere a la agrupación de un polipéptido precursor y una guía de ARN o un polipéptido de referencia y una guía de ARN.

Como se usa en el presente documento, la expresión "complejo ternario" se refiere a una agrupación de tres moléculas (por ejemplo, un polipéptido y dos moléculas de ácido nucleico). En algunas

realizaciones, un "complejo ternario" se refiere a una agrupación de un polipéptido, una molécula de ARN y una molécula de ADN. En algunas realizaciones, un complejo ternario se refiere a una agrupación de un polipéptido, un resto de direccionamiento (por ejemplo, una guía de ARN) y un ácido nucleico diana (por ejemplo, una molécula de ADN diana). En algunas realizaciones, un "complejo ternario" se refiere a una agrupación de un complejo binario (por ejemplo, una ribonucleoproteína) y una tercera molécula (por ejemplo, un ácido nucleico diana).

Como se usa en el presente documento, el término "dominio" se refiere a una unidad estructural y/o funcional distinta de un polipéptido. En algunas realizaciones, un dominio puede comprender una secuencia de aminoácidos conservada.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "precursor", "polipéptido precursor," y "secuencia precursora" se refieren a un polipéptido precursor (por ejemplo, polipéptido de partida) al que se hace una alteración para producir un polipéptido variante de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, la expresión "motivo adyacente del protoespaciador" o "PAM" se refiere a una secuencia de ADN adyacente a una secuencia diana a la que se une un complejo que comprende un efector (por ejemplo, una nucleasa) y una guía de ARN. En algunas realizaciones, se requiere un PAM para la actividad enzimática. El "ácido nucleico diana" es una molécula bicatenaria: una cadena comprende la secuencia diana adyacente al PAM y se denomina "cadena PAM" (por ejemplo, la cadena no diana o la cadena no complementaria al espaciador) y la otra cadena complementaria se denomina la "cadena no PAM" (por ejemplo, la cadena diana o la cadena complementaria al espaciador).

Como se usa en el presente documento, el término "adyacente" incluye casos en los que una guía de ARN del complejo se une, interactúa con o se asocia específicamente a una secuencia diana que está inmediatamente adyacente a un PAM. En dichos casos, no hay nucleótidos entre la secuencia diana y el PAM. El término "adyacente" también incluye casos en los que hay un número pequeño (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) de nucleótidos entre la secuencia diana, a la que se une el resto de direccionamiento, y el PAM.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "composición de referencia", "molécula de referencia", "secuencia de referencia" y "referencia" se refieren a un control, tal como un control negativo o un precursor (por ejemplo, una secuencia precursora, una proteína precursora o una proteína de tipo silvestre). Por ejemplo, una molécula de referencia se refiere a un polipéptido con el que se compara un polipéptido variante. Análogamente, una guía de ARN de referencia se refiere a un resto de direccionamiento con el que se compara una guía de ARN modificada. La molécula variante o modificada puede compararse con la molécula de referencia basándose en la secuencia (por ejemplo, la molécula variante o modificada puede tener el X % de identidad u homología de secuencia con la molécula de referencia), la termoestabilidad o la actividad (por ejemplo, la molécula variante o modificada puede tener el X % de la actividad de la molécula de referencia). Por ejemplo, una molécula variante o modificada puede caracterizarse por tener no más del 10 % de una actividad del polipéptido de referencia o puede caracterizarse por tener al menos el 10 % más de una actividad del polipéptido de referencia. Los ejemplos de polipéptidos de referencia incluyen polipéptidos sin modificar de origen natural, por ejemplo, polipéptidos de origen natural de arqueas u otras especies bacterianas. En determinadas realizaciones, el polipéptido

de referencia es un polipéptido de origen natural que tiene la identidad de secuencia u homología más cercana con el polipéptido variante con el que se está comparando. En determinadas realizaciones, el polipéptido de referencia es una molécula precursora que tiene una secuencia de origen natural o conocida en la que se ha realizado una mutación para llegar al polipéptido variante.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "ARN guía" o "secuencia de ARN guía" se refieren a cualquier molécula de ARN que facilita el direccionamiento de un polipéptido descrito en el presente documento a un ácido nucleico diana. Por ejemplo, una guía de ARN puede ser una molécula que reconoce (por ejemplo, se une a) un ácido nucleico diana. Una guía de ARN puede diseñarse para que sea complementaria a una cadena diana (por ejemplo, la cadena no PAM) de una secuencia de ácido nucleico diana. Una guía de ARN comprende una secuencia de direccionamiento de ADN y una secuencia repetitiva directa (DR, por sus siglas en inglés). Las expresiones ARN de CRISPR (ARNcr), pre-ARNcr, ARNcr maduro y ARNg también se usan en el presente documento para hacer referencia a una guía de ARN. Como se usa en el presente documento, la expresión "pre-ARNcr" se refiere a una molécula de ARN sin procesar que comprende una secuencia DR-espaciador-DR. Como se usa en el presente documento, la expresión "ARNcr maduro" se refiere a una forma procesada de un pre-ARNcr; un ARNcr maduro puede comprender una secuencia DR-espaciador, en donde la DR es una forma trunca de la DR de un pre-ARNcr y/o el espaciador es una forma trunca del espaciador de un pre-ARNcr. Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente idéntico/a" se refiere a una secuencia, polinucleótido o polipéptido, que tiene un determinado grado de identidad con una secuencia de referencia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente idéntico/a" se refiere a una secuencia, polinucleótido o polipéptido, que tiene un determinado grado de identidad con una secuencia de referencia.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico diana", "secuencia diana" y "sustrato diana" se refieren a un ácido nucleico al que se le une específicamente una guía de ARN. En algunas realizaciones, la secuencia de direccionamiento de ADN de una guía de ARN se une a un ácido nucleico diana.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "polipéptido variante", "polipéptido efector variante" y "polipéptido de nucleasa CRISPR variante" se refieren a un polipéptido que comprende una alteración, por ejemplo, pero sin limitarse a ello, una sustitución, inserción, delección, adición y/o fusión, en una o más posiciones de residuos, en comparación con un polipéptido precursor. Como se usa en el presente documento, las expresiones "polipéptido variante", "polipéptido efector variante" y "polipéptido de nucleasa CRISPR variante" se refieren a un polipéptido que comprende una alteración en comparación con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1A muestra la actividad indel (% de indel en bruto) de variantes de nucleasa CRISPR que comprenden dos o tres sustituciones de arginina en comparación con una nucleasa CRISPR de tipo silvestre (TS; SEQ ID NO: 3 a través de una secuencia diana de EMX1 de la (SEQ ID NO: 16), una

secuencia diana de AAVS1 de la (SEQ ID NO: 20) y una secuencia diana de VEGFA de la (SEQ ID NO: 18). Los datos mostrados son un promedio de dos biorreplicados de dos réplicas técnicas cada uno.

La Figura 1B muestra la actividad indel (% de indel en bruto) de variantes de nucleasa CRISPR que comprenden dos, tres o cuatro sustituciones de arginina en comparación con una nucleasa CRISPR de tipo silvestre (TS; SEQ ID NO: 3 a través de una secuencia diana de EMX1 de la (SEQ ID NO: 16), una secuencia diana de AAVS1 de la (SEQ ID NO: 20) y una secuencia diana de VEGFA de la (SEQ ID NO: 18). Los datos mostrados son un promedio de dos biorreplicados de dos réplicas técnicas cada uno.

La Figura 1C muestra la actividad indel (% de indel en bruto) de variantes de nucleasa CRISPR que comprenden dos, tres o cuatro sustituciones de arginina en comparación con una nucleasa CRISPR de tipo silvestre (TS; SEQ ID NO: 3 a través de una secuencia diana de EMX1 de la (SEQ ID NO: 16), una secuencia diana de AAVS1 de la (SEQ ID NO: 20) y una secuencia diana de VEGFA de la (SEQ ID NO: 18). Los datos mostrados son un promedio de dos biorreplicados de dos réplicas técnicas cada uno.

La Figura 2 muestra la actividad indel (% de indel en bruto) de variantes de nucleasa CRISPR comprenden sustituciones de glicina individuales en en comparación con una nucleasa CRISPR de tipo silvestre (TS; SEQ ID NO: 3 a través de una secuencia diana de EMX1 de la (SEQ ID NO: 16), una secuencia diana de AAVS1 de la (SEQ ID NO: 20) y una secuencia diana de VEGFA de la (SEQ ID NO: 18). Las líneas punteadas representan la actividad indel promedio por el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 en cada uno de los tres objetivos. Los datos mostrados son un promedio de dos biorreplicados de dos réplicas técnicas cada uno.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En algunos aspectos, la presente invención proporciona variantes novedosas del efector (por ejemplo, la nucleasa CRISPR) de la SEQ ID NO: 3, composiciones que comprenden las variantes y métodos de preparación y uso de las mismas. En otros aspectos, la presente invención proporciona además complejos que comprenden una variante del efector (por ejemplo, la nucleasa CRISPR) de la SEQ ID NO: 3 y composiciones, métodos de preparación y uso de las mismas. En algunos aspectos, en el presente documento se describe una composición que comprende un complejo que tiene una o más características. En algunos aspectos, se describe un método de suministro de una composición que comprende el complejo.

COMPOSICIONES

En algunas realizaciones, una composición de la invención incluye un polipéptido variante que presenta una actividad enzimática potenciada, una actividad de unión potenciada, una especificidad de unión potenciada y/o una estabilidad potenciada, con respecto a un polipéptido precursor. En algunas realizaciones, una composición de la invención incluye un complejo que comprende un polipéptido variante que presenta una actividad enzimática potenciada, una actividad de unión potenciada, una especificidad de unión potenciada y/o una estabilidad potenciada con respecto a un complejo precursor.

En algunas realizaciones, una composición de la invención incluye un polipéptido variante y una guía de ARN. En algunas realizaciones, una composición de la invención incluye un complejo binario variante que comprende un polipéptido variante y una guía de ARN.

En algunos aspectos de la composición, el polipéptido variante tiene una formación de complejos aumentada (por ejemplo, una formación de complejos binarios aumentada) con la guía de ARN en comparación con un polipéptido precursor. En algunos aspectos de la composición, el polipéptido variante y la guía de ARN tienen una mayor afinidad de unión, en comparación con un polipéptido precursor y la guía de ARN. En algunos aspectos de la composición, el polipéptido variante y la guía de ARN tienen interacciones proteína-ARN más fuertes (por ejemplo, interacciones iónicas), en comparación con un polipéptido precursor y la guía de ARN. En algunos aspectos de la composición, el complejo binario variante es más estable que un complejo binario precursor.

En algunas realizaciones, una composición de la invención incluye un polipéptido variante, una guía de ARN y un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, una composición de la invención incluye un complejo ternario variante que comprende un polipéptido variante, una guía de ARN y un ácido nucleico diana.

En algunos aspectos de la composición, el polipéptido variante tiene una formación de complejos aumentada (por ejemplo, una formación de complejos ternarios aumentada) con la guía de ARN y el ácido nucleico diana en comparación con un polipéptido precursor. En algunos aspectos de la composición, el polipéptido variante y la guía de ARN (por ejemplo, el complejo binario variante) tienen una mayor afinidad de unión a un ácido nucleico diana, en comparación con un polipéptido precursor y la guía de ARN (por ejemplo, un complejo binario precursor). En algunos aspectos de la composición, el complejo ternario variante es más estable que un complejo ternario precursor.

En algunas realizaciones, la composición de la presente invención incluye un polipéptido variante descrito en el presente documento.

POLIPÉPTIDOS VARIANTES

En una realización, el polipéptido variante es un polipéptido aislado o purificado.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante (por ejemplo, polipéptido de nucleasa CRISPR variante) de la presente invención es una variante de un polipéptido precursor (por ejemplo, una nucleasa CRISPR precursora), en donde el precursor está codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos tal como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, o SEQ ID NO: 27 o comprende una secuencia de aminoácidos tal como la SEQ ID NO: 3. Véase la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias correspondientes a las SEQ ID NO: 1-3 y 21-27.

SEQ ID NO: 1
ATGATCAAGTCTATTCAGCTGAAGGTCAAGGGGGAGTGTCCGATCACGAAGGATGTAATC
AACGAATACAAAGAATACTATAACAATTGCAGTGATTGGATTAACAAACAATCTGACGTCCATTACCA
TCGGGGAGATGGCAAATTTCTGCAATCGTTGAGCGATAAAGAAGTGGCCTATATCTCAATGGGC
CTGTCCGATGAGTGGAAAGACAAACCGTTATATCATCTGTTTACCAAAAAATATCACACCAAAAAATG
CGGATAACTTATTATACTACTACATTAAAGAAAAAATCTGGACGGCTACAAAGGCAATACGCTTAA
TATCTCCAATACATCTTTCCGCCAGTTCGGTTATTTCAAACCTCGTGGTGAGCAACTACCGCACTAAA
ATCCGTACGCTGAATTGTAATAAATCAAGCGTAAGAAAATCGATGCCGATTCCACGTCTGAGGATATC

GAAATGCAGGTGATGTACGAAATTATTAATACAGTTTAAATAAAAAAGTCTGATTGGGATAACTTCA
 TTAGCTATATCGAAAACGTTGAAAATCCTAATATTGACAACATCAACCGCTACAACTGCTGCGCGA
 ATGCTTTTGCGAAAACGAAAACATGATTAAGAACAACCTTGAATTGCTGTCTGTGGAACAATTGAAA
 AAATTTGGCGGTTGCATCATGAAACCTCACATTAATAGCATGACCATTAAACATTCAAGATTTTAAAT
 5 TGAGGAAAAAGAAAACCTCTCTGGGGTTCATCCTCCACCTCCCACTGAACAAAAAACAGTATCAAAT
 TGAACCTCTGGGCAATCGTCAGATTAATAAAGGCACCAAGAAATTCACGAAACGTTAGTTGACAT
 TACTAACACCCATGGCGAAAACATTGTGTTTACTATTAAAAATGATAATCTGTATATCGTGTTCTCTT
 ATGAGTCCGAATTTGAAAAAGAAGAAGTTAACTTCGCTAAAACGGTTGGCCTGGACGTAACTTCA
 AACATGCCTTCTTTGTGACCTCTGAGAAAGATAACTGTCATCTCGACGGTTATATTAATCTCTACAA
 10 ATACTTATTGGAGCACGACGAGTTTACTAACCTTCTCACCGAAGATGAACGTAAAGATTATGAGGA
 GCTGAGTAAAGTCGTTACTTTCTGCCCGTTTGAAAATCAGTTACTGTTTGCGCGTTACAACAAGATG
 AGCAAATTCTGCAAGAAAGAACAGGTCCTGAGCAAACCTTCTCTATGCGCTGCAGAAAAAACTCAAA
 GACGAGAACCGCACGAAAGAATATATTTATGTCTCGTGCGTGAACAAATTACGTGCCAAATATGTG
 TCATATTTTATTCTGAAAGAAAAGTACTACGAGAAGCAGAAAGAATATGACATCGAAATGGGCTTTG
 15 TGGACGACTCAACGGAAAGCAAAGAATCAATGGATAAACGCCGTACTGAATATCCGTTTCGCAACA
 CGCCGGTAGCCAACGAACGTTGTGCCAACTGAATAACGTACAGCAGGACATCAACGGGTGCCTG
 AAGAACATCATCAACTACATTTATAAAATTTTCGAGCAGAACGGTTATAAAGTTGTGCCCCTCGAAA
 ACCTGGAAAATTCTAATTTTGAAAAAAAACAGGTGTTGCCGACGATTAAGTCTGCTGAAATATCA
 CAACTGGAGAACCAGAACGTGAATGATATCAAGGCCTCTGACAAAGTTAAAGAATATATTGAAAA
 20 CGGTTATTATGAACTCATGACCAACGAGAATAACGAAATCGTTGATGCAAAATATACAGAAAAGGG
 CGCAATGAAGGTGAAGAACGCCAATTTTTTTAACCTCATGATGAAAAGTTTGCAATTTGCCAGTGTG
 AAAGATGAGTTTGTGCTGCTGTCCAATAATGGCAAGACGCAGATTGCATTAGTGCCATCCGAGTTT
 ACATCTCAGATGGACAGCACCGATCACTGTCTGTACATGAAGAAGAACGACAAAGGTAACTGGT
 GAAAGCGGATAAAAAGGAAGTTCGTACAAAACAGGAACGTACATCAACGGCCTCAACGCCGATT
 25 TCAACGCAGCGAATAATATTAATATATCGTGGAATAAGTGTGGCGTGGTATTTTTTGCACTCG
 CCCGAAGAAAACAGAATATAACGTACCCAGTCTGGATACCACGAAAAAAGGTCCGTCTGCGATTCT
 CAACATGCTGAAGAAAATTGAAGCCATCAAGGTCCTGGAAACGGAAAAA

SEQ ID NO: 2

ATGATCAAGAGCATCCAGCTGAAGGTGAAGGGCGAGTGCCCCATCACCAAGGACGTGATC
 30 AACGAGTACAAGGAGTACTACAACAACCTGTTCTGATTGGATCAAGAACAATCTGACCAGCATCACA
 ATCGGCGAGATGGCCAAGTTTCTGCAGAGCCTGTCCGACAAGGAGGTGGCCTACATCTCTATGGG
 CCTGAGCGACGAGTGGAAGGATAAGCCTCTGTATCACCTGTTACCAAGAAGTACCACACAAAGA
 ATGCCGACAACCTGCTGTACTATTACATCAAGGAGAAGAACCTGGATGGCTACAAGGGCAATACC
 CTGAACATCTCCAATACATCTTTCAGGCAGTTTGGCTATTTCAAGCTGGTGGTGTCCAATTACAGGA
 35 CCAAGATCCGCACACTGAACTGCAAGATCAAGCGCAAGAAGATCGACGCCGATTCTACCAGCGAG
 GACATCGAGATGCAGGTCATGTATGAGATCATCAAGTACTCCCTGAACAAGAAGTCTGATTGGGAT
 AATTTTCATCTCTTATATCGAGAACGTGGAGAACCCCAATATCGATAACATCAATCGGTACAAGCTGC
 TGAGAGAGTGCTTTTGTGAGAACGAGAATATGATCAAGAACAAGCTGGAGCTGCTGAGCGTGGAG

CAGCTGAAGAAGTTCGGCGGCTGTATCATGAAGCCTCACATCAACAGCATGACCATCAATATCCAG
 GACTTTAAGATCGAGGAGAAGGAGAATTCCCTGGGCTTCATCCTGCACCTGCCACTGAACAAGAA
 GCAGTACCAGATCGAGCTGCTGGGCAATCGGCAGATCAAGAAGGGCACCAAGGAGATCCACGAG
 AACTGGTGGACATCACCAACACACACGGCGAGAACATCGTGTTTACAATCAAGAACGATAATCTG
 5 TACATCGTGTTTAGCTACGAGTCCGAGTTCGAGAAGGAGGAAGTGAATTTTGCCAAGACCGTGGG
 CCTGGACGTGAACCTCAAGCACGCCTTCTTTGTGACATCCGAGAAGGACAATTGCCACCTGGATG
 GCTATATCAACCTGTATAAGTACCTGCTGGAGCACGATGAGTTCACCAACCTGCTGACAGAGGAC
 GAGCGGAAGGATTACGAGGAGCTGTCTAAGGTGGTGACCTTTTGCCCTTCGAGAATCAGCTGCT
 GTTTGCCAGATATAACAAGATGAGCAAGTTCTGTAAGAAGGAGCAGGTGCTGTCCAAGCTGCTGTA
 10 CGCCCTGCAGAAGAAGCTGAAGGACGAGAACAGGACAAAGGAGTATATCTACGTGTCTTGCGTGA
 ATAAGCTGCGCGCCAAGTATGTGAGCTACTTTATCCTGAAGGAGAAGTATTACGAGAAGCAGAAG
 GAGTATGACATCGAGATGGGCTTCGTGGACGATTCTACCGAGAGCAAGGAGTCCATGGATAAGCG
 GAGAACCGAGTACCCCTTTAGGAACACACCTGTGGCCAATGAGCTGCTGAGCAAGCTGAACAATG
 TGCAGCAGGATATCAACGGCTGTCTGAAGAACATCATCAATTACATCTACAAGATCTTCGAGCAGA
 15 ACGGCTACAAGGTGGTGGCCCTGGAGAACCTGGAGAACTCCAATTCGAGAAGAAGCAGGTGCT
 GCCAACAATCAAGTCTCTGCTGAAGTATCACAAGCTGGAGAACCAGAATGTGAACGACATCAAGG
 CCAGCGATAAGGTGAAGGAGTACATCGAGAATGGCTATTACGAGCTGATGACCAACGAGAACAAT
 GAGATCGTGGACGCCAAGTATACAGAGAAGGGCGCCATGAAGGTGAAGAATGCCAACTTCTTTAA
 CCTGATGATGAAGAGCCTGCACTTTGCCTCCGTGAAGGATGAGTTCGTGCTGCTGTCCAACAATG
 20 GCAAGACCCAGATCGCCCTGGTGCCATCCGAGTTCACCTCTCAGATGGACAGCACAGATCACTGC
 CTGTACATGAAGAAGAATGACAAGGGCAAGCTGGTGAAGGCCGATAAGAAGGAGGTGAGGACAA
 AGCAGGAGCGCCACATCAACGGCCTGAATGCCGACTTTAACGCCGCCAACAATATCAAGTATATC
 GTGGAGAATGAAGTGTGGCGGGGCATCTTCTGTACCAGACCAAAGAAGACAGAGTACAACGTGCC
 CTCCCTGGATAACCACAAAGAAGGGCCCCTCTGCCATCCTGAATATGCTGAAGAAGATCGAGGCCA
 25 TCAAGGTGCTGGAGACCGAGAAG

SEQ ID NO: 3

MIKSIQLKVKGECPITKDVINEYKEYYNCSWDIKNNLTSITIGEMAKFLQSLSDKEVAYISMGLS
 DEWKDKPLYHLFTKKYHTKNADNLLYYYIKEKNLDGYKGNTLNISNTSFRQFGYFKLVVSNYRTKIRTLN
 CKIKRKKIDADSTSEDIEMQVMYEIIKYSLNKSDWDNFISYIENVENPNIDNINRYKLLRECFENENMIK
 30 NKLELLSVEQLKKFGGCIMKPHINSMTINIQDFKIEEKENSLGFILHLPLNKKQYQIELLGNRQIKKGTKEI
 HETLVDITNTHGENIVFTIKNDNLYIVFSYESEFEKEEVNFAKTVGLDVNFKHAFFVTSEKDNCHLDGYIN
 LYKYLLEHDEFTNLLTDERKDYEELSKVVTFPCFENQLLFARYNKMSKFCCKEQVLSKLLYALQKKLK
 DENRTKEYIYVSCVNKLRAKYVSFILKEKYEKQKEYDIEMGFVDDSTESKESMDKRRTEYPFRNTPV
 ANELLSKLNNVQQDINGCLKNIINYIKIFEQNGYKVVALENLENSNFEKKQVLPTIKSLLKYHKLENQNV
 35 NDIKASDKVKEYIENGYYELMTNENNEIVDAKYTEKGAMKVKNANFFNLMMKSLHFASVKDEFVLLSNN
 GKTQIALVPSEFTSQMDSTDHCLYMKNNDKGKLVKADKKEVRTKQERHINGLNADFNAANNIKYIVENE
 VWRGIFCTRPKKTEYNVPSLDTTKKGPSAILNMLKKIEAIKVLETEK

SEQ ID NO: 21

5 10 15 20 25 30 35	ATGATTAAATCCATCCAGCTTAAAGTGAAAGGCGAATGCCCCATCACCAAAGATGTTATTAA CGAGTACAAGGAATACTATAATAACTGCAGCGATTGGATAAAAAACAATCTTACCTCGATCACTATT GGCGAGATGGCCAAGTTCCTGCAGAGCCTGTCTGATAAGGAGGTTGCTTACATTTCCATGGGCCT GAGCGACGAGTGGAAGACAAGCCCTTGTAACACCTGTTCACTAAGAAATACCACACTAAGAATG CTGACAATCTGCTCTACTACTACATCAAGGAGAAAACTTGGATGGCTACAAGGGGAACACGCTTA ACATTTCTAACACCTCATTTTCGTCAGTTCGGGTATTTCAAGCTCGTGGTGTCCAATATCGCACTAA GATTTCGGACACTCAACTGCAAGATTAAACGAAAGAAGATCGACGCAGATTCTACGAGCGAGGATAT TGAAATGCAGGTCATGTATGAAATCATCAAGTACTCTCTGAATAAGAAGTCTGACTGGGACAATTTT ATCAGCTACATCGAAAACGTAGAGAACCCTAACATAGACAATATCAACAGGTACAACTGCTTAGG GAATGCTTCTGTGAAAACGAGAATATGATAAAAAACAAGCTGGAGCTGCTGAGCGTGGAGCAATTA AAGAAGTTTGGAGGGTGTATCATGAAACCCACATTAAGTTCGATGACAATTAATATTCAAGACTTCA AGATAGAGGAGAAAGAAAACAGCTTGGGCTTTATTCTCCATCTCCCTCTGAATAAAAAACAGTACC AGATCGAGCTATTGGGAAATAGACAGATTAAGAAAGGGACCAAGGAAATTCACGAACTCTCGTCG ATATCACAAACACCCATGGAGAGAACATCGTGTTACAATCAAGAACGATAATCTGTACATAGTGTT TAGTTATGAGAGCGAGTTCGAGAAGGAAGAGGTCAACTTTGCCAAGACTGTTGGGCTTGACGTCA ATTTCAAACACGCGTTCTTCGTGACAAGCGAAAAGGACAAGTCCATCTCGATGGCTACATTAACC TATATAAGTATTTGCTCGAACACGACGAGTTTACAAACCTGCTGACAGAAGATGAGAGAAAGGACT ACGAAGAAGTCAAGTAAAGTTCGTTACGTTCTGTCCATTTGAAAATCAGCTGCTATTGCCCCGGTACA ATAAAATGTCCAAATTCTGTAAGAAGGAACAGGTATTGTCTAACTGCTGTATGCCCTGCAGAAAAA GTTGAAAGATGAGAATCGGACCAAAGAGTATATCTATGTCTCATGCGTGAACAAGCTAAGAGCTAA GTATGTTTCCTATTTTCACTGAAGGAGAAGTACTATGAGAAGCAAAGGAGTACGACATTGAGAT GGGCTTCGTGATGACTCAACCGAATCTAAAGAATCCATGGACAAAAGGCGCACAGAGTATCCATT TAGAAATACACCGGTGGCTAACGAACTCCTGAGTAACTCAACAATGTTCAACAAGATATCAACGG TTGTCTGAAGAATATAATTAATTATATCTATAAGATTTTTGAACAGAATGGCTACAAGGTGGTCGCA CTGGAAAAGTTAGAGAATTCCAAGTTTGGAGAAAAGCAGGTGCTTCCTACAATCAAATCACTTCTGA AGTACCACAACTTGAGAATCAGAACGTAAATGATATCAAAGCCAGTGATAAAGTCAAAGAATACAT CGAGAATGGTTATTATGAACTGATGACTAATGAAAATAATGAAATAGTGGACGCAAAATATACGGAA AAGGGTGCCATGAAGGTAAAGAACGCAAACTTTTTTAATTTGATGATGAAGTCACTGCACTTTGCTT CTGTGAAGGATGAGTTTGTCTGCTGAGCAACAACGGAAAGACACAGATTGCGCTAGTGCCTTCA GAGTTCACTAGTCAGATGGACAGTACCGACCATTGCCTCTACATGAAAAAAATGACAAAGGGAAA CTCGTGAAGGCTGACAAGAAAGAGGTGCGGACCAAGCAAGAGCGCCATATCAATGGATTAAACGC CGATTTTAACGCGGCAAATAACATCAAATACATCGTTGAAAATGAGGTGTGGAGGGGTATCTTCTG TACCCGACCAAAGAAGACTGAGTACAACGTACCATCCTTAGACACCACCAAAAAAGGACCCTCCG CCATTCTGAATATGTTAAAGAAAATCGAGGCCATAAAAGTGTTGGAGACCGAGAAG
	SEQ ID NO: 22 ATGATCAAGAGCATTGAGCTGAAGGTGAAGGGCGAGTGCCCCATCACCAAGGACGTGATC AACGAGTACAAGGAGTACTACAACAACTGCAGCGACTGGATTAAAAACAATCTCACAAGCATCACC ATCGGCGAGATGGCCAAGTTCCTGCAGAGCCTGAGCGACAAAGAGGTGGCCTACATCAGCATGG

GCCTGAGCGACGAGTGGAAGGACAAGCCCCTGTACCACCTGTTACCAAGAAGTACCACACCAAG
 AACGCCGACAACCTGCTGTACTACTACATCAAGGAGAAGAATCTGGATGGCTACAAGGGCAATAC
 CCTGAACATCAGCAACACCAGCTTCAGACAGTTCGGCTACTTCAAGCTGGTGGTGAGCAACTACA
 GAACCAAGATCAGAACCCTGAACTGCAAGATCAAGAGAAAGAAGATCGACGCCGACAGCACAAGC
 5 GAGGACATAGAGATGCAAGTTATGTACGAGATCATCAAGTACAGCCTTAATAAAAAGAGCGACTGG
 GACAACTTCATCAGCTACATAGAAAACGTGGAGAACCCCAACATCGACAACATCAACAGATACAAG
 CTGCTGAGAGAGTGCTTCTGCGAGAACGAGAACATGATCAAAAACAAACTCGAACTGCTGAGTGT
 AGAACAGCTGAAGAAGTTCGGCGGGCTGCATCATGAAGCCCCACATCAACAGCATGACCATCAACA
 TCCAAGACTTCAAGATCGAGGAGAAGGAGAACAGCCTGGGCTTCATCCTGCACCTGCCCTTAAC
 10 AAGAAGCAGTATCAGATCGAGCTGCTGGGCAACAGACAGATCAAGAAGGGCACCAAGGAGATCCA
 CGAGACCCTGGTGGACATCACCAACACCCACGGCGAGAATATCGTTTTCACTATCAAGAACGACA
 ACCTGTACATCGTGTTTAGCTATGAGAGCGAGTTCGAGAAGGAAGAGGTGAACTTCGCCAAGACC
 GTGGGCCTGGACGTGAACTTCAAGCACGCCTTCTTCGTGACAAGCGAGAAGGACAACCTGCCACCT
 GGACGGCTACATCAATCTGTACAAGTACCTGCTGGAGCACGACGAGTTCACCAACCTGCTGACCG
 15 AGGACGAGAGAAAGGACTACGAGGAGCTGAGCAAGGTGGTGACCTTCTGCCCCTTCGAGAATCA
 GCTGCTGTTTCGCTAGATACAACAAGATGAGCAAGTTCTGCAAGAAGGAGCAAGTGCTGAGCAAAC
 TGCTGTACGCCCTGCAGAAGAAGCTGAAGGACGAGAACAGAACCAAGGAGTATATCTACGTGAGC
 TCGCTGAACAAGCTGAGAGCCAAGTACGTGAGCTACTTCATCCTGAAGGAGAAGTACTACGAGAA
 GCAGAAGGAGTACGACATCGAGATGGGTTTTGTGGACGACAGCACCGAGAGCAAGGAGAGCATG
 20 GACAAGAGAAGAACCGAGTACCCCTTCAGAAACACCCCCGTGGCCAACGAATTACTGTCTAACT
 GAATAACGTGCAGCAAGACATCAACGGCTGCCTGAAGAACATAATCAACTACATCTACAAGATCTT
 CGAGCAGAACGGCTACAAGGTGGTAGCCCTGGAGAACCTGGAGAACAGCAACTTCGAGAAGAAG
 CAAGTGCTGCCCACCATCAAGAGCCTGCTGAAGTACCACAAGCTGGAGAATCAGAACGTGAACGA
 CATCAAGGCTAGCGACAAGGTGAAGGAGTACATCGAGAACGGATACTACGAGCTGATGACCAACG
 25 AGAACAACGAGATCGTGGACGCCAAGTACACCGAGAAGGGCGCCATGAAGGTGAAGAACGCCAA
 CTTCTTCAACCTGATGATGAAGAGCCTGCACTTCGCTAGCGTGAAGGACGAGTTCGTGCTGCTGT
 CGAACAACGGCAAGACACAGATCGCCCTGGTGCCTAGCGAGTTCACATCTCAGATGGACAGCACC
 GACCACTGCCTGTACATGAAGAAGAACGACAAGGGCAAGCTGGTGAAGGCCGACAAGAAAGAGG
 TGAGAACCAAGCAAGAGAGACACATCAACGGCCTGAACGCCGACTTCAACGCCGCCAACAACATC
 30 AAGTACATCGTGGAGAACGAGGTGTGGAGAGGCATCTTCTGCACAAGACCCAAGAAGACCGAGTA
 CAACGTGCCTAGCCTGGACACCACCAAGAAGGGCCCTAGCGCCATCCTGAACATGCTGAAGAAGA
 TCGAGGCCATCAAGGTGCTGGAGACCGAGAAG

SEQ ID NO: 23

ATGATCAAGAGCATCCAGCTGAAGGTGAAGGGCGAGTGCCCCATCACCAAGGACGTGATC
 35 AACGAGTACAAGGAGTACTACAACAACCTGCAGCGACTGGATCAAGAACAACCTGACCAGCATCAC
 CATCGGCGAGATGGCCAAGTTCTTCGAGAGCCTGAGCGACAAGGAGGTGGCCTACATCAGCATG
 GGCCTGAGCGACGAGTGGAAGGACAAGCCCCTGTACCACCTGTTACCAAGAAGTACCACACCAA
 GAACGCCGACAACCTGCTGTACTACTACATCAAGGAGAAGAACCTGGACGGCTACAAGGGCAACA

CCCTGAACATCAGCAACACCAGCTTCCGGCAGTTCGGCTACTTCAAGCTGGTGGTGAGCAACTAC
 CGGACCAAGATCCGGACCCTGAACTGCAAGATCAAGCGGAAGAAGATCGACGCCGACAGCACCA
 GCGAGGACATCGAGATGCAGGTGATGTACGAGATCATCAAGTACAGCCTGAACAAGAAGAGCGAC
 TGGGACAACCTTCATCAGCTACATCGAGAACGTGGAGAACCCCAACATCGACAACATCAACCGGTA
 5 CAAGCTGCTGCGGGAGTGCTTCTGCGAGAACGAGAACATGATCAAGAACAAGCTGGAGCTGCTGA
 GCGTGGAGCAGCTGAAGAAGTTCGGCGGCTGCATCATGAAGCCCCACATCAACAGCATGACCATC
 AACATCCAGGACTTCAAGATCGAGGAGAAGGAGAACAGCCTGGGCTTCATCCTGCACCTGCCCCCT
 GAACAAGAAGCAGTACCAGATCGAGCTGCTGGGCAACCGGCAGATCAAGAAGGGCACCAAGGAG
 ATCCACGAGACCCTGGTGGACATCACCAACACCCACGGCGAGAACATCGTGTTACCATCAAGAA
 10 CGACAACCTGTACATCGTGTTACAGCTACGAGAGCGAGTTCGAGAAGGAGGAGGTGAACTTCGCCA
 AGACCGTGGGCCTGGACGTGAACTTCAAGCACGCCTTCTTCGTGACCAGCGAGAAGGACAACCTG
 CCACCTGGACGGCTACATCAACCTGTACAAGTACCTGCTGGAGCACGACGAGTTCACCAACCTGC
 TGACCGAGGACGAGCGGAAGGACTACGAGGAGCTGAGCAAGGTGGTGACCTTCTGCCCTTCGA
 GAACCAGCTGCTGTTCCGCCGTACAACAAGATGAGCAAGTTCTGCAAGAAGGAGCAGGTGCTGA
 15 GCAAGCTGCTGTACGCCCTGCAGAAGAAGCTGAAGGACGAGAACCGGACCAAGGAGTACATCTA
 CGTGAGCTGCGTGAACAAGCTGCGGGCCAAGTACGTGAGCTACTTCATCCTGAAGGAGAAGTACT
 ACGAGAAGCAGAAGGAGTACGACATCGAGATGGGCTTCGTGGACGACAGCACCGAGAGCAAGGA
 GAGCATGGACAAGCGGCGGACCGAGTACCCCTTCCGGAACACCCCCGTGGCCAACGAGCTGCTG
 AGCAAGCTGAACAACGTGCAGCAGGACATCAACGGCTGCCTGAAGAACATCATCAACTACATCTA
 20 CAAGATCTTCGAGCAGAACGGCTACAAGGTGGTGGCCCTGGAGAACCTGGAGAACAGCAACTTC
 GAGAAGAAGCAGGTGCTGCCCACCATCAAGAGCCTGCTGAAGTACCACAAGCTGGAGAACCAGA
 ACGTGAACGACATCAAGGCCAGCGACAAGGTGAAGGAGTACATCGAGAACGGCTACTACGAGCT
 GATGACCAACGAGAACAACGAGATCGTGACGCCAAGTACACCGAGAAGGGCGCCATGAAGGTG
 AAGAACGCCAACTTCTTCAACCTGATGATGAAGAGCCTGCACTTCGCCAGCGTGAAGGACGAGTT
 25 CGTGCTGCTGAGCAACAACGGCAAGACCCAGATCGCCCTGGTGCCAGCGAGTTCACCAGCCAG
 ATGGACAGCACCGACCACTGCCTGTACATGAAGAAGAACGACAAGGGCAAGCTGGTGAAGGCCG
 ACAAGAAGGAGGTGCGGACCAAGCAGGAGCGGCACATCAACGGCCTGAACGCCGACTTCAACGC
 CGCCAACAACATCAAGTACATCGTGAGAACGAGGTGTGGCGGGGCATCTTCTGCACCCGGCCC
 AAGAAGACCGAGTACAACGTGCCAGCCTGGACACCACCAAGAAGGGCCCCAGCGCCATCCTGA
 30 ACATGCTGAAGAAGATCGAGGCCATCAAGGTGCTGGAGACCGAGAAG

SEQ ID NO: 24

ATGATTAAAAGTATACAGCTTAAGGTCAAGGGCGAGTGCCCGATTACCAAAGATGTAATTA
 ACGAGTACAAGGAGTATTACAATAACTGTTCTGACTGGATCAAGAACAATCTGACTTCAATTACGAT
 CGGTGAAATGGCCAAATTTCTCCAGTCCTTGAGTGATAAGGAGGTGCGATATATATCCATGGGACT
 35 CAGTGACGAGTGGAAGGACAAACCCCTGTACCATCTTTTTACTAAAAAATACCATACGAAAAACGC
 AGACAACCTGCTGTACTACTATATAAAAGAAAAAACCTGGACGGTTACAAGGGCAACACCCTCAA
 TATTAGCAACACTAGTTTCCGACAATTCGGGTACTTCAAGCTGGTCGTGAGCAACTATCGGACCAA
 AATCAGGACTTTGAATTGTAAGATAAAGAGAAAGAAGATAGACGCAGATTCTACTAGTGAGGATAT

CGAGATGCAGGTAATGTACGAGATCATTAAGTATTCACTGAACAAGAAGAGCGATTGGGATAACTT
 CATATCATACATCGAAAACGTTGAAAATCCAAACATCGACAATATTAATAGATACAAACTGTTGAGA
 GAATGCTTCTGCGAAAACGAAAATATGATAAAAAACAACTCGAATTGTTGTCAGTTGAACAGCTGA
 AGAAATTCGGAGGGTGCATAATGAAGCCTCACATAAACTCAATGACAATAACATCCAAGACTTCA
 5 AGATAGAAGAGAAGGAGAACAGTTTGGGTTTTATTCTTCACCTGCCTTTGAACAAGAAGCAATACC
 AAATCGAGCTGCTCGGAAATAGGCAGATAAAAAAGGGGACAAAAGAAATACACGAAACCCTTGTTG
 ACATTACGAACACACACGGGGAAAATATCGTGTTACAATTAATAATGACAACCTTTACATTGTATT
 TTCTTATGAATCAGAGTTCGAAAAGGAAGAAGTGAACCTTTGCCAAGACCGTTGGTTTGGACGTCAA
 CTTTAAACACGCCTTCTTCGTTACATCAGAAAAGGATAACTGTCATCTTGATGGATACATAAACCTC
 10 TACAAGTATCTTCTTGAACACGACGAATTCACAAACCTGCTTACTGAAGACGAGCGAAAGGATTAC
 GAGGAGTTGTCAAAGGTAGTCACATTCTGTCCATTGCGAAAATCAGCTGTTGTTTGCCAGGTACAAT
 AAGATGTCTAAATTCTGTAAAAAGAACAAGTCCTCAGCAAACCTGCTGTATGCACTGCAAAAGAAAC
 TTAAGGACGAAAATAGGACTAAGGAGTATATATACGTTTCATGCGTTAATAAACTCCGGGCGAAAT
 ATGTGAGTTATTTTATTCTGAAGGAGAAGTATTATGAGAAGCAGAAAGAGTACGACATAGAAATGG
 15 GATTTGTGGATGACAGTACGGAGAGCAAAGAAAGCATGGACAAAAGAAGGACCGAATATCCATTT
 CGAAATACTCCAGTCGCGAATGAGCTGCTGAGCAAACCTTAACAATGTCCAGCAGGACATTAACGGT
 TGCCTGAAGAACATAATCAACTACATATATAAGATATTTGAGCAAAACGGATACAAAGTGGTTGCAC
 TTGAAAACCTCGAGAATTCAAATTTGCGAAAAGAAGCAAGTTTTGCCACGATTAAAAGTCTCTTGAA
 ATACCATAAGCTCGAAAATCAGAATGTGAACGATATCAAGGCCTCAGATAAGGTCAAGGAGTACAT
 20 CGAAAATGGATATTACGAGCTGATGACGAACGAGAATAACGAAATCGTCGATGCGAAGTACACAG
 AAAAGGGGGCTATGAAGGTGAAAAACGCCAATTTTTTTAATTTGATGATGAAGTCCTTGCAATTCGC
 CTCAGTCAAAGATGAGTTTGTCTCCTGAGTAATAATGGGAAAACACAGATAGCCTTGGTTCCTTCA
 GAGTTCACGTCTCAGATGGACTCAACTGATCATTGTCTTTATATGAAGAAAAATGATAAAGGGAAAC
 TGGTCAAGGCCGATAAGAAAGAGGGTGCGCACGAAACAAGAAAGACACATCAACGGCCTCAACGCC
 25 GATTTTAACGCAGCTAACAATATTAATATATCGTAGAGAATGAGGTCTGGAGGGGCATTTTTTGCA
 CCCGACCCAAGAAGACTGAATACAATGTCCCTAGTCTCGATACGACCAAAAAGGGGCCATCAGCT
 ATACTGAATATGTTGAAAAGATTGAGGCGATTAAAGTCCTGGAAACCGAGAAA

SEQ ID NO: 25

ATGATCAAGAGCATCCAGCTGAAGGTGAAGGGAGAATGTCCTATCACAAAGGACGTGATC
 30 AACGAGTACAAGGAGTACTACAACAACTGCAGCGATTGGATCAAGAACAACCTGACCAGCATCAC
 CATCGGCGAGATGGCCAAGTTCCTGCAGTCTCTGTCCGATAAGGAAGTCGCCTACATCAGCATGG
 GCTTGAGCGACGAATGGAAGGACAAACCCCTGTACCATCTGTTCACTAAGAAGTACCACACCAAG
 AACGCCGATAACCTGCTGTACTACTACATCAAGGAAAAGAACCTGGACGGCTACAAGGGCAATAC
 CCTGAACATCAGTAACACCAGCTTCCGGCAGTTTGGCTATTTTAACTGGTGGTCAGCAACTACAG
 35 AACCAAGATCAGAACACTGAACTGCAAGATCAAGAGGAAGAAAATCGACGCCGACTCCACCAGCG
 AAGATATAGAGATGCAGGTGATGTACGAGATCATTAAGTACTCCCTGAATAAGAAGTCTGACTGGG
 ACAACTTCATCAGCTACATCGAGAACGTGGAAAACCCCAACATTGACAATATCAACAGATACAAGC
 TGCTGCGGGAATGCTTCTGCGAGAATGAAAACATGATCAAGAACAAGCTGGAGCTTCTGAGCGTG

GAGCAGCTGAAGAAATTCGGCGGATGTATCATGAAGCCACACATCAATAGCATGACCATCAACATC
 CAGGACTTCAAAATTGAAGAAAAGGAGAATAGCCTAGGCTTCATCCTGCACCTGCCTCTGAACAAG
 AAACAGTACCAGATCGAGCTGCTGGGCAACCGGCAAATCAAGAAGGGCACCAAGGAGATCCACG
 AGACACTGGTCGACATCACAAACACACACGGCGAAAACATCGTGTTACCATCAAGAACGACAAC
 5 CTGTACATCGTGTTACAGCTACGAGTCTGAATTCGAGAAGGAAGAGGTCAACTTCGCTAAGACAGTG
 GGCCTGGACGTGAACTTCAAGCACGCCTTCTTCGTGACCAGCGAGAAAGACAACCTGTCACCTGGA
 CGGGTACATCAACCTGTACAAGTACCTGCTGGAACACGACGAGTTCACCAACCTCCTGACCGAAG
 ATGAACGGAAGGATTACGAGGAGCTGTCTAAGGTGGTGACATTCTGCCCTTTCGAGAACCAGCTG
 CTCTTCGCCAGATATAACAAGATGAGCAAGTTTTGTAAAAAGGAGCAGGTGCTCAGCAAGCTACTG
 10 TACGCCCTGCAGAAGAAGCTGAAGGACGAGAACAGAACCAAGGAATACATCTACGTGAGCTGCGT
 GAACAAGCTGAGAGCCAAGTACGTGTCCTATTTTCATCCTGAAGGAAAAATACTACGAGAAACAGAA
 AGAGTACGACATCGAGATGGGATTTGTGGACGACAGCACCGAAAGCAAGGAATCTATGGACAAGC
 GCAGAACCGAGTATCCATTTAGAAACACCCCTGTGGCCAATGAGCTGCTGTCCAACTGAACAAC
 GTGCAGCAGGATATCAATGGCTGCCTGAAAAACATCATCAACTACATTTACAAGATCTTTGAGCAA
 15 AACGGCTACAAAGTGGTGGCCCTGGAGAACCTGGAAAACTCCAACCTTCGAGAAGAAGCAAGTGCT
 GCCCACAATCAAGAGCCTGCTGAAGTACCATAAGCTGGAAAAATCAGAATGTGAACGACATAAAGG
 CCTCTGATAAGGTGAAGGAATACATCGAAAATGGCTATTACGAGCTGATGACCAACGAAAATAACG
 AGATTGTGGACGCTAAATACACCGAGAAGGGCGCTATGAAAGTGAAAAACGCTAACTTTTTTAACC
 TGATGATGAAGAGCCTGCACTTCGCCAGCGTGAAGGACGAGTTCGTGCTGCTGAGCAACAACGG
 20 CAAGACACAGATCGCCCTGGTGCCAGCGAGTTCACCAGTCAGATGGATTCTACAGATCACTGCC
 TGTACATGAAAAAGAATGATAAGGGAAAGTTAGTGAAAGCCGATAAGAAGGAGGTGCGGACCAAA
 CAGGAGAGACACATCAACGGCCTGAACGCTGACTTCAACGCCGCCAACACATCAAATACATCGT
 TGAGAATGAGGTGTGGCGGGGCATCTTCTGCACCAGACCTAAGAAAACAGAGTATAATGTGCCTA
 GCCTGGACACCACCAAGAAGGGTCCTAGCGCCATCCTGAACATGCTGAAGAAGATCGAGGCCATC
 25 AAGGTTCTGGAAACCGAGAAG

SEQ ID NO: 26

ATGATCAAATCAATTCAGCTTAAGGTGAAGGGCGAGTGTCCTTACTAAAGACGTCATTA
 ACGAATACAAGGAGTATTACAATAACTGTAGCGACTGGATCAAGAACAATTTGACATCTATCACAAT
 TGGGGAGATGGCCAAATTTTTGCAGAGCCTTAGCGACAAAGAGGTGCGCTACATCTCTATGGGGC
 30 TCTCCGACGAGTGGAAGGACAAGCCGTTGTACCACCTGTTACAAAAAAGTATCACACAAAGAATG
 CAGACAATTTGCTGTACTACTACATTAAGGAGAAAAACCTTGATGGCTATAAAGGAAACACCTCAA
 CATCTCTAACACCTCTTTTAGACAGTTCGGCTACTTTAAGCTGGTGGTGAGCAACTATAGAACCAA
 GATTAGGACTCTGAATTGTAAGATCAAAAGGAAGAAAATCGACGCTGATTCTACCTCTGAAGATATT
 GAGATGCAAGTCATGTATGAGATCATCAAGTATTCACTGAACAAGAAGAGTGATTGGGACAACCTTT
 35 ATTCCTACATAGAGAACGTGGAGAATCCCAATATCGATAATATAAACCGATATAAGTTGCTGCGG
 GAGTGCTTTTGTGAAAATGAGAACATGATTA AAAACAAGTTGGAACCTTTGTGAGTAGAACAGCTTA
 AAAAGTTCGGCGGCTGCATCATGAAGCCTCATATCAACAGCATGACAATTAATATCCAAGATTTTAA
 GATCGAGGAGAAGGAAAACAGTTTGGGGTTTATTTTGCACCTTCCACTCAATAAGAAACAGTACCA

5	GATCGAGCTTCTGGGGAATCGGCAGATTAAGAAAGGGACCAAAGAGATACATGAAACTCTGGTTG ATATCACAAATACCCATGGCGAAAATATTGTCTTTACCATCAAGAATGACAACCTGTATATCGTGTT TTCTTATGAGTCCGAATTCGAGAAGGAAGAGGTGAACTTTGCCAAGACAGTGGGGTTGGATGTCA ATTTTAAGCATGCCTTCTTTGTTACCTCTGAAAAAGATAACTGCCATCTGGATGGATACATCAATCT CTATAAGTATCTGCTTGAGCACGATGAGTTCACAAATCTGCTGACCGAGGACGAGAGAAAGGACTA CGAAGAATTGTCCAAGGTGGTTACTTTCTGCCCATTGCGAAAATCAGCTGCTGTTTCGAAGATACAA CAAAATGTCTAAATTCTGTAAAAAGAGCAGGTCTGTCTAACTTCTGTATGCTCTGCAGAAAAAA CTCAAAGACGAAAACCGCACAAAAGAGTACATTTACGTAAGCTGCGTCAATAAATTGAGGGCCAAG TATGTTTTCTTATTTTCATCCTTAAAGAGAAATACTACGAGAAGCAGAAGGAGTACGACATAGAGATGG GGTTTGTAGACGATTCTACGGAGTCTAAGGAATCTATGGACAAACGGCGCACAGAGTACCCCTTTA GGAATACCCCTGTCGCTAATGAGTTGCTCTCTAAGCTGAACAATGTCCAACAGGATATTAATGGCT GCTTGAAGAACATAATAAATTATATTTATAAAATCTTTGAGCAGAACGGCTACAAAGTTGTTGCTCT GGAGAACCTTGAGAACAGCAACTTTGAAAAGAAGCAGGTACTGCCTACTATTAAGTCTCTGCTGAA ATATCATAAGCTGGAAAACCAAAATGTCAACGACATCAAGGCCTCCGACAAAGTGAAAGAGTACAT CGAGAACGGATACTACGAGCTGATGACTAATGAGAATAACGAGATTGTGACGCGAAATATACCG AAAAGGGCGCTATGAAGGTGAAGAATGCTAATTTCTTCAACTTGATGATGAAGAGCCTCCATTTTG CTTCTGTGAAGGATGAGTTTGTGCTGTTGAGTAACAACGGGAAGACCCAGATCGCACTGGTCCCG TCCGAGTTTACCTCCCAGATGGACTCTACAGATCACTGCTTGTACATGAAGAAAAACGATAAAGGT AAGTTGGTGAAAGCAGATAAGAAAGAGGTGCGAACAAAGCAGGAGAGACATATCAACGGACTGAA CGCAGATTTTAAACGCTGCTAATAATATTAATATATTGTTGAGAACGAAGTGTGGCGGGGAATTTTC TGCACCAGACCGAAAAAAACAGAATATAATGTCCCGTCCCTCGACACTACTAAAAAGGCCCTTCT GCGATCCTGAACATGCTTAAAAAGATTGAAGCGATCAAGGTGTTGGAGACTGAGAAG
25	SEQ ID NO: 27 ATGATCAAGAGCATTTCAGCTGAAAGTGAAGGGCGAGTGTCCCATCACTAAGGACGTTATC AACGAGTACAAGGAGTACTATAACAACCTGCTCTGACTGGATTAAGAATAACCTGACCAGTATCACC ATCGGCGAGATGGCCAAGTTCCTGCAGAGCCTGAGCGACAAGGAGGTGGCCTACATCAGTATGG GGCTGTCCGATGAGTGGAAGACAAGCCACTGTATCATCTGTTACCAAAAAGTACCACACCAAAA ATGCCGATAACCTGCTGTACTATTATATCAAAGAAAAAAACCTGGACGGGTACAAAGGCAACACCC TGAACATCAGCAATACAAGTTTCCGCCAGTTTGGATACTTCAAGCTGGTTCGTGTCAAATTACAGAA CCAAAATCAGAACCCCTGAACTGCAAGATCAAAAGGAAGAAGATCGACGCTGACAGCACCAGCGAG GACATTGAGATGCAGGTGATGTACGAGATTATTAATACTCCCTGAACAAGAAGAGTGATTGGGAC AATTTTCATTTCTACATCGAGAATGTGGAGAACCCTAACATCGATAACATAAATCGGTACAACTGC TGAGAGAGTGCTTTTTCGAGAACGAAAATATGATAAAGAACAAGCTGGAGCTGCTCAGCGTGGA CAGCTGAAAAAATTTGGAGGCTGCATTATGAAGCCCCACATCAACTCAATGACTATCAATATCCAG GACTTCAAGATCGAAGAGAAGGAGAACTCCCTGGGCTTCATTCTGCATCTGCCACTGAATAAGAAG CAGTATCAGATCGAACTGCTGGGAAATAGGCAGATCAAGAAGGGGACCAAGAGATCCACGAAAC TCTGGTGGACATTACTAATACTCACGGGGAGAACATTGTGTTACCATTAAGAACGATAATCTGTA CATCGTGTTTCAGCTATGAAAGCGAGTTTGAAGGAAGAGGTGAACTTCGCCAAGACCGTCGGGC

5

10

15

20

```

TGGATGTGAATTTTAAGCACGCCTTCTTTGTGACCAGCGAAAAGGATAACTGCCACCTGGACGGAT
ACATCAATCTGTACAAGTATCTGCTGGAGCACGACGAATTTACCAATCTGCTGACCGAGGACGAGA
GGAAGGACTACGAAGAGCTCTCCAAGGTGGTGACATTTTGTCCATTCGAGAACCAGCTGCTGTTC
GCCAGATACAACAAGATGTCTAAATTTTGCAAAAAGAAGAGGTCCTGAGCAAGCTGCTGTACGCC
CTGCAGAAGAACTGAAGGACGAGAACAGAACTAAGGAGTACATCTATGTGAGCTGTGTGAATAAA
CTGAGAGCAAAATACGTGTCTTACTTTATTCTGAAGGAGAAGTATTACGAGAAGCAGAAGGAATAC
GACATCGAGATGGGCTTCGTGGACGATTCCACAGAGAGCAAGGAAAGCATGGATAAAAGGCGCA
CTGAATACCCCTTCAGAAACACACCTGTGGCCAATGAGCTGCTGTCCAAGCTGAACAACGTGCAG
CAGGACATCAACGGCTGCCTGAAGAACATCATCAACTACATTTATAAGATCTTCGAGCAGAATGGC
TACAAAGTGGTGGCACTGGAGAACCTGGAGAACTCCAATTTTGAAAAGAAACAGGTGCTGCCCAC
CATTAAGAGCCTGCTTAAATACCATAAGCTGGAGAACGAGAACGTGAATGATATCAAAGCCAGCGA
TAAGGTCAAAGAGTACATCGAGAACGGATATTATGAGCTGATGACCAACGAGAACAAATGAGATCGT
GGACGCCAAATATACCGAGAAGGGCGCCATGAAGGTGAAGAACGCCAACTTCTTTAACCTGATGA
TGAAGTCCCTTCACTTTGCCTCCGTGAAGGATGAGTTCGTGCTGCTGAGCAACAACGGCAAGACC
CAGATCGCCCTGGTGCCCTCTGAATTCACCAGCCAGATGGATTCAACCGACCACTGTCTCTACATG
AAGAAGAACGACAAGGGCAAGCTGGTGAAGGCCGACAAGAAAGAGGTGCGCACAAAGCAGGAGC
GGCACATCAATGGCCTGAACGCTGATTTCAACGCCGCAAACAACATTAAGTACATCGTGGAGAATG
AGGTGTGGAGAGGTATTTTCTGCACCCGCCCAAGAAGACCGAGTATAATGTGCCCTCTCTGGAC
ACCACCAAAAAAGGCCCAAGCGCTATCCTGAATATGTTGAAGAAAATCGAGGCCATCAAGGTGCT
GGAAACCGAGAAG

```

25

30

35

Una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido precursor descrito en el presente documento puede ser sustancialmente idéntico a una secuencia de ácido nucleico de referencia, por ejemplo., SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, o SEQ ID NO: 27. En algunas realizaciones, el polipéptido variante está codificado por un ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 % o al menos aproximadamente un 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de referencia, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido precursor, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26 o la SEQ ID NO: 27. El porcentaje de identidad entre dos de dichos ácidos nucleicos puede determinarse manualmente mediante inspección de las dos secuencias de ácido nucleico alineadas de manera óptima o usando programas de software o algoritmos (por ejemplo, BLAST, ALIGN, CLUSTAL) usando parámetros convencionales. Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son

sustancialmente idénticas es que las moléculas de ácido nucleico se hibridan con la secuencia complementaria de la otra en condiciones rigurosas (por ejemplo, dentro de un intervalo de rigurosidad media a alta).

En algunas realizaciones, el polipéptido variante está codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 % o más de identidad de secuencia, pero no un 100 % de identidad de secuencia, con una secuencia de ácido nucleico de referencia, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido precursor, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 25, la SEQ ID NO: 26 o la SEQ ID NO: 27.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante de la presente invención comprende una secuencia polipeptídica que tiene un 50 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, o un 99 %, pero no un 100 %, de identidad con la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante de la presente invención comprende una secuencia polipeptídica que tiene más de un 50 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, o un 99 %, pero no un 100 %, de identidad con la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, la presente invención describe un polipéptido variante que tiene un grado especificado de identidad de secuencia de aminoácidos con uno o más polipéptidos de referencia, por ejemplo, un polipéptido precursor, por ejemplo, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o incluso al menos un 99 %, pero no un 100 %, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. La homología o identidad puede determinarse mediante alineación de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, usando un programa tal como BLAST, ALIGN o CLUSTAL, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el polipéptido variante mantiene los cambios de aminoácidos (o al menos 1, 2, 3, 4, 5, etc. de estos cambios) que diferencian el polipéptido de su respectiva secuencia precursora/de referencia.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una alteración a uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos de un polipéptido precursor, en donde al menos 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, 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, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116,

117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 162, 164, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200o
5 más están alterados.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una o más de las sustituciones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos individuales en variantes de la SEQ ID NO: 3.

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
1	M	
2	I	R, G, A, K, Q, N, H
3	K	R, G, A, Q, N, H
4	S	R, G, A, K, Q, N, H
5	I	R, G, A, K, Q, N, H
6	Q	R, G, A, K, N, H
7	L	R, G, A, K, Q, N, H
8	K	R, G, A, Q, N, H
9	V	R, G, A, K, Q, N, H
10	K	R, G, A, Q, N, H
11	G	R, A, K, Q, N, H
12	E	R, G, A, K, Q, N, H
13	C	R, G, A, K, Q, N, H
14	P	R, G, A, K, Q, N, H
15	I	R, G, A, K, Q, N, H
16	T	R, G, A, K, Q, N, H
17	K	R, G, A, Q, N, H
18	D	R, G, A, K, Q, N, H
19	V	R, G, A, K, Q, N, H
20	I	R, G, A, K, Q, N, H
21	N	R, G, A, K, Q, H
22	E	R, G, A, K, Q, N, H
23	Y	R, G, A, K, Q, N, H
24	K	R, G, A, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
25	E	R, G, A, K, Q, N, H
26	Y	R, G, A, K, Q, N, H
27	Y	R, G, A, K, Q, N, H
28	N	R, G, A, K, Q, H
29	N	R, G, A, K, Q, H
30	C	R, G, A, K, Q, N, H
31	S	R, G, A, K, Q, N, H
32	D	R, G, A, K, Q, N, H
33	W	R, G, A, K, Q, N, H
34	I	R, G, A, K, Q, N, H
35	K	R, G, A, Q, N, H
36	N	R, G, A, K, Q, H
37	N	R, G, A, K, Q, H
38	L	R, G, A, K, Q, N, H
39	T	R, G, A, K, Q, N, H
40	S	R, G, A, K, Q, N, H
41	I	R, G, A, K, Q, N, H
42	T	R, G, A, K, Q, N, H
43	I	R, G, A, K, Q, N, H
44	G	R, A, K, Q, N, H
45	E	R, G, A, K, Q, N, H
46	M	R, G, A, K, Q, N, H
47	A	R, G, K, Q, N, H
48	K	R, G, A, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
49	F	R, G, A, K, Q, N, H
50	L	R, G, A, K, Q, N, H
51	Q	R, G, A, K, N, H
52	S	R, G, A, K, Q, N, H
53	L	R, G, A, K, Q, N, H
54	S	R, G, A, K, Q, N, H
55	D	R, G, A, K, Q, N, H
56	K	R, G, A, Q, N, H
57	E	R, G, A, K, Q, N, H
58	V	R, G, A, K, Q, N, H
59	A	R, G, K, Q, N, H
60	Y	R, G, A, K, Q, N, H
61	I	R, G, A, K, Q, N, H
62	S	R, G, A, K, Q, N, H
63	M	R, G, A, K, Q, N, H
64	G	R, A, K, Q, N, H
65	L	R, G, A, K, Q, N, H
66	S	R, G, A, K, Q, N, H
67	D	R, G, A, K, Q, N, H
68	E	R, G, A, K, Q, N, H
69	W	R, G, A, K, Q, N, H
70	K	R, G, A, Q, N, H
71	D	R, G, A, K, Q, N, H
72	K	R, G, A, Q, N, H
73	P	R, G, A, K, Q, N, H
74	L	R, G, A, K, Q, N, H
75	Y	R, G, A, K, Q, N, H
76	H	R, G, A, K, Q, N
77	L	R, G, A, K, Q, N, H
78	F	R, G, A, K, Q, N, H
79	T	R, G, A, K, Q, N, H
80	K	R, G, A, Q, N, H
81	K	R, G, A, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
82	Y	R, G, A, K, Q, N, H
83	H	R, G, A, K, Q, N
84	T	R, G, A, K, Q, N, H
85	K	R, G, A, Q, N, H
86	N	R, G, A, K, Q, H
87	A	R, G, K, Q, N, H
88	D	R, G, A, K, Q, N, H
89	N	R, G, A, K, Q, H
90	L	R, G, A, K, Q, N, H
91	L	R, G, A, K, Q, N, H
92	Y	R, G, A, K, Q, N, H
93	Y	R, G, A, K, Q, N, H
94	Y	R, G, A, K, Q, N, H
95	I	R, G, A, K, Q, N, H
96	K	R, G, A, Q, N, H
97	E	R, G, A, K, Q, N, H
98	K	R, G, A, Q, N, H
99	N	R, G, A, K, Q, H
100	L	R, G, A, K, Q, N, H
101	D	R, G, A, K, Q, N, H
102	G	R, A, K, Q, N, H
103	Y	R, G, A, K, Q, N, H
104	K	R, G, A, Q, N, H
105	G	R, A, K, Q, N, H
106	N	R, G, A, K, Q, H
107	T	R, G, A, K, Q, N, H
108	L	R, G, A, K, Q, N, H
109	N	R, G, A, K, Q, H
110	I	R, G, A, K, Q, N, H
111	S	R, G, A, K, Q, N, H
112	N	R, G, A, K, Q, H
113	T	R, G, A, K, Q, N, H
114	S	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
5	115	R, G, A, K, Q, N, H
	116	G, A, K, Q, N, H
	117	R, G, A, K, N, H
	118	R, G, A, K, Q, N, H
10	119	R, A, K, Q, N, H
	120	R, G, A, K, Q, N, H
	121	R, G, A, K, Q, N, H
	122	R, G, A, Q, N, H
15	123	R, G, A, K, Q, N, H
	124	R, G, A, K, Q, N, H
	125	R, G, A, K, Q, N, H
	126	R, G, A, K, Q, N, H
20	127	R, G, A, K, Q, H
	128	R, G, A, K, Q, N, H
	129	G, A, K, Q, N, H
	130	R, G, A, K, Q, N, H
25	131	R, G, A, Q, N, H
	132	R, G, A, K, Q, N, H
	133	G, A, K, Q, N, H
	134	R, G, A, K, Q, N, H
30	135	R, G, A, K, Q, N, H
	136	R, G, A, K, Q, H
	137	R, G, A, K, Q, N, H
	138	R, G, A, Q, N, H
35	139	R, G, A, K, Q, N, H
	140	R, G, A, Q, N, H
	141	G, A, K, Q, N, H
	142	R, G, A, Q, N, H
	143	R, G, A, Q, N, H
	144	R, G, A, K, Q, N, H
	145	R, G, A, K, Q, N, H
	146	R, G, K, Q, N, H
	147	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
148	S	R, G, A, K, Q, N, H
149	T	R, G, A, K, Q, N, H
150	S	R, G, A, K, Q, N, H
151	E	R, G, A, K, Q, N, H
152	D	R, G, A, K, Q, N, H
153	I	R, G, A, K, Q, N, H
154	E	R, G, A, K, Q, N, H
155	M	R, G, A, K, Q, N, H
156	Q	R, G, A, K, N, H
157	V	R, G, A, K, Q, N, H
158	M	R, G, A, K, Q, N, H
159	Y	R, G, A, K, Q, N, H
160	E	R, G, A, K, Q, N, H
161	I	R, G, A, K, Q, N, H
162	I	R, G, A, K, Q, N, H
163	K	R, G, A, Q, N, H
164	Y	R, G, A, K, Q, N, H
165	S	R, G, A, K, Q, N, H
166	L	R, G, A, K, Q, N, H
167	N	R, G, A, K, Q, H
168	K	R, G, A, Q, N, H
169	K	R, G, A, Q, N, H
170	S	R, G, A, K, Q, N, H
171	D	R, G, A, K, Q, N, H
172	W	R, G, A, K, Q, N, H
173	D	R, G, A, K, Q, N, H
174	N	R, G, A, K, Q, H
175	F	R, G, A, K, Q, N, H
176	I	R, G, A, K, Q, N, H
177	S	R, G, A, K, Q, N, H
178	Y	R, G, A, K, Q, N, H
179	I	R, G, A, K, Q, N, H
180	E	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
181	N	R, G, A, K, Q, H
182	V	R, G, A, K, Q, N, H
183	E	R, G, A, K, Q, N, H
184	N	R, G, A, K, Q, H
185	P	R, G, A, K, Q, N, H
186	N	R, G, A, K, Q, H
187	I	R, G, A, K, Q, N, H
188	D	R, G, A, K, Q, N, H
189	N	R, G, A, K, Q, H
190	I	R, G, A, K, Q, N, H
191	N	R, G, A, K, Q, H
192	R	G, A, K, Q, N, H
193	Y	R, G, A, K, Q, N, H
194	K	R, G, A, Q, N, H
195	L	R, G, A, K, Q, N, H
196	L	R, G, A, K, Q, N, H
197	R	G, A, K, Q, N, H
198	E	R, G, A, K, Q, N, H
199	C	R, G, A, K, Q, N, H
200	F	R, G, A, K, Q, N, H
201	C	R, G, A, K, Q, N, H
202	E	R, G, A, K, Q, N, H
203	N	R, G, A, K, Q, H
204	E	R, G, A, K, Q, N, H
205	N	R, G, A, K, Q, H
206	M	R, G, A, K, Q, N, H
207	I	R, G, A, K, Q, N, H
208	K	R, G, A, Q, N, H
209	N	R, G, A, K, Q, H
210	K	R, G, A, Q, N, H
211	L	R, G, A, K, Q, N, H
212	E	R, G, A, K, Q, N, H
213	L	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
214	L	R, G, A, K, Q, N, H
215	S	R, G, A, K, Q, N, H
216	V	R, G, A, K, Q, N, H
217	E	R, G, A, K, Q, N, H
218	Q	R, G, A, K, N, H
219	L	R, G, A, K, Q, N, H
220	K	R, G, A, Q, N, H
221	K	R, G, A, Q, N, H
222	F	R, G, A, K, Q, N, H
223	G	R, A, K, Q, N, H
224	G	R, A, K, Q, N, H
225	C	R, G, A, K, Q, N, H
226	I	R, G, A, K, Q, N, H
227	M	R, G, A, K, Q, N, H
228	K	R, G, A, Q, N, H
229	P	R, G, A, K, Q, N, H
230	H	R, G, A, K, Q, N
231	I	R, G, A, K, Q, N, H
232	N	R, G, A, K, Q, H
233	S	R, G, A, K, Q, N, H
234	M	R, G, A, K, Q, N, H
235	T	R, G, A, K, Q, N, H
236	I	R, G, A, K, Q, N, H
237	N	R, G, A, K, Q, H
238	I	R, G, A, K, Q, N, H
239	Q	R, G, A, K, N, H
240	D	R, G, A, K, Q, N, H
241	F	R, G, A, K, Q, N, H
242	K	R, G, A, Q, N, H
243	I	R, G, A, K, Q, N, H
244	E	R, G, A, K, Q, N, H
245	E	R, G, A, K, Q, N, H
246	K	R, G, A, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
5	247	R, G, A, K, Q, N, H
	248	R, G, A, K, Q, H
	249	R, G, A, K, Q, N, H
	250	R, G, A, K, Q, N, H
10	251	R, A, K, Q, N, H
	252	R, G, A, K, Q, N, H
	253	R, G, A, K, Q, N, H
	254	R, G, A, K, Q, N, H
15	255	R, G, A, K, Q, N
	256	R, G, A, K, Q, N, H
	257	R, G, A, K, Q, N, H
	258	R, G, A, K, Q, N, H
20	259	R, G, A, K, Q, H
	260	R, G, A, Q, N, H
	261	R, G, A, Q, N, H
	262	R, G, A, K, N, H
25	263	R, G, A, K, Q, N, H
	264	R, G, A, K, N, H
	265	R, G, A, K, Q, N, H
	266	R, G, A, K, Q, N, H
30	267	R, G, A, K, Q, N, H
	268	R, G, A, K, Q, N, H
	269	R, A, K, Q, N, H
	270	R, G, A, K, Q, H
35	271	G, A, K, Q, N, H
	272	R, G, A, K, N, H
	273	R, G, A, K, Q, N, H
	274	R, G, A, Q, N, H
	275	R, G, A, Q, N, H
	276	R, A, K, Q, N, H
	277	R, G, A, K, Q, N, H
	278	R, G, A, Q, N, H
	279	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
280	I	R, G, A, K, Q, N, H
281	H	R, G, A, K, Q, N
282	E	R, G, A, K, Q, N, H
283	T	R, G, A, K, Q, N, H
284	L	R, G, A, K, Q, N, H
285	V	R, G, A, K, Q, N, H
286	D	R, G, A, K, Q, N, H
287	I	R, G, A, K, Q, N, H
288	T	R, G, A, K, Q, N, H
289	N	R, G, A, K, Q, H
290	T	R, G, A, K, Q, N, H
291	H	R, G, A, K, Q, N,
292	G	R, A, K, Q, N, H
293	E	R, G, A, K, Q, N, H
294	N	R, G, A, K, Q, H
295	I	R, G, A, K, Q, N, H
296	V	R, G, A, K, Q, N, H
297	F	R, G, A, K, Q, N, H
298	T	R, G, A, K, Q, N, H
299	I	R, G, A, K, Q, N, H
300	K	R, G, A, Q, N, H
301	N	R, G, A, K, Q, H
302	D	R, G, A, K, Q, N, H
303	N	R, G, A, K, Q, H
304	L	R, G, A, K, Q, N, H
305	Y	R, G, A, K, Q, N, H
306	I	R, G, A, K, Q, N, H
307	V	R, G, A, K, Q, N, H
308	F	R, G, A, K, Q, N, H
309	S	R, G, A, K, Q, N, H
310	Y	R, G, A, K, Q, N, H
311	E	R, G, A, K, Q, N, H
312	S	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
313	E	R, G, A, K, Q, N, H
314	F	R, G, A, K, Q, N, H
315	E	R, G, A, K, Q, N, H
316	K	R, G, A, Q, N, H
317	E	R, G, A, K, Q, N, H
318	E	R, G, A, K, Q, N, H
319	V	R, G, A, K, Q, N, H
320	N	R, G, A, K, Q, H
321	F	R, G, A, K, Q, N, H
322	A	R, G, K, Q, N, H
323	K	R, G, A, Q, N, H
324	T	R, G, A, K, Q, N, H
325	V	R, G, A, K, Q, N, H
326	G	R, A, K, Q, N, H
327	L	R, G, A, K, Q, N, H
328	D	A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
329	V	R, G, A, K, Q, N, H
330	N	R, G, A, K, Q, H
331	F	R, G, A, K, Q, N, H
332	K	R, G, A, Q, N, H
333	H	R, G, A, K, Q, N
334	A	R, G, K, Q, N, H
335	F	R, G, A, K, Q, N, H
336	F	R, G, A, K, Q, N, H
337	V	R, G, A, K, Q, N, H
338	T	R, G, A, K, Q, N, H
339	S	R, G, A, K, Q, N, H
340	E	R, G, A, K, Q, N, H
341	K	R, G, A, Q, N, H
342	D	R, G, A, K, Q, N, H
343	N	R, G, A, K, Q, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
344	C	R, G, A, K, Q, N, H
345	H	R, G, A, K, Q, N
346	L	R, G, A, K, Q, N, H
347	D	R, G, A, K, Q, N, H
348	G	R, A, K, Q, N, H
349	Y	R, G, A, K, Q, N, H
350	I	R, G, A, K, Q, N, H
351	N	R, G, A, K, Q, H
352	L	R, G, A, K, Q, N, H
353	Y	R, G, A, K, Q, N, H
354	K	R, G, A, Q, N, H
355	Y	R, G, A, K, Q, N, H
356	L	R, G, A, K, Q, N, H
357	L	R, G, A, K, Q, N, H
358	E	R, G, A, K, Q, N, H
359	H	R, G, A, K, Q, N
360	D	R, G, A, K, Q, N, H
361	E	R, G, A, K, Q, N, H
362	F	R, G, A, K, Q, N, H
363	T	R, G, A, K, Q, N, H
364	N	R, G, A, K, Q, H
365	L	R, G, A, K, Q, N, H
366	L	R, G, A, K, Q, N, H
367	T	R, G, A, K, Q, N, H
368	E	R, G, A, K, Q, N, H
369	D	R, G, A, K, Q, N, H
370	E	R, G, A, K, Q, N, H
371	R	G, A, K, Q, N, H
372	K	R, G, A, Q, N, H
373	D	R, G, A, K, Q, N, H
374	Y	R, G, A, K, Q, N, H
375	E	R, G, A, K, Q, N, H
376	E	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
377	L	R, G, A, K, Q, N, H
378	S	R, G, A, K, Q, N, H
379	K	R, G, A, Q, N, H
380	V	R, G, A, K, Q, N, H
381	V	R, G, A, K, Q, N, H
382	T	R, G, A, K, Q, N, H
383	F	R, G, A, K, Q, N, H
384	C	R, G, A, K, Q, N, H
385	P	R, G, A, K, Q, N, H
386	F	R, G, A, K, Q, N, H
387	E	R, G, A, K, Q, N, H
388	N	R, G, A, K, Q, H
389	Q	R, G, A, K, N, H
390	L	R, G, A, K, Q, N, H
391	L	R, G, A, K, Q, N, H
392	F	R, G, A, K, Q, N, H
393	A	R, G, K, Q, N, H
394	R	G, A, K, Q, N, H
395	Y	R, G, A, K, Q, N, H
396	N	R, G, A, K, Q, H
397	K	R, G, A, Q, N, H
398	M	R, G, A, K, Q, N, H
399	S	R, G, A, K, Q, N, H
400	K	R, G, A, Q, N, H
401	F	R, G, A, K, Q, N, H
402	C	R, G, A, K, Q, N, H
403	K	R, G, A, Q, N, H
404	K	R, G, A, Q, N, H
405	E	R, G, A, K, Q, N, H
406	Q	R, G, A, K, N, H
407	V	R, G, A, K, Q, N, H
408	L	R, G, A, K, Q, N, H
409	S	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
410	K	R, G, A, Q, N, H
411	L	R, G, A, K, Q, N, H
412	L	R, G, A, K, Q, N, H
413	Y	R, G, A, K, Q, N, H
414	A	R, G, K, Q, N, H
415	L	R, G, A, K, Q, N, H
416	Q	R, G, A, K, N, H
417	K	R, G, A, Q, N, H
418	K	R, G, A, Q, N, H
419	L	R, G, A, K, Q, N, H
420	K	R, G, A, Q, N, H
421	D	R, G, A, K, Q, N, H
422	E	R, G, A, K, Q, N, H
423	N	R, G, A, K, Q, H
424	T	R, G, A, K, Q, N, H
425	R	G, A, K, Q, N, H
426	K	R, G, A, Q, N, H
427	E	R, G, A, K, Q, N, H
428	Y	R, G, A, K, Q, N, H
429	I	R, G, A, K, Q, N, H
430	Y	R, G, A, K, Q, N, H
431	V	R, G, A, K, Q, N, H
432	S	R, G, A, K, Q, N, H
433	C	R, G, A, K, Q, N, H
434	V	R, G, A, K, Q, N, H
435	N	R, G, A, K, Q, H
436	K	R, G, A, Q, N, H
437	L	R, G, A, K, Q, N, H
438	R	G, A, K, Q, N, H
439	A	R, G, K, Q, N, H
440	K	R, G, A, Q, N, H
441	Y	R, G, A, K, Q, N, H
442	V	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
5	443	R, G, A, K, Q, N, H
	444	R, G, A, K, Q, N, H
	445	R, G, A, K, Q, N, H
	446	R, G, A, K, Q, N, H
10	447	R, G, A, K, Q, N, H
	448	R, G, A, Q, N, H
	449	R, G, A, K, Q, N, H
	450	R, G, A, Q, N, H
15	451	R, G, A, K, Q, N, H
	452	R, G, A, K, Q, N, H
	453	R, G, A, K, Q, N, H
	454	R, G, A, Q, N, H
20	455	R, G, A, K, N, H
	456	R, G, A, Q, N, H
	457	R, G, A, K, Q, N, H
	458	R, G, A, K, Q, N, H
25	459	R, G, A, K, Q, N, H
	460	R, G, A, K, Q, N, H
	461	R, G, A, K, Q, N, H
	462	R, G, A, K, Q, N, H
30	463	R, A, K, Q, N, H
	464	R, G, A, K, Q, N, H
	465	R, G, A, K, Q, N, H
	466	R, G, A, K, Q, N, H
35	467	R, G, A, K, Q, N, H
	468	R, G, A, K, Q, N, H
	469	R, G, A, K, Q, N, H
	470	R, G, A, K, Q, N, H
	471	R, G, A, K, Q, N, H
	472	R, G, A, Q, N, H
	473	R, G, A, K, Q, N, H
	474	R, G, A, K, Q, N, H
	475	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
476	D	R, G, A, K, Q, N, H
477	K	R, G, A, Q, N, H
478	R	G, A, K, Q, N, H
479	R	G, A, K, Q, N, H
480	T	R, G, A, K, Q, N, H
481	E	R, G, A, K, Q, N, H
482	Y	R, G, A, K, Q, N, H
483	P	R, G, A, K, Q, N, H
484	F	R, G, A, K, Q, N, H
485	R	G, A, K, Q, N, H
486	N	R, G, A, K, Q, H
487	T	R, G, A, K, Q, N, H
488	P	R, G, A, K, Q, N, H
489	V	R, G, A, K, Q, N, H
490	A	R, G, K, Q, N, H
491	N	R, G, A, K, Q, H
492	E	R, G, A, K, Q, N, H
493	L	R, G, A, K, Q, N, H
494	L	R, G, A, K, Q, N, H
495	S	R, G, A, K, Q, N, H
496	K	R, G, A, Q, N, H
497	L	R, G, A, K, Q, N, H
498	N	R, G, A, K, Q, H
499	N	R, G, A, K, Q, H
500	V	R, G, A, K, Q, N, H
501	Q	R, G, A, K, N, H
502	Q	R, G, A, K, N, H
503	D	R, G, A, K, Q, N, H
504	I	R, G, A, K, Q, N, H
505	N	R, G, A, K, Q, H
506	G	R, A, K, Q, N, H
507	C	R, G, A, K, Q, N, H
508	L	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
5	509	R, G, A, Q, N, H
	510	R, G, A, K, Q, H
	511	R, G, A, K, Q, N, H
	512	R, G, A, K, Q, N, H
10	513	R, G, A, K, Q, H
	514	R, G, A, K, Q, N, H
	515	R, G, A, K, Q, N, H
	516	R, G, A, K, Q, N, H
15	517	R, G, A, Q, N, H
	518	R, G, A, K, Q, N, H
	519	R, G, A, K, Q, N, H
	520	R, G, A, K, Q, N, H
20	521	R, G, A, K, N, H
	522	R, G, A, K, Q, H
	523	R, A, K, Q, N, H
	524	R, G, A, K, Q, N, H
25	525	R, G, A, Q, N, H
	526	R, G, A, K, Q, N, H
	527	R, G, A, K, Q, N, H
	528	R, G, K, Q, N, H
30	529	R, G, A, K, Q, N, H
	530	A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
	531	R, G, A, K, Q, H
	532	R, G, A, K, Q, N, H
35	533	R, G, A, K, Q, N, H
	534	R, G, A, K, Q, H
	535	R, G, A, K, Q, N, H
	536	R, G, A, K, Q, H
	537	R, G, A, K, Q, N, H
	538	R, G, A, K, Q, N, H
	539	R, G, A, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
540	K	R, G, A, Q, N, H
541	Q	R, G, A, K, N, H
542	V	R, G, A, K, Q, N, H
543	L	R, G, A, K, Q, N, H
544	P	R, G, A, K, Q, N, H
545	T	R, G, A, K, Q, N, H
546	I	R, G, A, K, Q, N, H
547	K	R, G, A, Q, N, H
548	S	R, G, A, K, Q, N, H
549	L	R, G, A, K, Q, N, H
550	L	R, G, A, K, Q, N, H
551	K	R, G, A, Q, N, H
552	Y	R, G, A, K, Q, N, H
553	H	R, G, A, K, Q, N
554	K	R, G, A, Q, N, H
555	L	R, G, A, K, Q, N, H
556	E	R, G, A, K, Q, N, H
557	N	R, G, A, K, Q, H
558	Q	R, G, A, K, N, H
559	N	R, G, A, K, Q, H
560	V	R, G, A, K, Q, N, H
561	N	R, G, A, K, Q, H
562	D	R, G, A, K, Q, N, H
563	I	R, G, A, K, Q, N, H
564	K	R, G, A, Q, N, H
565	A	R, G, K, Q, N, H
566	S	R, G, A, K, Q, N, H
567	D	R, G, A, K, Q, N, H
568	K	R, G, A, Q, N, H
569	V	R, G, A, K, Q, N, H
570	K	R, G, A, Q, N, H
571	E	R, G, A, K, Q, N, H
572	Y	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
573	I	R, G, A, K, Q, N, H
574	E	R, G, A, K, Q, N, H
575	N	R, G, A, K, Q, H
576	G	R, A, K, Q, N, H
577	Y	R, G, A, K, Q, N, H
578	Y	R, G, A, K, Q, N, H
579	E	R, G, A, K, Q, N, H
580	L	R, G, A, K, Q, N, H
581	M	R, G, A, K, Q, N, H
582	T	R, G, A, K, Q, N, H
583	N	R, G, A, K, Q, H
584	E	R, G, A, K, Q, N, H
585	N	R, G, A, K, Q, H
586	N	R, G, A, K, Q, H
587	E	R, G, A, K, Q, N, H
588	I	R, G, A, K, Q, N, H
589	V	R, G, A, K, Q, N, H
590	D	R, G, A, K, Q, N, H
591	A	R, G, K, Q, N, H
592	K	R, G, A, Q, N, H
593	Y	R, G, A, K, Q, N, H
594	T	R, G, A, K, Q, N, H
595	E	R, G, A, K, Q, N, H
596	K	R, G, A, Q, N, H
597	G	R, A, K, Q, N, H
598	A	R, G, K, Q, N, H
599	M	R, G, A, K, Q, N, H
600	K	R, G, A, Q, N, H
601	V	R, G, A, K, Q, N, H
602	K	R, G, A, Q, N, H
603	N	R, G, A, K, Q, H
604	A	R, G, K, Q, N, H
605	N	R, G, A, K, Q, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
606	F	R, G, A, K, Q, N, H
607	F	R, G, A, K, Q, N, H
608	N	R, G, A, K, Q, H
609	L	R, G, A, K, Q, N, H
610	M	R, G, A, K, Q, N, H
611	M	R, G, A, K, Q, N, H
612	K	R, G, A, Q, N, H
613	S	R, G, A, K, Q, N, H
614	L	R, G, A, K, Q, N, H
615	H	R, G, A, K, Q, N
616	F	R, G, A, K, Q, N, H
617	A	R, G, K, Q, N, H
618	S	R, G, A, K, Q, N, H
619	V	R, G, A, K, Q, N, H
620	K	R, G, A, Q, N, H
621	D	R, G, A, K, Q, N, H
622	E	R, G, A, K, Q, N, H
623	F	R, G, A, K, Q, N, H
624	V	R, G, A, K, Q, N, H
625	L	R, G, A, K, Q, N, H
626	L	R, G, A, K, Q, N, H
627	S	R, G, A, K, Q, N, H
628	N	R, G, A, K, Q, H
629	N	R, G, A, K, Q, H
630	G	R, A, K, Q, N, H
631	K	R, G, A, Q, N, H
632	T	R, G, A, K, Q, N, H
633	Q	R, G, A, K, N, H
634	I	R, G, A, K, Q, N, H
635	A	R, G, K, Q, N, H
636	L	R, G, A, K, Q, N, H
637	V	R, G, A, K, Q, N, H
638	P	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
639	S	R, G, A, K, Q, N, H
640	E	R, G, A, K, Q, N, H
641	F	R, G, A, K, Q, N, H
642	T	R, G, A, K, Q, N, H
643	S	R, G, A, K, Q, N, H
644	Q	R, G, A, K, N, H
645	M	R, G, A, K, Q, N, H
646	D	R, G, A, K, Q, N, H
647	S	R, G, A, K, Q, N, H
648	T	R, G, A, K, Q, N, H
649	D	R, G, A, K, Q, N, H
650	H	R, G, A, K, Q, N
651	C	R, G, A, K, Q, N, H
652	L	R, G, A, K, Q, N, H
653	Y	R, G, A, K, Q, N, H
654	M	R, G, A, K, Q, N, H
655	K	R, G, A, Q, N, H
656	K	R, G, A, Q, N, H
657	N	R, G, A, K, Q, H
658	D	R, G, A, K, Q, N, H
659	K	R, G, A, Q, N, H
660	G	R, A, K, Q, N, H
661	K	R, G, A, Q, N, H
662	L	R, G, A, K, Q, N, H
663	V	R, G, A, K, Q, N, H
664	K	R, G, A, Q, N, H
665	A	R, G, K, Q, N, H
666	D	R, G, A, K, Q, N, H
667	K	R, G, A, Q, N, H
668	K	R, G, A, Q, N, H
669	E	R, G, A, K, Q, N, H
670	V	R, G, A, K, Q, N, H
671	R	G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
672	T	R, G, A, K, Q, N, H
673	K	R, G, A, Q, N, H
674	Q	R, G, A, K, N, H
675	E	R, G, A, K, Q, N, H
676	R	G, A, K, Q, N, H
677	H	R, G, A, K, Q, N
678	I	R, G, A, K, Q, N, H
679	N	R, G, A, K, Q, N, H
680	G	R, A, K, Q, N, H
681	L	R, G, A, K, Q, N, H
682	N	R, G, A, K, Q, H
683	A	R, G, K, Q, N, H
684	D	R, G, A, K, Q, N, H
685	F	R, G, A, K, Q, N, H
686	N	R, G, A, K, Q, H
687	A	R, G, K, Q, N, H
688	A	R, G, K, Q, N, H
689	N	R, G, A, K, Q, H
690	N	R, G, A, K, Q, H
691	I	R, G, A, K, Q, N, H
692	K	R, G, A, Q, N, H
693	Y	R, G, A, K, Q, N, H
694	I	R, G, A, K, Q, N, H
695	V	R, G, A, K, Q, N, H
696	E	R, G, A, K, Q, N, H
697	N	R, G, A, K, Q, H
698	E	R, G, A, K, Q, N, H
699	V	R, G, A, K, Q, N, H
700	W	R, G, A, K, Q, N, H
701	R	G, A, K, Q, N, H
702	G	R, A, K, Q, N, H
703	I	R, G, A, K, Q, N, H
704	F	R, G, A, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
5	705	R, G, A, K, Q, N, H
	706	R, G, A, K, Q, N, H
	707	G, A, K, Q, N, H
	708	R, G, A, K, Q, N, H
10	709	R, G, A, Q, N, H
	710	R, G, A, Q, N, H
	711	R, G, A, K, Q, N, H
	712	R, G, A, K, Q, N, H
	713	R, G, A, K, Q, N, H
15	714	R, G, A, K, Q, H
	715	R, G, A, K, Q, N, H
	716	R, G, A, K, Q, N, H
	717	R, G, A, K, Q, N, H
	718	R, G, A, K, Q, N, H
20	719	R, G, A, K, Q, N, H
	720	R, G, A, K, Q, N, H
	721	R, G, A, K, Q, N, H
	722	R, G, A, Q, N, H
	723	R, G, A, Q, N, H
25	724	R, A, K, Q, N, H
	725	R, G, A, K, Q, N, H
	726	R, G, A, K, Q, N, H
	727	R, G, K, Q, N, H
	728	R, G, A, K, Q, N, H
30	729	R, G, A, K, Q, N, H
	730	R, G, A, K, Q, H
	731	R, G, A, K, Q, N, H
	732	R, G, A, K, Q, N, H
	733	R, G, A, Q, N, H
35	734	R, G, A, Q, N, H
	735	R, G, A, K, Q, N, H
	736	R, G, A, K, Q, N, H
	737	R, G, K, Q, N, H

Tabla 2		
Posición	Residuo de tipo silvestre	Sustituciones
738	I	R, G, A, K, Q, N, H
739	K	R, G, A, Q, N, H
740	V	R, G, A, K, Q, N, H
741	L	R, G, A, K, Q, N, H
742	E	R, G, A, K, Q, N, H
743	T	R, G, A, K, Q, N, H
744	E	R, G, A, K, Q, N, H
745	K	R, G, A, Q, N, H

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una alteración que aumenta las interacciones del polipéptido variante con la guía de ARN. En algunas realizaciones, la alteración que aumenta las interacciones con la guía de ARN es una sustitución de arginina, lisina, glutamina, asparagina o histidina. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una alteración que aumenta las interacciones del polipéptido variante con el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la alteración que aumenta las interacciones con el ácido nucleico diana es una sustitución de arginina, lisina, glutamina, asparagina o histidina. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución de alanina. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución de glicina.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución en P14, E311, D32, I61, G223, N109 y/o D719 con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición E311 (por ejemplo, una sustitución E311R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición E311 (por ejemplo, una sustitución E311R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición I61 (por ejemplo, una sustitución I61R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o

más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición I61 (por ejemplo, una sustitución I61R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición G223 (por ejemplo, una sustitución G223R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición G223 (por ejemplo, una sustitución G223R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

20 En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D719 (por ejemplo, una sustitución D719R) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D719 (por ejemplo, una sustitución D719R) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

30 En algunas realizaciones, la variante de polipéptido comprende la sustitución P14R, E311R, D32R, I61R, G223R, N109R y/o D719R con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende la sustitución P14R y una, dos, tres o cuatro sustituciones adicionales con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende la sustitución E311R y una, dos, tres o cuatro sustituciones adicionales con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende la sustitución D32R y una, dos, tres o cuatro sustituciones adicionales con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende la sustitución I61R y una, dos, tres o cuatro sustituciones adicionales con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende la sustitución G223R y una, dos, tres o cuatro

sustituciones adicionales con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende la sustitución N109R y una, dos, tres o cuatro sustituciones adicionales con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende la sustitución D719R y una, dos, tres o cuatro sustituciones adicionales con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende las sustituciones de aminoácidos con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Variantes de la SEQ ID NO: 3 con múltiples sustituciones de aminoácidos.

	n.º de sustituciones	Sustituciones de aminoácidos
10	2	P14R, E311R
	2	P14R, D32R
	2	P14R, I61R
	2	P14R, G223R
	2	E311R, D32R
15	2	E311R, I61R
	2	E311R, G223R
	2	D32R, I61R
	2	D32R, G223R
	2	I61R, G223R
20	3	P14R, E311R, D32R
	3	P14R, E311R, I61R
	3	P14R, E311R, G223R
	3	P14R, D32R, I61R
	3	P14R, D32R, G223R
25	3	P14R, I61R, G223R
	3	E311R, D32R, I61R
	3	E311R, D32R, G223R
	3	E311R, I61R, G223R
30	3	D32R, I61R, G223R
	4	P14R, E311R, D32R, I61R
	4	P14R, E311R, D32R, G223R
	4	P14R, E311R, I61R, G223R
	4	P14R, D32R, I61R, G223R
35	4	E311R, D32R, I61R, G223R
	5	P14R, E311R, D32R, I61R, G223R
	2	D32R, N109R
	2	N109R, G223R

5	2	N109R, E311R
	3	D32R, N109R, G223R
	3	D32R, N109R, E311R
	3	N109R, G223R, E311R
	2	D32R, D719R
10	2	N109R, D719R
	2	G223R, D719R
	2	E311R, D719R
	3	D32R, N109R, D719R
	3	D32R, G223R, D719R
15	3	D32R, E311R, D719R
	3	N109R, G223R, D719R
	3	N109R, E311R, D719R
	3	G223R, E311R, D719R
	4	D32R, N109R, G223R, E311R
20	4	D32R, N109R, G223R, D719R
	4	D32R, N109R, E311R, D719R
	4	D32R, G223R, E311R, D719R
	4	N109R, G223R, E311R, D719R
	5	D32R, N109R, G223R, E311R, D719R

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende un aminoácido que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una E311R) y D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante P14R, E311R, D32R).

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende un aminoácido que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una E311R) y G223 (por ejemplo, una sustitución G223R) con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante P14R, E311R, G223R).

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende un aminoácido que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) e I61 (por ejemplo, una sustitución I61R) con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante P14R, E311R, D32R y I61R).

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende un aminoácido que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la

posición D32R (por ejemplo, una sustitución D32R), N109 (por ejemplo, una N109R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R) e D719 (por ejemplo, una sustitución D719R) con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante D32R, N109R, E311R y D719R).

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D302 (por ejemplo, una sustitución D302G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D302 (por ejemplo, una sustitución D302G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D590 (por ejemplo, una sustitución D590G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D590 (por ejemplo, una sustitución D590G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición E154 (por ejemplo, una sustitución E154G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición E154 (por ejemplo, una sustitución E154G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una

sustitución en la posición D567 (por ejemplo, una sustitución D567G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D567 (por ejemplo, una sustitución D567G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición L38 (por ejemplo, una sustitución L38G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición L38 (por ejemplo, una sustitución L38G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D145 (por ejemplo, una sustitución D145G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D145 (por ejemplo, una sustitución D145G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición C13 (por ejemplo, una sustitución C13G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición C13 (por ejemplo, una sustitución C13G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición T338 (por ejemplo, una sustitución T338G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición T338 (por ejemplo, una sustitución T338G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición D55 (por ejemplo, una sustitución D55G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición D55 (por ejemplo, una sustitución D55G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición K221 (por ejemplo, una sustitución K221G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición K221 (por ejemplo, una sustitución K221G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y que comprende una sustitución en la posición E736 (por ejemplo, una sustitución E736G) con respecto a la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más alteraciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones, o cualquier combinación de las mismas) en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 posiciones

de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde una de las alteraciones de secuencia comprende una sustitución en la posición E736 (por ejemplo, una sustitución E736G) con respecto a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo, una sustitución P14G), D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G), E736 (por ejemplo, una sustitución E736G), o cualquier combinación de estos, con respecto a la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, un polipéptido variante que comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o la totalidad de K208G, D302G, D590G, E154G, D567G, L38G, D145G, C13G, T338G, P14G, D55G, K221G, K35G, E736G).

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende:

i) una sustitución seleccionada de una o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o la totalidad de) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R); y

ii) una sustitución seleccionada de una o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo, una sustitución P14G), D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G).

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en P14 (por ejemplo, una sustitución P14R) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o la totalidad de) una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una

sustitución P14R y uno o más de: una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución P14G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en E311 (por ejemplo, una sustitución E311R) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo una sustitución P14G) D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G). Por ejemplo, en algunas realizaciones, 10 el polipéptido variante comprende una sustitución E311R y uno o más de: una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución P14G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que 20 tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo una sustitución P14G) D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G). Por ejemplo, en algunas realizaciones, 25 el polipéptido variante comprende una sustitución D32R y uno o más de: una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución P14G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que 35 tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en la posición I61 (por ejemplo, una sustitución I61R) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por

ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo una sustitución P14G) D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución I61R y uno o más de: una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución P14G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en la posición G223 (por ejemplo, una sustitución G223R) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo una sustitución P14G) D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución G223R y uno o más de: una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución P14G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en la posición N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo una sustitución P14G) D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución N109R y uno o más de: una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución P14G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en la posición D719 (por ejemplo, una sustitución D719R) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo una sustitución P14G) D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución D719R y uno o más de: una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución P14G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), una sustitución en la posición E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), una sustitución en la posición D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o la totalidad de) una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo una sustitución P14G) D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R y una sustitución seleccionada de una o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o todas) una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), una sustitución en la posición E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), una sustitución en la posición G223 (por ejemplo, una sustitución G223R) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una

sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo una sustitución P14G) D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución G223R y una sustitución seleccionada de una o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), una sustitución en la posición E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), una sustitución en la posición D32 (por ejemplo, una sustitución D32R) una sustitución en I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo una sustitución P14G) D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61, y una sustitución seleccionada de una o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en la posición D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), una sustitución en la posición N109 (por ejemplo, una sustitución N109R), una sustitución en la posición E311 (por ejemplo, una sustitución E311R) una sustitución en D719 (por ejemplo, una sustitución D719R), y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución en la posición K208 (por ejemplo, una sustitución K208G), D302 (por ejemplo, una sustitución D302G), D590 (por ejemplo, una sustitución D590G), E154 (por ejemplo, una sustitución E154G), D567 (por ejemplo, una sustitución D567G), L38 (por ejemplo, una sustitución L38G), D145 (por ejemplo, una sustitución D145G), C13 (por

ejemplo, una sustitución C13G), T338 (por ejemplo, una sustitución T338G), P14 (por ejemplo una sustitución P14G) D55 (por ejemplo, una sustitución D55G), K221 (por ejemplo, una sustitución K221G), K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y E736 (por ejemplo, una sustitución E736G). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución D32R, una sustitución N109R, una sustitución E311R, una sustitución D719R, y una sustitución seleccionada de una o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución K208G, una sustitución D302G, una sustitución D590G, una sustitución E154G, una sustitución D567G, una sustitución L38G, una sustitución D145G, una sustitución C13G, una sustitución T338G, una sustitución D55G, una sustitución K221G, una sustitución K35G y una sustitución E736G.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en K208 (por ejemplo, una sustitución K208G) y una sustitución seleccionada de una o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o todas) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en D302 (por ejemplo, una sustitución D302G) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o la totalidad de) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en D590 (por ejemplo, una sustitución D590G) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución

P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en E154 (por ejemplo, una sustitución E154G) y una sustitución seleccionada de una o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o todas) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en D567 (por ejemplo, una sustitución D567G) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o la totalidad de) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en L38 (por ejemplo, una sustitución L38G) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o la totalidad de) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en D145 (por ejemplo, una sustitución D145G) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o la totalidad de) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por

ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en C13 (por ejemplo, una sustitución C13G) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o la totalidad de) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R),
10 I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en T338 (por ejemplo, una sustitución T338G) y una sustitución seleccionada de una o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o todas) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por
20 ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

25 En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en P14 (por ejemplo, una sustitución P14G) y una sustitución seleccionada de una o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o la tos) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por
30 ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

35 En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en D55 (por ejemplo, una sustitución D55G) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o todos) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución

P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en K221 (por ejemplo, una sustitución K221G) y una sustitución seleccionada de una o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o todas) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en K35 (por ejemplo, una sustitución K35G) y una sustitución seleccionada de uno o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o todos) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 y comprende una sustitución en E736 (por ejemplo, una sustitución E736G) y una sustitución seleccionada de una o más de (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o todas) una sustitución en la posición P14 (por ejemplo, una sustitución P14R), E311 (por ejemplo, una sustitución E311R), D32 (por ejemplo, una sustitución D32R), I61 (por ejemplo, una sustitución I61R), G223 (por ejemplo, una sustitución G223R), N109 (por ejemplo, una sustitución N109R) y D719 (por ejemplo, una sustitución D719R). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende una sustitución K208G y uno o más de: una sustitución P14R, una sustitución E311R, una sustitución D32R, una sustitución I61R, una sustitución G223R, una sustitución N109R y una sustitución D719R.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos un motivo RuvC o un dominio RuvC.

Aunque los cambios descritos en el presente documento pueden ser uno o más cambios de aminoácidos, los cambios en el polipéptido variante también pueden ser de naturaleza sustancial, tales como la fusión de polipéptidos como extensiones amino y/o carboxilo terminales. Por ejemplo, el polipéptido variante puede contener péptidos adicionales, por ejemplo, uno o más péptidos. Los ejemplos de péptidos adicionales pueden incluir péptidos epítopos para marcaje, tales como un marcador de polihistidina (His-tag), Myc y FLAG. En algunas realizaciones, el polipéptido variante descrito en el presente documento puede fusionarse con un resto detectable tal como una proteína fluorescente (por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP) o proteína fluorescente amarilla (YFP)).

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más) señal de localización nuclear (NLS). En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más) señal de exportación nuclear (NES). En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más) NLS y al menos una (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más) NES.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante descrito en el presente documento puede ser auto-inactivante. Véase, Epstein et al., "Engineering a Self-Inactivating CRISPR System for AAV Vectors", *Mol. Ther.*, 24 (2016): S50, que se incorpora por referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido variante descrito en el presente documento puede tener codones optimizados para su uso en un organismo o célula hospedadora particular. Por ejemplo, el ácido nucleico puede tener codones optimizados para cualquier eucariota no humano, incluyendo ratones, ratas, conejos, perros, ganado o primates no humanos. Las tablas de uso de codones están disponibles, por ejemplo, en la "Base de datos de uso de codones" disponible en www.kazusa.or.jp/codon/ y estas tablas pueden adaptarse de varias maneras. Véase Nakamura *et al. Nucl. Acids Res.* 28:292 (2000), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. También hay disponibles algoritmos informáticos para la optimización de codones de una secuencia particular para la expresión en una célula hospedadora particular, tal como Gene Forge (Aptagen; Jacobus, PA).

FUNCIONALIDAD DE LOS POLIPÉPTIDOS VARIANTES

Como se usa en el presente documento, una "porción biológicamente activa" es una porción que conserva al menos una función (por ejemplo, completamente, parcialmente, mínimamente) del polipéptido precursor (por ejemplo, un dominio "mínimo" o "central"). En algunas realizaciones, el polipéptido variante conserva la actividad enzimática al menos tan activa como la del polipéptido precursor. En consecuencia, en algunas realizaciones, un polipéptido variante tiene una actividad enzimática mayor que la del polipéptido precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante tiene actividad nucleasa reducida o es un polipéptido de nucleasa muerta. Como se usa en el presente documento, los residuos catalíticos de un polipéptido descritos en el presente documento comprenden D328 y E530. En algunas realizaciones, un polipéptido variante que comprende una sustitución en D328 y E530 (por ejemplo, D328A y E530A)

presenta una actividad nucleasa reducida o ninguna actividad nucleasa con respecto a un polipéptido precursor. En algunas realizaciones, un polipéptido variante que comprende una sustitución en D684, D646 o D621 (por ejemplo, D684A, D646A o D621A) presenta una actividad nucleasa reducida o ninguna actividad nucleasa con respecto a un polipéptido precursor.

5 En un aspecto, la invención proporciona métodos para introducir una alteración o mutación en la secuencia polipeptídica precursora para potenciar la formación de complejos binarios, actividad de unión de la guía de ARN, y/o especificidad de unión a la guía de ARN.

En un aspecto, la invención también proporciona métodos para introducir una alteración o mutación en la secuencia polipeptídica precursora para mejorar la formación de complejo ternario, afinidad de unión
 10 en la diana, actividad de unión en la diana, unión en la diana, y/o especificidad de unión en la diana. En un aspecto, la invención también proporciona métodos para introducir una alteración o mutación en la secuencia polipeptídica precursora para mejorar la afinidad de unión en la diana (por ejemplo, afinidad o tiempo que lleva interactuar con la diana), actividad de unión en la diana, unión en la diana (por ejemplo, fuerza de interacción con la diana) y/o especificidad de unión en la diana (por ejemplo, preferencia por la
 15 diana específica) de un complejo binario (por ejemplo, ribonucleoproteína). En algunas realizaciones, una alteración o mutación se introduce a la secuencia polipeptídica principal para producir un polipéptido variante que tiene mayor actividad y/o unión en la diana. Además, en tales realizaciones, la unión y/o actividad fuera de la diana puede disminuirse en el polipéptido variante, en comparación con el polipéptido principal. Además, puede aumentar o disminuir la especificidad de unión en la diana frente a la unión fuera
 20 de la diana. En algunas realizaciones, una alteración o mutación se introduce a la secuencia polipeptídica principal para producir un polipéptido variante, que cuando se compleja con un ARN guía, tiene mayor unión en la diana. Además, en tales realizaciones, la unión fuera de la diana puede disminuirse en el complejo que comprende el polipéptido variante y guía de ARN. Además, puede aumentar o disminuir la especificidad de unión/actividad en la diana frente a la unión/actividad fuera de la diana. En determinadas
 25 realizaciones, una alteración o mutación se introduce a la secuencia polipeptídica principal para producir un polipéptido variante que mejora la estabilidad y/o interacciones de proteína-ARN. En determinadas realizaciones, el polipéptido variante incluye al menos una alteración que promueve la estabilidad y/o interacciones de ARN así como actividad enzimática del polipéptido variante en comparación con un polipéptido precursor.

30 En algunas realizaciones, el polipéptido variante de la presente invención tiene una actividad enzimática equivalente o mayor que la del polipéptido precursor. En algunas realizaciones, el polipéptido variante de la presente invención tiene actividad enzimática a un intervalo de temperatura de aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 90 °C. En algunas realizaciones, el polipéptido variante de la presente invención tiene actividad enzimática a una temperatura de aproximadamente 20 °C a
 35 aproximadamente 25 °C o a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración que potencia la afinidad por ARN (por ejemplo, afinidad por el ARN), en comparación con un polipéptido precursor. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una afinidad por el ARN potenciada, en comparación

con un polipéptido precursor, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una afinidad por el ARN potenciada, en comparación con un polipéptido precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 8.6 (por ejemplo, de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 8.0, de aproximadamente 7.8 a 8.3 o de aproximadamente 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una afinidad por el ARN potenciada, en comparación con un polipéptido precursor, cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un polipéptido precursor. En una realización, el polipéptido variante presenta una afinidad por el ARN potenciada cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración que potencia la formación de complejos con una guía de ARN (por ejemplo, formación de complejos binarios), en comparación con un polipéptido precursor. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una afinidad de complejo binario potenciado, en comparación con un polipéptido precursor, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una formación de complejo binario potenciado, en comparación con un polipéptido precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de alrededor de 7.3 a alrededor de 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una formación de complejos binarios potenciada, en comparación con un polipéptido precursor, cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un polipéptido precursor. En una realización, el polipéptido variante presenta una formación de complejos binarios potenciada cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración que potencia la actividad de unión a una guía de ARN, en comparación con un polipéptido precursor. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una actividad de unión a la guía de ARN potenciada, en comparación con un polipéptido precursor, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta actividad de unión a guía de ARN potenciada, en comparación con un polipéptido precursor, en

un tampón que tiene un pH en un intervalo de alrededor de 7.3 a alrededor de 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una actividad de unión a una guía de ARN potenciada, en comparación con un polipéptido precursor, cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un polipéptido precursor. En una realización, el polipéptido variante presenta una actividad de unión a una guía de ARN potenciada cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración que potencia la especificidad de unión a una guía de ARN, en comparación con un polipéptido precursor. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una especificidad de unión a la guía de ARN potenciada, en comparación con un polipéptido precursor, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta especificidad de unión a guía de ARN potenciada, en comparación con un polipéptido precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de alrededor de 7.3 a alrededor de 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una especificidad de unión a una guía de ARN potenciada, en comparación con un polipéptido precursor, cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un polipéptido precursor. En una realización, el polipéptido variante presenta una especificidad de unión a una guía de ARN potenciada cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración que potencia las interacciones proteína-ARN, en comparación con un polipéptido precursor. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta interacciones proteína-ARN potenciadas, en comparación con un polipéptido precursor, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta interacciones proteína-ARN potenciadas, en comparación con un polipéptido precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de alrededor de 7.3 a alrededor de 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta interacciones proteína-ARN potenciadas, en comparación con un polipéptido precursor, cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un polipéptido precursor. En una realización, el polipéptido variante presenta interacciones proteína-ARN

potenciadas cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración que potencia la estabilidad de la proteína, en comparación con un polipéptido precursor. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta estabilidad proteica potenciada, en comparación con un polipéptido precursor, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta estabilidad proteica potenciada, en comparación con un polipéptido precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de alrededor de 7.3 a alrededor de 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta estabilidad proteica potenciada, en comparación con un polipéptido precursor, cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un polipéptido precursor. En una realización, el polipéptido variante presenta estabilidad proteica potenciada cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración que disminuye la disociación de una guía de ARN (por ejemplo, disociación de complejo binario), en comparación con un polipéptido precursor. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una disociación disminuida de una guía de ARN, en comparación con un polipéptido original, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una disociación disminuida de una guía de ARN, en comparación con un polipéptido precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de alrededor de 7.3 a alrededor de 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una disociación disminuida de una guía de ARN, en comparación con un polipéptido precursor, cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un polipéptido precursor. En una realización, el polipéptido variante presenta una disociación disminuida de una guía de ARN cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una disociación disminuida de una guía de ARN, en comparación con un polipéptido precursor, a lo largo de un periodo de incubación de al menos aproximadamente uno cualquiera de 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 35 minutos, 40 minutos, 45 minutos, 50 minutos, 55 minutos, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h o más horas. En algunas

realizaciones, un complejo de ribonucleoproteína (RNP) variante no intercambia la guía de ARN con un ARN diferente.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración que potencia la formación de complejos ternarios con una guía de ARN y un ácido nucleico diana, en comparación con un polipéptido precursor. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una afinidad de complejo ternario potenciado, en comparación con un polipéptido precursor, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una formación de complejo ternario potenciado, en comparación con un polipéptido precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de alrededor de 7.3 a alrededor de 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el polipéptido variante presenta una formación de complejos ternarios potenciados, en comparación con un polipéptido precursor, cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un polipéptido precursor. En una realización, el polipéptido variante presenta una formación de complejos ternarios potenciados cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración de modo que un complejo binario que comprende el polipéptido variante (por ejemplo, un complejo binario variante) presenta una afinidad de unión potenciada con un ácido nucleico diana, en comparación con un complejo binario precursor. En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una afinidad de unión potenciada a un ácido nucleico diana, en comparación con un complejo binario precursor, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una afinidad de unión potenciada a un ácido nucleico diana, en comparación con un complejo binario precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una afinidad de unión potenciada con un ácido nucleico diana, en comparación con un complejo binario precursor, cuando el valor de T_m del complejo binario variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un complejo binario precursor. En una realización, el complejo binario variante presenta una afinidad de unión potenciada a un ácido nucleico diana cuando el valor de T_m del complejo binario variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del complejo binario precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración de modo que un complejo binario que comprende el polipéptido variante (por ejemplo, un complejo binario variante)

presenta una actividad de unión potenciada en la diana, en comparación con un complejo binario precursor. En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una mayor actividad de unión en la diana, en comparación con un complejo binario precursor, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una mayor actividad de unión en la diana, en comparación con un polipéptido precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de alrededor de 7.3 a alrededor de 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una actividad de unión en la diana potenciada, en comparación con un complejo binario precursor, cuando el valor de T_m del complejo binario variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un complejo binario precursor. En una realización, el complejo binario variante presenta una actividad de unión en la diana potenciada cuando el valor de T_m del complejo binario variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del complejo binario precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración de modo que un complejo binario que comprende el polipéptido variante (por ejemplo, un complejo binario variante) presenta una especificidad de unión potenciada en la diana, en comparación con un complejo binario precursor. En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una especificidad de unión en la diana potenciada, en comparación con un complejo binario precursor, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el complejo binario variante una especificidad de unión en la diana potenciada, en comparación con un complejo binario precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una especificidad de unión en la diana potenciada, en comparación con un complejo binario precursor, cuando el valor de T_m del complejo binario variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un complejo binario precursor. En una realización, el complejo binario variante presenta una especificidad de unión en la diana potenciada cuando el valor de T_m del complejo binario variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del complejo binario precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración de modo que un complejo binario que comprende el polipéptido variante (por ejemplo, un complejo binario variante) presenta una unión fuera de la diana disminuida a un ácido nucleico no diana, en comparación con un complejo binario precursor. En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una menor unión fuera de la diana a un ácido nucleico no diana, en comparación con un complejo binario precursor, a

una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una menor unión fuera de la diana a un ácido nucleico no diana, en comparación con un complejo binario precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una unión fuera de la diana disminuida a un ácido nucleico no diana, en comparación con un complejo binario precursor, cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un polipéptido precursor. En una realización, el complejo binario variante presenta una unión fuera de la diana reducida a un ácido nucleico no diana cuando el valor de T_m del complejo binario variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración de modo que un complejo binario que comprende el polipéptido variante (por ejemplo, un complejo binario variante) presenta una disociación disminuida del ácido nucleico diana, en comparación con un complejo binario precursor. En algunas realizaciones, el complejo binario variante exhibe una disociación disminuida del ácido nucleico diana, en comparación con un complejo binario precursor, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el complejo binario variante exhibe una disociación disminuida del ácido nucleico diana, en comparación con un complejo binario precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una disociación disminuida del ácido nucleico diana, en comparación con un complejo binario precursor, cuando el valor de T_m del polipéptido variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un polipéptido precursor. En una realización, el complejo binario variante presenta una disociación disminuida del ácido nucleico diana cuando el valor de T_m del complejo binario variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del polipéptido precursor.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante comprende al menos una alteración de modo que un complejo ternario que comprende el polipéptido variante (por ejemplo, un complejo ternario variante) presenta una estabilidad potenciada, en comparación con un complejo ternario precursor. En algunas realizaciones, el complejo ternario variante presenta una estabilidad potenciada, en comparación con un complejo ternario precursor, a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C,

56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C o 65 °C. En algunas realizaciones, el complejo binario variante una estabilidad potenciada, en comparación con un complejo ternario precursor, en un tampón que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 8.6 (por ejemplo, alrededor de 7.5 a alrededor de 8.0, alrededor de 7.8 a 8.3, o alrededor de 8.0 a 8.6). En algunas realizaciones, el complejo ternario variante presenta una estabilidad potenciada, en comparación con un complejo ternario precursor, cuando el valor de T_m del complejo ternario variante es al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C o 20 °C superior al valor de T_m de un complejo ternario precursor. En una realización, el complejo ternario variante presenta una estabilidad potenciada cuando el valor de T_m del complejo ternario variante es al menos 8 °C superior al valor de T_m del complejo ternario precursor.

En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida y (b) una afinidad por el ARN potenciada con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) una afinidad por el ARN potenciada, con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) una afinidad por el ARN potenciada con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida y (b) una formación de complejos binarios potenciada con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) una formación de complejos binarios potenciada con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) una formación de complejos binarios potenciada con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida y (b) una actividad de unión a una guía de ARN potenciada con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) una actividad de unión a una guía de ARN potenciada, con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) una actividad de unión a una guía de ARN potenciada con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida y (b) una especificidad de unión a una guía de ARN potenciada con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) una especificidad de unión a una guía de ARN potenciada, con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) una especificidad de unión a una guía de ARN potenciada con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida y (b) interacciones proteína-ARN potenciadas con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) interacciones proteína-ARN potenciadas con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) interacciones proteína-ARN potenciadas con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el

presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

5 En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida y (b) una estabilidad de la proteína potenciada, con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) una
10 estabilidad de la proteína potenciada, con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) una estabilidad de la proteína potenciada, con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el presente
15 documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la
20 SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida y (b) una disociación disminuida de una guía de ARN con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) una disociación disminuida de una guía de ARN, con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID
25 NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) una disociación disminuida de una guía de ARN con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente
30 el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la
SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida
35 y (b) una formación de complejos ternarios potenciados con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) una formación de complejos ternarios potenciados con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID

NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) una formación de complejos ternarios potenciados con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida y (b) una afinidad de unión potenciada a un ácido nucleico diana, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) una afinidad de unión potenciada a un ácido nucleico diana, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) una afinidad de unión potenciada a un ácido nucleico diana, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida y (b) una actividad de unión en la diana potenciada, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) una actividad de unión en la diana potenciada, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) una actividad de unión en la diana potenciada, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el

92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida y (b) una especificidad de unión en la diana potenciada, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) una especificidad de unión en la diana potenciada, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) una especificidad de unión en la diana potenciada, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida y (b) una unión fuera de la diana disminuida a un ácido nucleico no diana, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) una unión fuera de la diana disminuida a un ácido nucleico no diana, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) una unión fuera de la diana disminuida a un ácido nucleico no diana, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática disminuida y (b) una disociación disminuida del ácido nucleico diana, con

respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática aumentada y (b) una disociación disminuida del ácido nucleico diana, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se introduce al menos una alteración en el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3 para producir un polipéptido variante que forma un complejo binario variante que presenta (a) una actividad enzimática conservada y (b) una disociación disminuida del ácido nucleico diana, con respecto a un complejo binario precursor que comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido variante que tiene una característica tal como se describe en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o 100% de identidad con un polipéptido que comprende una sustitución de la Tabla 2 y/o sustituciones de la Tabla 3.

GUÍA DE ARN

En algunas realizaciones, una composición o complejo tal como se describe en el presente documento comprende un resto de direccionamiento (por ejemplo, un ARN guía, antisentido, oligonucleótidos, conjugados de péptido oligonucleótido) que se une al ácido nucleico diana e interactúa con el polipéptido variante. El resto de direccionamiento puede unirse a un ácido nucleico diana (por ejemplo, con una afinidad de fuera de la diana al ácido nucleico diana).

En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento comprende, o es, una guía de ARN. En algunas realizaciones, la guía de ARN dirige el polipéptido variante descrito en el presente documento a una secuencia de ácido nucleico particular. Los expertos en la materia que lean los siguientes ejemplos de tipos particulares de guías de ARN comprenderán que, en algunas realizaciones, una guía de ARN es específica de sitio. Es decir, en algunas realizaciones, una guía de ARN se asocia específicamente a una o más secuencias de ácido nucleico diana (por ejemplo, ADN específico o secuencias de ADN genómico) y no a secuencias de ácido nucleico no dirigidas (por ejemplo, ADN no específico o secuencias aleatorias).

En algunas realizaciones, la composición tal como se describe en el presente documento comprende un ARN guía que se asocia con el polipéptido variante descrito en el presente documento y dirige el polipéptido Cas12i2 variante a una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, ADN).

La guía de ARN puede dirigir (por ejemplo, se asocia a, se dirige a, entra en contacto, o se une a) uno o más nucleótidos de una secuencia diana, por ejemplo, una secuencia específica de sitio o una diana específica de sitio. En algunas realizaciones, la ribonucleoproteína variante (por ejemplo, polipéptido de nucleasa CRISPR variante más una guía de ARN) se activa tras la unión a un ácido nucleico diana que es complementario a una secuencia de direccionamiento de ADN en la guía de ARN (por ejemplo, un sustrato específico de la secuencia o ácido nucleico diana).

En algunas realizaciones, una guía de ARN comprende un espaciador que tiene una longitud de aproximadamente 11 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos. Por ejemplo, el segmento de direccionamiento al ADN puede tener una longitud de aproximadamente 11 nucleótidos a

aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 11 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 11 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 11 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 11 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, de aproximadamente 11 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos o de aproximadamente 11 nucleótidos a aproximadamente 19 nucleótidos. Por ejemplo, el espaciador puede tener una longitud de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos, de aproximadamente 19 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos o de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos.

En algunas realizaciones, en general, el espaciador de la guía de ARN puede diseñarse para que tenga una longitud de entre 11 y 50 nucleótidos (por ejemplo, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 nucleótidos) y sea complementario a una secuencia de ácido nucleico diana específica. En algunas realizaciones particulares, la guía de ARN puede diseñarse para que sea complementaria a una cadena de ADN específica, por ejemplo, de un locus genómico. En algunas realizaciones, la secuencia de direccionamiento de ADN se diseña para que sea complementaria a una cadena de ADN específica, por ejemplo, de un locus genómico.

La guía de ARN puede ser sustancialmente idéntica a una cadena complementaria de una secuencia de ácido nucleico de referencia. En algunas realizaciones, la guía de ARN comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 % o al menos aproximadamente un 99.5 % de identidad de secuencia con una cadena complementaria

de una secuencia de ácido nucleico de referencia, por ejemplo, ácido nucleico diana. El porcentaje de identidad entre dos de dichos ácidos nucleicos puede determinarse manualmente mediante inspección de las dos secuencias de ácido nucleico alineadas de manera óptima o usando programas de software o algoritmos (por ejemplo, BLAST, ALIGN, CLUSTAL) usando parámetros convencionales.

5 En algunas realizaciones, la guía de ARN tiene al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al
10 menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o al menos aproximadamente un 99.5 % de identidad de secuencia con una cadena complementaria de un ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, la guía de ARN comprende un espaciador que tiene una longitud de entre 11 y 50 nucleótidos (por ejemplo, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29,
15 30, 31, 32, 33, 34 o 35 nucleótidos) y al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % complementario a un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la guía de ARN comprende una secuencia al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % complementaria a una secuencia de ADN diana. En algunas realizaciones, la guía de ARN comprende una
20 secuencia al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % complementaria a una secuencia genómica diana. En algunas realizaciones, la guía de ARN comprende una secuencia, por ejemplo, secuencia de ARN, que tiene una longitud de hasta el 50 y al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % complementaria a un ácido nucleico diana. En
25 algunas realizaciones, la guía de ARN comprende una secuencia al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % complementaria a una secuencia de ADN diana. En algunas realizaciones, la guía de ARN comprende una secuencia al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % complementaria a una secuencia genómica diana.

30 En determinadas realizaciones, la guía de ARN incluye, consiste esencialmente en, o comprende una secuencia repetitiva directa unida a una secuencia de direccionamiento de ADN. En algunas realizaciones, la guía de ARN incluye una secuencia repetitiva directa y una secuencia de direccionamiento de ADN o una secuencia repetitiva directa y una secuencia de direccionamiento de ADN -secuencia repetitiva directa. En algunas realizaciones, la guía de ARN incluye una secuencia repetitiva directa
35 truncada y una secuencia de direccionamiento de ADN, que es típica de ARNcr procesado o maduro. En algunas realizaciones, el polipéptido variante descrito en el presente documento forma un complejo con la guía de ARN, y la guía de ARN dirige el complejo para asociarse con el ácido nucleico diana específico del sitio que es complementario a al menos una parte de la guía de ARN.

En algunas realizaciones, la secuencia repetitiva directa es al menos el 90% idéntica a una secuencia de la Tabla 4 o una parte de una secuencia de la Tabla 4. En algunas realizaciones, la secuencia repetitiva directa es al menos el 95% idéntica a una secuencia de la Tabla 4 o una parte de una secuencia de la Tabla 4. En algunas realizaciones, la secuencia repetitiva directa es una secuencia de la Tabla 4 o una porción de una secuencia expuesta en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de repetición directa.

Identificador de secuencia	Secuencia de repetición directa
SEQ ID NO: 4	CUUGUUGUAUAUGUCCUUUUAUAGGUAUUAACAAC
SEQ ID NO: 5	CUUGUUGUAUAUACGCUUAUAGGUAUUAACAAC
SEQ ID NO: 6	CUUGUUGUAUAUACGCUUAUAGGUAUUGAACAAC
SEQ ID NO: 7	CUUGUUGUAUAUAUCCUUAUAGAUUAUAAACAGC
SEQ ID NO: 8	CUUGUUGUAUAUAUCCUUAUAGAUGUUGAACAAC
SEQ ID NO: 9	CUUGUUGUAUAUAUCCUUAUAGGUGUUGAACAAC
SEQ ID NO: 10	CUUGUUGUAUAUAUCCUUUUAUGGGUGUAUAACAAC
SEQ ID NO: 11	CUUGUUGUAUAUGUCCUUUUAUAGGUAUUGAACAAC
SEQ ID NO: 12	CUUGUUGUAUAUGUCUUUUAUAGGUAUUGAACAAC
SEQ ID NO: 13	CUUGUUGUGUAUAUCCUUAUAGGUAUUGAACAAC

En algunas realizaciones, la repetición directa comprende una secuencia expuesta como CUUGUUGUN₁UAU (SEQ ID NO: 14), en donde N₁ es A o G. En algunas realizaciones, la repetición directa comprende una secuencia expuesta como UUUUAUN₁GN₂UN₃U (SEQ ID NO: 15), en donde N₁ es A o G, N₂ es A o G, y N₃ es A o G.

En algunas realizaciones, la composición o el complejo descritos en el presente documento incluye uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más) guías de ARN, por ejemplo, una pluralidad de guías de ARN.

En algunas realizaciones, la guía de ARN tiene una arquitectura similar a, por ejemplo las Publicaciones Internacionales N.º WO 2014/093622 y WO 2015/070083, cuyo contenido completo se incorporan en el presente documento por referencia.

A menos que se indique otra cosa, todas las composiciones y complejos y polipéptidos proporcionados en el presente documento se preparan en referencia al nivel activo de esta composición o complejo o polipéptido, y excluyen impurezas, por ejemplo, disolventes residuales o subproductos, que pueden estar presentes en fuentes disponibles en el mercado. Los pesos de los componentes enzimáticos se basan en la proteína activa total. Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso a menos que se indique otra cosa. Todos los porcentajes y relaciones se calculan basándose en la composición total a menos que se indique otra cosa. En la composición ejemplificada, los niveles enzimáticos se expresan por enzima pura en peso de la composición total y, a menos que se especifique otra cosa, los componentes se expresan en peso de las composiciones totales.

Modificaciones

La guía de ARN o cualquiera de las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos variantes puede incluir una o más modificaciones covalentes con respecto a una secuencia de referencia, en particular el polirribonucleótido precursor, que se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

5 Las modificaciones a modo de ejemplo pueden incluir cualquier modificación con respecto al azúcar, la nucleobase, la unión internucleosídica (por ejemplo, a un fosfato de unión/a una unión de fosfodiéster/a la cadena principal del fosfodiéster) y cualquier combinación de los mismos. Algunas de las modificaciones a modo de ejemplo proporcionadas en el presente documento se describen en detalle a continuación.

10 La guía de ARN o cualquiera de las secuencias de ácido nucleico que codifican los componentes de los polipéptidos variantes pueden incluir cualquier modificación útil, tal como al azúcar, la nucleobase, o el enlace internucleósido (por ejemplo a un enlace fosfato/un enlace fosfodiéster/a la estructura principal fosfodiéster). Uno o más átomos de una nucleobase de pirimidina pueden reemplazarse o sustituirse con amino opcionalmente sustituido, tiol opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, metilo o etilo) o halo (por ejemplo, cloro o flúor). En determinadas realizaciones, las modificaciones
15 (por ejemplo, una o más modificaciones) están presentes en cada uno de entre el azúcar y la unión internucleosídica. Las modificaciones pueden ser modificaciones de ácidos ribonucleicos (ARN) a ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos de treosa (TNA), ácidos nucleicos de glicol (GNA), ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o híbridos de los mismos). En el presente documento se describe modificaciones adicionales.

20 En algunas realizaciones, la modificación puede incluir una modificación inducida química o celularmente. Por ejemplo, algunos ejemplos no limitantes de modificaciones de ARN intracelular se describen por Lewis y Pan en "RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions" de Nat Reviews Mol Cell Biol, 2017, 18:202-210.

Pueden existir diferentes modificaciones de azúcar, modificaciones de nucleótidos y/o uniones
25 internucleosídicas (por ejemplo, estructuras de cadena principal) en diversas posiciones de la secuencia. Un experto en la materia apreciará que los análogos de nucleótidos u otras modificaciones pueden ubicarse en cualquier posición o posiciones de la secuencia, de modo que la función de la secuencia no se reduce sustancialmente. La secuencia puede incluir de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 100 % de nucleótidos modificados (o bien con respecto a todo el contenido de nucleótidos, o con respecto a uno o
30 más tipos de nucleótidos, es decir, uno cualquiera o más de A, G, U o C) o cualquier porcentaje intermedio (por ejemplo, del 1 % al 20 %, del 1 % al 25 %, del 1 % al 50 %, del 1 % al 60 %, del 1 % al 70 %, del 1 % al 80 %, del 1 % al 90 %, del 1 % al 95 %, del 10 % al 20 %, del 10 % al 25 %, del 10 % al 50 %, del 10 % al 60 %, del 10 % al 70 %, del 10 % al 80 %, del 10 % al 90 %, del 10 % al 95 %, del 10 % al 100 %, del 20 % al 25 %, del 20 % al 50 %, del 20 % al 60 %, del 20 % al 70 %, del 20 % al 80 %, del 20 % al 90 %, del 20 % al 95 %, del 20 % al 100 %, del 50 % al 60 %, del 50 % al 70 %, del 50 % al 80 %, del 50 % al 90 %, del 50 % al 95 %, del 50 % al 100 %, del 70 % al 80 %, del 70 % al 90 %, del 70 % al 95 %, del 70 % al 100 %, del 80 % al 90 %, del 80 % al 95 %, del 80 % al 100 %, del 90 % al 95 %, del 90 % al 100 % y del 95 % al 100 %).

En algunas realizaciones, las modificaciones del azúcar (por ejemplo, en la posición 2' o la posición 4') o el reemplazo del azúcar en uno o más ribonucleótidos de la secuencia pueden, así como modificaciones de la cadena principal, incluir la modificación o el reemplazo de las uniones fosfodiéster. Los ejemplos específicos de una secuencia incluyen, pero no se limitan a, secuencias que incluyen cadenas principales modificadas o uniones internucleosídicas no naturales tales como modificaciones internucleosídicas, incluyendo la modificación o el reemplazo de las uniones fosfodiéster. Las secuencias que tienen cadenas principales modificadas incluyen, entre otras, aquellas que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Para los fines de la presente solicitud, y como a veces se hace referencia en la técnica, los ARN modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica también pueden considerarse oligonucleósidos. En realizaciones particulares, una secuencia incluirá ribonucleótidos con un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica.

Las cadenas principales de secuencia modificada pueden incluir, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquiles tales como 3'-alquilen fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, aminofosforamidatos-tioramidato-fosfonatos tales como 3'-alquilen fosfonatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5' normales, análogos unidos en 2'-5' de estos y aquellos que tienen polaridad invertida en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos se unen 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre. En algunas realizaciones, la secuencia puede tener carga negativa o positiva.

Los nucleótidos modificados, que pueden incorporarse en la secuencia, pueden modificarse en la unión internucleosídica (por ejemplo, cadena principal de fosfato). En el presente documento, en el contexto de la cadena principal del polinucleótido, los términos "fosfato" y "fosfodiéster" se usan indistintamente. Los grupos fosfato de la cadena principal pueden modificarse reemplazando uno o más átomos de oxígeno por un sustituyente diferente. Además, los nucleósidos y nucleótidos modificados pueden incluir el reemplazo total de un resto fosfato no modificado con otra unión internucleosídica como se describe en el presente documento. Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen, pero no se limitan a, fosforotioato, fosforoselenatos, boranofosfatos, ésteres de boranofosfato, hidrogenofosfonatos, fosforamidatos, fosforodiamidatos, fosfonatos de alquil o arilo y fosfotriésteres. Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos no de unión reemplazados por azufre. El enlazador de fosfato también se puede modificar mediante el reemplazo de un oxígeno de unión con nitrógeno (fosforamidatos unidos por puente), azufre (fosforotioatos unidos por puente) y carbono (fosfonatos de metileno unidos por puente).

El resto fosfato α -tio sustituido se proporciona para conferir estabilidad a los polímeros de ARN y ADN a través de la uniones de la cadena principal de fosforotioato no natural. El ADN y el ARN de fosforotioato tienen una mayor resistencia a las nucleasas y, posteriormente, una semivida más prolongada en un entorno celular.

En realizaciones específicas, un nucleósido modificado incluye un alfa-tio-nucleósido (por ejemplo, 5'-O-(1-tiofosfato)-adenosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-citidina (α -tio-citidina), 5'-O-(1-tiofosfato)-guanosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-uridina o 5'-O-(1-tiofosfato)-pseudouridina).

Se describen en el presente documento otras uniones internucleosídicas que pueden emplearse de acuerdo con la presente invención, incluyendo las uniones internucleosídicas que no contienen un átomo fosforoso.

En algunas realizaciones, la secuencia puede incluir uno o más nucleósidos citotóxicos. Por ejemplo, los nucleósidos citotóxicos pueden incorporarse en la secuencia, tal como una modificación bifuncional. Los nucleósidos citotóxicos pueden incluir, pero no se limita a, arabinósido de adenosina, 5-azacitidina, 4'-tio-aracitidina, ciclopentenilcitosina, cladribina, clofarabina, citarabina, arabinósido de citosina, 1-(2-C-ciano-2-desoxi-beta -D-arabino-pentofuranosil)-citosina, decitabina, 5-fluorouracilo, fludarabina, floxuridina, gemcitabina, una combinación de tegafur y uracilo, tegafur ((RS)-5-fluoro-1-(tetrahidrofuran-2-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona), troxacitabina, tezacitabina, 2'-desoxi-2'-metilidencitidina (DMDC) y 6-mercaptopurina. Los ejemplos adicionales incluyen fosfato de fludarabina, N4-behenoil-1-beta-D-arabinofuranosilcitosina, N4-octadecil-1-beta-D-arabinofuranosilcitosina, N4-palmitoil-1-(2-C-ciano-2-desoxi-beta-D-arabino- pentofuranosil) citosina y P-4055 (éster de ácido 5'-elaídico de citarabina).

En algunas realizaciones, la secuencia incluye una o más modificaciones postranscripcionales (por ejemplo, protección con caperuza, escisión, poliadenilación, corte y empalme, secuencia poli-A, metilación, acilación, fosforilación, metilación de residuos de lisina y arginina, acetilación, y nitrosilación de grupos tiol y residuos de tirosina, etc.). La una o más modificaciones postranscripcionales pueden ser cualquier modificación postranscripcional, tal como cualquiera de las más de cien modificaciones de nucleósidos diferentes que se han identificado en el ARN (Rozenski, J, Crain, P, y McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: 1999 update. Nucl Acids Res 27: 196-197) En algunas realizaciones, el primer ácido nucleico aislado comprende ARN mensajero (ARNm). En algunas realizaciones, el ARNm comprende al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en ribonucleósido de piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tiouridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetil-uridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina, 1-taurinometil-4-tiouridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-desaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-desaza-pseudouridina, dihidrouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina y 4-metoxi-2-tio-pseudouridina. En algunas realizaciones, el ARNm comprende al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-desaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-desaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina y 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina. En algunas realizaciones, el ARNm comprende al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en 2-aminopurina, 2, 6-diaminopurina, 7-desaza-adenina, 7-desaza-8-aza-adenina, 7-desaza-2-aminopurina, 7-desaza-8-aza-2-aminopurina, 7-desaza-2,6-diaminopurina, 7-desaza-8-aza-

2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonil carbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina y 2-metoxi-adenina. En algunas realizaciones, el ARNm comprende al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en inosina, 1-metil-
 5 inosina, wiosina, wibutosina, 7-desaza-guanosina, 7-desaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-desaza-guanosina, 6-tio-7-desaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2, N2-dimetilguanosina, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina y N2, N2-dimetil-6-
 10 tio-guanosina.

La secuencia puede no modificarse uniformemente a lo largo de toda la longitud de la molécula. Por ejemplo, uno o más o todos los tipos de nucleótido (por ejemplo, nucleótidos de origen natural, purina o pirimidina, o uno cualquiera o más o todos de A, G, U, C, I, pU) pueden modificarse uniformemente o no en la secuencia, o en una región de la secuencia predeterminada dada de la misma. En algunas
 15 realizaciones, la secuencia incluye una pseudouridina. En algunas realizaciones, la secuencia incluye una inosina, que puede ayudar al sistema inmunitario a caracterizar la secuencia como ARN endógeno frente a vírico. La incorporación de inosina también puede mediar una estabilidad potenciada del ARN/degradación reducida. Véase, por ejemplo, Yu, Z. et al. (2015) RNA editing by ADAR1 marks dsRNA as "self". Cell Res. 25, 1283-1284, que se incorpora por referencia en su totalidad.

20 **ÁCIDO NUCLEICO DIANA**

Los métodos desvelados en el presente documento son aplicables para una diversidad de ácidos nucleicos diana. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ADN, tal como un locus de ADN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ARN, tal como un locus de ARN o ARNm. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es monocatenario (por ejemplo, ADN monocatenario). En
 25 algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es bicatenario (por ejemplo, ADN bicatenario). En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende regiones tanto monocatenarias como bicatenarias. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es lineal. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es circular. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende uno o más nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados, nucleótidos dañados o análogos de nucleótidos. En algunas
 30 realizaciones, el ácido nucleico diana no se modifica.

El ácido nucleico diana puede tener cualquier longitud, tal como aproximadamente al menos una cualquiera de 100 pb, 200 pb, 500 pb, 1000 pb, 2000 pb, 5000 pb, 10 kb, 20 kb, 50 kb, 100 kb, 200 kb, 500 kb, 1 Mb o más. El ácido nucleico diana también puede comprender cualquier secuencia. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es rico en GC, tal como que tiene al menos aproximadamente uno
 35 cualquiera del 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 % o mayor contenido en GC. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana tiene un contenido en GC de al menos aproximadamente el 70 %, el 80 % o más. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un fragmento rico en GC en un ácido nucleico diana no rico en CG. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana no es rico en GC. En

algunas realizaciones, el ácido nucleico diana tiene una o más estructuras secundarias o estructuras de orden superior. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana no está en un estado condensado, tal como en una cromatina, para hacer que el ácido nucleico diana sea inaccesible por el complejo de polipéptido variante/guía de ARN.

5 En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana está presente en una célula. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana está presente en el núcleo de la célula. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es endógeno a la célula. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ADN genómico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ADN cromosómico. En una realización, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico extracromosómico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico
10 diana es un gen codificante de la proteína o una región funcional del mismo, tal como una región codificante, o un elemento regulador, tal como un promotor, potenciador, una región no traducida en 5' o 3', etc. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un gen no codificante, tal como transposón, miARN, ARNt, ARN ribosómico, ribozima o ARNncl. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un plásmido.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es exógeno a una célula. En algunas
15 realizaciones, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico vírico, tal como ADN vírico o ARN vírico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un plásmido transferido horizontalmente. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana se integra en el genoma de la célula. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana no se integra en el genoma de la célula. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un plásmido en la célula. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana está presente en una
20 matriz extracromosómica.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico aislado, tal como un ADN aislado o un ARN aislado. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana está presente en un entorno sin células. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un vector aislado, tal como un plásmido. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un plásmido ultrapuro.

25 El ácido nucleico diana es un segmento del ácido nucleico diana que se hibrida con la guía de ARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana tiene solamente una copia del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana tiene más de una copia, tal como al menos aproximadamente una cualquiera de 2, 3, 4, 5, 10, 100 o más copias del ácido nucleico diana. Por ejemplo, un ácido nucleico diana que comprende una secuencia repetida en un genoma de un ácido nucleico viral o una bacteria
30 puede dirigirse por la variante ribonucleoproteína.

La secuencia diana es adyacente a un motivo adyacente al protoespaciador o PAM de la divulgación como se describe en el presente documento. El PAM puede estar inmediatamente adyacente a la secuencia diana o, por ejemplo, dentro de un pequeño número (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) de nucleótidos de la secuencia diana. En el caso de una diana bicatenaria, el resto de direccionamiento (por
35 ejemplo, una guía de ARN) se une a una primera cadena de la diana, y una secuencia de PAM como se describe en el presente documento está presente en la segunda cadena complementaria. En un caso de este tipo, la secuencia de PAM es inmediatamente adyacente a (o dentro de un número pequeño, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de) una secuencia en la segunda cadena que es complementaria a la

secuencia en la primera cadena a la que se une el resto de unión. En algunas realizaciones, la especificidad de secuencia requiere una coincidencia completa de la secuencia espaciadora en la guía de ARN con la cadena no PAM de un ácido nucleico diana. En otras realizaciones, la especificidad de secuencia requiere una coincidencia parcial (contigua o no contigua) de la secuencia espaciadora en la guía de ARN con la cadena no PAM de un ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, la guía de ARN o un complejo que comprende la guía de ARN y un polipéptido variante descrito en el presente documento se une a un ácido nucleico diana en una secuencia definida por la región de complementariedad entre la guía de ARN y el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la secuencia de PAM descrita en el presente documento se ubica directamente en dirección 5' de la secuencia diana del ácido nucleico diana (por ejemplo, directamente 5' de la secuencia diana). En algunas realizaciones, la secuencia de PAM descrita en el presente documento se ubica directamente en 5' de la secuencia diana en la cadena complementaria no espaciadora (por ejemplo, cadena no diana) del ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, los PAM correspondientes a un polipéptido variante de la presente invención incluyen 5'-NTTR-3', 5'-NTTN-3', 5'-RTTR-3', 5'-ATTR-3', o 5'-RTTG-3'. Tal como se usa en la presente, cada N puede ser cualquier nucleótido (por ejemplo, A, G, T o C) o un subconjunto de este (por ejemplo, R (A o G), Y (C o T), K (G o T), B (G, T o C), H (A, C o T). En algunas realizaciones, el PAM comprende 5'-GTTA-3', 5'-TTTG-3', 5'-CTTG-3', 5'-GTTG-3', 5'-TTTA-3', 5'-CTTA-3', 5'-ATTG-3', 5'-ATTA-3', 5'-ACTG-3', 5'-CATA-3', 5'-TTGA-3' o 5'-TATA-3'. En algunas realizaciones, un complejo binario que comprende un polipéptido variante de la presente invención se une a un ácido nucleico diana adyacente a una secuencia 5'-NTTR-3', 5'-NTTN-3', 5'-RTTR-3', 5'-ATTR-3' o 5'-RTTG-3'. En algunas realizaciones, un complejo binario que comprende un polipéptido variante de la presente invención se une a un ácido nucleico diana adyacente a una secuencia 5'-GTTA-3', 5'-TTTG-3', 5'-CTTG-3', 5'-GTTG-3', 5'-TTTA-3', 5'-CTTA-3', 5'-ATTG-3', 5'-ATTA-3', 5'-ACTG-3', 5'-CATA-3', 5'-TTGA-3' o 5'-TATA-3'.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana está presente en una región de fácil acceso del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana está en un exón de un gen diana. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana está a través de una unión exón-intrón de un gen diana. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana está presente en una región no codificante, tal como una región reguladora de un gen. En algunas realizaciones, en donde el ácido nucleico diana es exógeno a una célula, el ácido nucleico diana comprende una secuencia que no se encuentra en el genoma de la célula.

Las condiciones de unión de ADN/ARN adecuadas incluyen condiciones fisiológicas normalmente presentes en una célula. Se conocen en la técnica otras condiciones de unión de ADN/ARN adecuadas (por ejemplo, condiciones en un sistema sin células); véase, por ejemplo, Sambrook, citado anteriormente. La cadena del ácido nucleico diana que es complementaria a y se hibrida con la guía de ARN se denomina la "cadena complementaria" y la cadena del ácido nucleico diana que es complementaria a la "cadena complementaria" (y, por lo tanto, no es complementaria a la guía de ARN) se denomina la "cadena no complementaria" o "cadena no-complementaria".

PREPARACIÓN

En algunas realizaciones, el polipéptido variante de la presente invención puede prepararse (a) cultivando bacterias que producen el polipéptido variante de la presente invención, aislando el polipéptido variante, opcionalmente, purificando el polipéptido Cas12i4 variante, y formando complejos del polipéptido variante con una guía de ARN. El polipéptido variante también puede prepararse mediante (b) una técnica de ingeniería genética conocida, específicamente, aislando un gen que codifica el polipéptido variante de la presente invención de bacterias, construyendo un vector de expresión recombinante, y después transfiriendo el vector en una célula hospedadora apropiada que expresa la guía de ARN para la expresión de una proteína recombinante que forma complejo con la guía de ARN en la célula hospedadora. Como alternativa, el polipéptido variante puede prepararse mediante (c) un sistema de transcripción-traducción acoplado *in vitro* y después forma complejo con la guía de ARN. Las bacterias que pueden usarse para la preparación del polipéptido variante de la presente invención no se limitan particularmente siempre que puedan producir el polipéptido variante de la presente invención. Algunos ejemplos no limitantes de las bacterias incluyen células de *E. coli* descritas en el presente documento.

VECTORES

La presente invención proporciona un vector para expresar el polipéptido variante descrito en el presente documento o pueden incorporarse en un vector ácidos nucleicos que codifican la variante descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, un vector de la invención incluye una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido variante. En algunas realizaciones, un vector de la invención incluye una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido variante.

La presente invención también proporciona un vector que puede usarse para la preparación del polipéptido variante o composiciones que comprenden el polipéptido variante como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la invención incluye la composición o vector descrito en el presente documento en una célula. En algunas realizaciones, la invención incluye un método para expresar la composición que comprende el polipéptido variante, o vector o ácido nucleico que codifica el polipéptido variante, en una célula. El método puede comprender las etapas de proporcionar la composición, por ejemplo, vector o ácido nucleico, y administrar la composición a la célula.

La expresión de polinucleótidos naturales o sintéticos se logra normalmente uniendo operativamente un polinucleótido que codifica el gen de interés, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido variante, a un promotor e incorporando la construcción en un vector de expresión. El vector de expresión no se limita particularmente siempre que incluya un polinucleótido que codifique el polipéptido variante de la presente invención y pueda ser adecuado para la replicación e integración en células eucariotas.

Los vectores de expresión típicos incluyen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de inicio y promotores útiles para la expresión del polinucleótido deseado. Por ejemplo, pueden usarse vectores plasmídicos que portan una secuencia de reconocimiento para la ARN polimerasa (pSP64, pBluescript, etc.). Los vectores que incluyen los derivados de retrovirus tales como los lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia génica a largo plazo, ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los ejemplos de vectores incluyen

vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sonda y vectores de secuenciación. El vector de expresión puede proporcionarse a una célula en la forma de un vector vírico.

La tecnología de vectores víricos se conoce bien en la técnica descrita en una diversidad de manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a, virus de fagos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasa de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables.

El tipo de vector no se limita particularmente, y puede seleccionarse de manera apropiada un vector que se puede expresar en células hospedadoras. Para ser más específicos, dependiendo del tipo de célula hospedadora, se selecciona apropiadamente una secuencia promotora para garantizar la expresión del polipéptido variante del polinucleótido, y esta secuencia promotora y el polinucleótido se insertan en cualquiera de los diversos plásmidos, etc. para la preparación del vector de expresión.

Los elementos promotores adicionales, por ejemplo, secuencias potenciadoras, regulan la frecuencia de inicio de la transcripción. Normalmente, se ubican en la región 30-110 pb en dirección 5' del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que varios promotores también contienen elementos funcionales en dirección 3' del sitio de inicio. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden actuar de forma cooperativa o independientemente para activar la transcripción.

Además, la divulgación no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la divulgación. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular que puede activar la expresión de la secuencia polinucleotídica a la que está unida operativamente cuando se desea dicha expresión o desactivar la expresión cuando no se desea la expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

El vector de expresión que ha de introducirse también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células de expresión de la población de células que se busca transfectar o infectar a través de vectores víricos. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede portarse en un trozo independiente de ADN y usarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los genes indicadores como los marcadores seleccionables pueden estar flanqueados por secuencias de control transcripcionales apropiadas para permitir la expresión en las células hospedadoras. Los ejemplos de un marcador de este tipo incluyen un gen de dihidrofolato reductasa y un gen de resistencia a neomicina para cultivo de células eucariotas; y un gen de resistencia a la tetraciclina y un gen de resistencia a la ampicilina para el cultivo de *E. coli* y otras bacterias. Mediante el uso de un marcador de selección de este tipo, puede confirmarse si el polinucleótido que codifica el polipéptido variante de la presente invención se ha transferido a las células hospedadoras y después se ha expresado sin fallos.

El método de preparación de vectores de expresión recombinantes no se limita particularmente y los ejemplos del mismo incluyen métodos que usan un plásmido, un fago o un cósmido.

MÉTODOS DE EXPRESIÓN

La presente invención incluye un método para la expresión de proteínas, que comprende traducir el polipéptido variante descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, una célula hospedadora descrita en el presente documento se usa para expresar el polipéptido variante. La célula hospedadora no se limita particularmente, y pueden usarse preferentemente diversas células conocidas. Los ejemplos específicos de la célula hospedadora incluyen bacterias tales como de *E. coli*, levaduras (levadura de gemación, *Saccharomyces cerevisiae*, y levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe*), nematodos (*Caenorhabditis elegans*), ovocitos de *Xenopus laevis*, y células animales (por ejemplo, células CHO, células COS y células HEK293). El método para transferir el vector de expresión descrito anteriormente a las células hospedadoras, es decir, el método de transformación, no se limita particularmente, y pueden usarse métodos conocidos tales como la electroporación, el método del fosfato de calcio, el método del liposoma y el método de dextrano DEAE.

Después de que un hospedador se transforma con el vector de expresión, las células hospedadoras pueden cultivarse o reproducirse para la producción del polipéptido variante. Después de la expresión del polipéptido variante, las células hospedadoras pueden recogerse y el polipéptido variante puede purificarse de los cultivos etc. de acuerdo con métodos convencionales (por ejemplo, filtración, centrifugación, disrupción celular, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, etc.).

En algunas realizaciones, los métodos para la expresión del polipéptido variante comprenden la traducción de al menos 5 aminoácidos, al menos 10 aminoácidos, al menos 15 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos, al menos 200 aminoácidos, al menos 250 aminoácidos, al menos 300 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos, al menos 500 aminoácidos, al menos 600 aminoácidos, al menos 700 aminoácidos, al menos 800 aminoácidos, al menos 900 aminoácidos o al menos 1000 aminoácidos del polipéptido variante. En algunas realizaciones, los métodos para la expresión de la proteína comprenden la traducción de aproximadamente 5 aminoácidos, aproximadamente 10 aminoácidos, aproximadamente 15 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 150 aminoácidos, aproximadamente 200 aminoácidos, aproximadamente 250 aminoácidos, aproximadamente 300 aminoácidos, aproximadamente 400 aminoácidos, aproximadamente 500 aminoácidos, aproximadamente 600 aminoácidos, aproximadamente 700 aminoácidos, aproximadamente 800 aminoácidos, aproximadamente 900 aminoácidos, aproximadamente 1000 aminoácidos o más del polipéptido variante.

Puede usarse una diversidad de métodos para determinar el nivel de producción de un polipéptido variante maduro en una célula hospedadora. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, métodos que utilizan anticuerpos o bien policlonales o monoclonales específicos para el polipéptido variante o un marcador de marcaje como se describe en otra parte en el presente documento. Los métodos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA),

radioinmunoensayos (MA), inmunoensayos fluorescentes (FIA), y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Estos y otros ensayos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Maddox et al., J. Exp. Med. 158:1211 [1983]).

La presente divulgación proporciona métodos de expresión *in vivo* del polipéptido variante en una célula, que comprenden proporcionar un polirribonucleótido que codifica el polipéptido variante a una célula hospedadora en donde el polirribonucleótido codifica el polipéptido variante, expresar el polipéptido variante en la célula y obtener el polipéptido variante de la célula.

INTRODUCCIÓN DE ALTERACIÓN O MUTACIÓN

Las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos variantes o polipéptidos variantes pueden generarse mediante métodos de síntesis conocidos en la técnica. Usando la secuencia de ácido nucleico que codifica el propio polipéptido precursor como marco, pueden insertarse alternancias o mutaciones una o más a la vez para alterar la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido precursor. Del mismo modo, el polipéptido precursor puede alterarse o mutarse introduciendo los cambios en la secuencia del polipéptido a medida que se sintetiza sintéticamente. Esto puede lograrse mediante métodos bien conocidos en la técnica.

La producción e introducción de una alteración o mutación en una secuencia polipeptídica precursora puede lograrse usando cualquier método conocido por los expertos en la materia. En particular, en algunas realizaciones, pueden usarse cebadores de oligonucleótidos para PCR para la síntesis rápida de un molde de ADN que incluye una o más alteraciones o mutaciones en la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido variante. También puede usarse mutagénesis específica de sitio como una técnica útil en la preparación de péptidos individuales, o proteínas o péptidos equivalentes biológicamente funcionales, mediante mutagénesis específica del ADN subyacente. La técnica proporciona además una capacidad inmediata para preparar y someter a ensayo variantes, incorporando una o más de las consideraciones anteriores, mediante la introducción de uno o más cambios en la secuencia de nucleótidos en el ADN. La mutagénesis específica de sitio permite la producción de variantes mediante el uso de secuencias de oligonucleótidos específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador de tamaño y complejidad de secuencia suficientes para formar un dúplex estable a ambos lados de la unión de supresión que se está atravesando. Normalmente, se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud, con aproximadamente 5 a 10 residuos en ambos lados de la unión de la secuencia que se está alterando.

La introducción de variaciones estructurales, tales como la fusión de polipéptidos como extensiones amino y/o carboxilo terminales, puede lograrse de manera similar a la introducción de alteraciones o mutaciones en el polipéptido precursor. Los péptidos adicionales pueden añadirse al polipéptido precursor o al polipéptido variante incluyendo la secuencia de ácido nucleico apropiada que codifica los péptidos adicionales a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido precursor o el polipéptido variante. Opcionalmente, los péptidos adicionales pueden añadirse directamente al polipéptido variante a través de la producción de polipéptidos sintéticos.

En un aspecto, la invención también proporciona métodos para introducir una alteración o mutación en la secuencia polipeptídica precursora para producir un polipéptido variante que tiene una unión en la diana aumentada con dos o más loci (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más) de un ácido nucleico diana, en comparación con un polipéptido precursor.

5 En un aspecto, la invención también proporciona métodos para introducir una alteración o mutación en la secuencia polipeptídica precursora para producir una pluralidad de polipéptidos variantes (por ejemplo, polipéptidos variantes independientes que tienen la misma secuencia de aminoácidos), que cuando forman complejos individualmente con una pluralidad de guías de ARN distintas, tienen una unión en la diana aumentada con dos o más loci de un ácido nucleico diana, en comparación con una pluralidad
10 de polipéptidos precursores y guías de ARN.

En un aspecto, la invención también proporciona métodos para introducir una alteración o mutación en la secuencia polipeptídica precursora para producir un polipéptido variante que tiene una formación de complejos ternarios aumentada en la diana con dos o más loci diana de un ácido nucleico diana, en comparación con un polipéptido precursor.

15 En un aspecto, la invención también proporciona métodos para introducir una alteración o mutación en la secuencia polipeptídica precursora para producir una pluralidad de polipéptidos variantes (por ejemplo, polipéptidos variantes independientes que tienen la misma secuencia de aminoácidos), que cuando forman complejos individualmente con una pluralidad de guías de ARN distintas, tienen una formación de complejos ternarios aumentada con dos o más loci de un ácido nucleico diana, en
20 comparación con una pluralidad de polipéptidos precursores y guías de ARN.

En un aspecto, la invención también proporciona métodos para introducir una alteración o mutación en la secuencia polipeptídica precursora para producir polipéptidos variantes que presentan el direccionamiento de un mayor número de ácidos nucleicos diana o loci diana, en comparación con un polipéptido precursor.

25 En un aspecto, la invención también proporciona métodos para introducir una alteración o mutación en la secuencia polipeptídica precursora para producir una pluralidad de polipéptidos variantes (por ejemplo, polipéptidos variantes independientes que tienen la misma secuencia de aminoácidos), que cuando forman complejos individualmente con una pluralidad de guías de ARN distintas, presentan el direccionamiento de un mayor número de ácidos nucleicos diana o loci diana, en comparación con una
30 pluralidad de polipéptidos precursores y guías de ARN.

En un aspecto, la invención también proporciona métodos para introducir una alteración o mutación en la secuencia polipeptídica precursora para potenciar la estabilidad del polipéptido variante. La estabilidad del polipéptido variante puede determinarse por o puede incluir una técnica no limitada a ensayos de desnaturalización térmica, ensayos de desplazamiento térmico, calorimetría de barrido
35 diferencial (DSC), fluorimetría de barrido diferencial (DSF), calorimetría de titulación isotérmica (ITC), métodos de pulso y caza, métodos de persecución de blanqueamiento, métodos para la persecución de cicloheximida, espectroscopía de dicroísmo circular (CD), ensayos de actividad basados en fluorescencia y cristalización.

COMPLEJO BINARIO VARIANTE

En general, el polipéptido variante y la guía de ARN se unen entre sí en una relación molar de aproximadamente 1:1 para formar el complejo binario variante. El polipéptido variante y la guía de ARN, o bien solos o bien juntos, no son de origen natural.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido variante puede sobreexpresarse en una célula hospedadora y purificarse como se describe en el presente documento, después formar complejo con la guía de ARN (por ejemplo, en un tubo de ensayo) para formar una ribonucleoproteína (RNP) variante (por ejemplo, complejo binario variante).

10 En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una afinidad de unión aumentada a un ácido nucleico diana, una actividad de unión aumentada en la diana, una especificidad de unión aumentada en la diana, una formación de complejos ternarios aumentada con un ácido nucleico diana y/o una estabilidad aumentada en un intervalo de tiempos de incubación. En algunas realizaciones, el complejo binario variante presenta una unión fuera de la diana disminuida a un ácido nucleico no diana y/o una disociación disminuida de un ácido nucleico diana en un intervalo de tiempos de incubación. En algunas
15 realizaciones, el complejo binario variante presenta una formación de complejos de ácido nucleico diana, una actividad del ácido nucleico diana y/o una especificidad del ácido nucleico diana aumentadas en un intervalo de tiempos de incubación.

En algunas realizaciones, la formación de complejo de un complejo binario se produce a una temperatura inferior a aproximadamente una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C,
20 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C o 55 °C. En algunas realizaciones, el polipéptido variante no se disocia de la guía de ARN ni se une a un ARN libre a aproximadamente 37 °C a lo largo de un periodo de incubación de al menos aproximadamente uno cualquiera de 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 35 minutos, 40 minutos, 45 minutos, 50 minutos, 55 minutos, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h o más horas. En
25 algunas realizaciones, después de la formación de complejos binarios, el complejo de ribonucleoproteína variante no intercambia la guía de ARN con un ARN diferente.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante y una guía de ARN forman un complejo en un tampón de formación de complejo binario. En algunas realizaciones, el polipéptido variante se almacena en un tampón que se reemplaza con un tampón de formación de complejo binario para formar un complejo
30 con la guía de ARN. En algunas realizaciones, el polipéptido variante se almacena en un tampón de formación de complejo binario.

En algunas realizaciones, el tampón de formación de complejo binario tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 8.6 (por ejemplo, de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 8.0, de aproximadamente 7.8 a 8.3 o de aproximadamente 8.0 a 8.6). En una realización,
35 el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 7.3. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 7.4. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 7.5. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 7.6. En una realización, el pH del tampón de

formación de complejo binario es de aproximadamente 7.7. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 7.8. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 7.9. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 8.0. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 8.1. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 8.2. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 8.3. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 8.4. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 8.5. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo binario es de aproximadamente 8.6.

La termoestabilidad del polipéptido variante puede aumentar en condiciones favorables tales como la adición de una guía de ARN, por ejemplo, la unión de una guía de ARN.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante puede sobreexpresarse y formar complejo con la guía de ARN en una célula hospedadora antes de la purificación como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el ARNm o el ADN que codifica el polipéptido variante se introduce en una célula de modo que el polipéptido variante se expresa en la célula. La guía de ARN, que guía el polipéptido variante hacia el ácido nucleico diana deseado, también se introduce en la célula, ya sea de forma simultánea, separada o secuencial a partir de una única construcción de ARNm o ADN, de modo que se forme el complejo de ribonucleoproteína necesario en la célula.

Evaluación de la estabilidad y la funcionalidad del complejo binario variante

En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos para identificar un complejo de polipéptido variante óptimo/guía de ARN (denominado en el presente documento el complejo binario variante) que incluyen (a) combinar un polipéptido variante y una guía de ARN en una muestra para formar el complejo binario variante; (b) medir un valor del complejo binario variante; y (c) determinar si el complejo binario variante es óptimo con respecto a la molécula de referencia, si el valor del complejo binario variante es superior a un valor de una molécula de referencia. En algunas realizaciones, el valor puede incluir, pero no se limita a, una medición de estabilidad (por ejemplo, valor de T_m , termoestabilidad), una tasa de formación de complejos binarios, especificidad de unión a una guía de ARN y/o actividad del complejo.

En algunas realizaciones, un complejo de polipéptido variante óptimo/guía de ARN (es decir, un complejo binario variante) se identifica por las etapas de: (a) combinar un polipéptido variante y una guía de ARN en una muestra para formar el complejo binario variante; (b) detectar un valor de T_m del complejo binario variante; y (c) determinar que el complejo binario variante es estable si el valor de T_m del complejo binario variante es superior a un valor de T_m de una molécula de referencia o un valor de referencia de T_m en al menos 8 °C.

Los métodos que implican una etapa de medir la termoestabilidad de un complejo polipéptido variante/guía de ARN (es decir, un complejo binario variante) pueden incluir, sin limitación, métodos para determinar la estabilidad de un complejo binario variante, métodos para determinar una condición que

promueve un complejo binario variante estable, métodos para seleccionar un complejo binario variante estable y métodos para identificar un ARNg óptimo para formar un complejo binario variante estable. En determinadas realizaciones, puede medirse un valor de termoestabilidad de un complejo binario variante.

Adicionalmente, en determinadas realizaciones, también puede medirse un valor de termoestabilidad de una molécula de referencia. En determinadas realizaciones, puede determinarse que un complejo binario variante es estable si el valor de termoestabilidad medido del complejo binario variante es superior al valor de termoestabilidad medido de la molécula de referencia o un valor de referencia de termoestabilidad, medido en las mismas condiciones experimentales, como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, la molécula de referencia puede ser el polipéptido variante sin una guía de ARN.

En determinadas realizaciones, el valor de termoestabilidad que se mide puede ser un valor de temperatura de desnaturalización. En estas realizaciones, el valor de referencia de termoestabilidad es un valor de referencia de temperatura de desnaturalización. En determinadas realizaciones, el valor de termoestabilidad que se mide puede ser un valor de T_m . En estas realizaciones, el valor de referencia de termoestabilidad puede ser un valor de referencia de T_m . En determinadas realizaciones, el valor de termoestabilidad puede medirse usando un ensayo de desplazamiento térmico. En determinadas realizaciones, un ensayo utilizado para medir la termoestabilidad puede implicar una técnica descrita en el presente documento incluyendo, pero no limitada a, ensayos de desnaturalización térmica, ensayos de desplazamiento térmico, calorimetría de barrido diferencial (DSC), fluorimetría de barrido diferencial (DSF), calorimetría de titulación isotérmica (ITC), métodos de persecución de pulso, métodos de persecución de blanqueamiento, métodos de persecución de cicloheximida, espectroscopía de dicroísmo circular (CD), ensayos de actividad basados en fluorescencia y cristalización.

En determinadas realizaciones, puede identificarse un complejo binario variante si la tasa de formación de complejos polipéptido variante/guía de ARN, la especificidad de unión a una guía de ARN y/o la actividad de complejo del complejo binario variante es superior a un valor de la molécula de referencia o el valor de referencia (por ejemplo, un valor de un complejo polipéptido precursor/guía de ARN, denominado en el presente documento un complejo binario precursor). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, puede identificarse el complejo binario variante si el valor de una tasa de formación de complejos polipéptido variante/guía de ARN, una especificidad de unión a una guía de ARN y/o una actividad de complejo del complejo binario variante es al menos un X % superior a un valor de la molécula de referencia o el valor de referencia (por ejemplo, un valor de un complejo binario precursor). En determinadas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además etapas que incluyen medir la actividad del complejo binario variante como se describe en el presente documento.

COMPLEJACIÓN TERNARIA VARIANTE

En algunas realizaciones, el polipéptido variante, la guía de ARN y el ácido nucleico diana, como se describe en el presente documento, forman un complejo ternario variante (por ejemplo, en un tubo de ensayo o célula). En general, el polipéptido variante, la guía de ARN, y el ácido nucleico diana se asocian entre sí en una relación molar de aproximadamente 1:1:1 para formar el complejo ternario variante. El

polipéptido variante, la guía de ARN, y el ácido nucleico diana, o bien solos o bien juntos, no son de origen natural.

En algunas realizaciones, el complejo binario variante (por ejemplo, complejo de polipéptido variante y una guía de ARN) como se describe en el presente documento, forma complejo adicionalmente con el ácido nucleico diana (por ejemplo, en un tubo de ensayo o célula) para formar un complejo ternario variante.

En algunas realizaciones, la formación de complejo del complejo ternario se produce a una temperatura inferior a una cualquiera de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 50 °C o 55 °C. En algunas realizaciones, el complejo binario variante no se disocia del ácido nucleico diana ni se une a un ácido nucleico libre (por ejemplo, ADN libre) a aproximadamente 37 °C a lo largo de un período de incubación de al menos aproximadamente uno cualquiera de 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 35 minutos, 40 minutos, 45 minutos, 50 minutos, 55 minutos, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h o más horas. En algunas realizaciones, tras la formación del complejo ternario, un complejo binario variante no intercambia el ácido nucleico diana con un ácido nucleico diferente.

En algunas realizaciones, el polipéptido variante, una guía de ARN, y ácido nucleico diana forman complejo en un tampón de formación de complejo ternario. En algunas realizaciones, el polipéptido variante se almacena en un tampón que se reemplaza con un tampón de formación de complejo ternario para formar un complejo con la guía de ARN y ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el polipéptido variante se almacena en un tampón de formación de complejo ternario.

En algunas realizaciones, el complejo binario variante y ácido nucleico diana forman complejo en un tampón de formación de complejo ternario. En algunas realizaciones, el complejo binario variante se almacena en un tampón que se reemplaza con un tampón de formación de complejo ternario para formar un complejo con el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el complejo binario variante se almacena en un tampón de formación de complejo ternario.

En algunas realizaciones, el tampón de formación de complejo ternario tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 8.6 (por ejemplo, de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 8.0, de aproximadamente 7.8 a 8.3 o de aproximadamente 8.0 a 8.6). En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 7.3. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 7.4. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 7.5. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 7.6. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 7.7. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 7.8. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 7.9. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 8.0. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 8.1. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 8.2. En una realización, el pH del

tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 8.3. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 8.4. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 8.5. En una realización, el pH del tampón de formación de complejo ternario es de aproximadamente 8.6.

- 5 La termoestabilidad de un polipéptido variante puede aumentar en condiciones favorables tales como la adición de una guía de ARN y ácido nucleico diana.

Evaluación de la estabilidad y funcionalidad del complejo ternario variante

- En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos para identificar un complejo ternario variante óptimo incluyendo (a) combinar un polipéptido variante, una guía de ARN y un ácido nucleico diana en una muestra para formar el complejo ternario variante; (b) medir un valor del complejo ternario variante; y (c) determinar que el complejo ternario variante es óptimo sobre la molécula de referencia, si el valor del complejo ternario variante es superior al valor de una molécula de referencia. En algunas realizaciones, el valor puede incluir, pero no se limita a, una medición de estabilidad (por ejemplo, valor de T_m , termoestabilidad), una tasa de formación de complejos ternarios, una medición de la afinidad de unión a ADN, una medición de la especificidad de unión a ADN y/o una medición de actividad del complejo (por ejemplo, medición de actividad nucleasa).

- En algunas realizaciones, un complejo ternario variante óptimo se identifica por las etapas de: (a) combinar un polipéptido variante, una guía de ARN y un ácido nucleico diana en una muestra para formar el complejo ternario variante; (b) detectar un valor de T_m del complejo ternario variante; y (c) determinar que el complejo ternario variante es estable si el valor de T_m del complejo ternario variante es superior a un valor de T_m de una molécula de referencia o un valor de referencia de T_m en al menos 8 °C.

- Los métodos que implican una etapa de medir la termoestabilidad de un complejo ternario variante puede incluir, sin limitación, métodos para determinar la estabilidad de un complejo ternario variante, métodos para determinar una condición que promueve un complejo ternario variante estable, métodos para seleccionar un complejo ternario variante estable, y métodos para identificar un complejo binario óptimo para formar un complejo ternario variante estable. En determinadas realizaciones, puede medirse un valor de termoestabilidad de un complejo ternario variante.

- Adicionalmente, en determinadas realizaciones, también puede medirse un valor de termoestabilidad de una molécula de referencia. En determinadas realizaciones, puede determinarse que un complejo ternario variante es estable si el valor de termoestabilidad medido del complejo ternario variante es superior al valor de termoestabilidad medido de la molécula de referencia o un valor de referencia de termoestabilidad, medido en las mismas condiciones experimentales, como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, la molécula de referencia puede ser el polipéptido variante sin una guía de ARN y/o ácido nucleico diana.

- En determinadas realizaciones, el valor de termoestabilidad que se mide puede ser un valor de temperatura de desnaturalización. En estas realizaciones, el valor de referencia de termoestabilidad es un valor de referencia de temperatura de desnaturalización. En determinadas realizaciones, el valor de termoestabilidad que se mide puede ser un valor de T_m . En estas realizaciones, el valor de referencia de

termoestabilidad puede ser un valor de referencia de T_m . En determinadas realizaciones, el valor de termoestabilidad puede medirse usando un ensayo de desplazamiento térmico. En determinadas realizaciones, un ensayo utilizado para medir la termoestabilidad puede implicar una técnica descrita en el presente documento que incluye, pero no se limita a, fluorimetría diferencial de barrido (DSF), calorimetría diferencial de barrido (DSC) o calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

En determinadas realizaciones, un complejo ternario variante puede identificarse si la tasa de formación de complejos ternarios, la afinidad de unión a ADN, la especificidad de unión a ADN y/o la actividad del complejo (por ejemplo, actividad nucleasa) del complejo ternario variante es superior a un valor de la molécula de referencia o el valor de referencia (por ejemplo, un valor de un complejo ternario precursor). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el complejo ternario variante puede identificarse si el valor de una tasa de formación de complejos ternarios, una afinidad de unión a ADN, una especificidad de unión a ADN y/o una actividad de complejo del complejo ternario variante es al menos un X % superior a un valor de la molécula de referencia o el valor de referencia (por ejemplo, un valor de un complejo ternario precursor). En determinadas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además etapas que incluyen medir la actividad del complejo ternario variante como se describe en el presente documento.

Suministro

Las composiciones o complejos descritos en el presente documento pueden formularse, por ejemplo, incluyendo un portador, tal como un portador y/o un portador polimérico, por ejemplo, un liposoma, y administrarse mediante métodos conocidos a una célula (por ejemplo, una planta procariota, eucariota, de mamífero, etc.). Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, transfección (por ejemplo, polímeros catiónicos mediados por lípidos, fosfato de calcio, dendrímeros); electroporación u otros métodos de disrupción de la membrana (por ejemplo, nucleofección), administración vírica (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus, AAV), microinyección, bombardeo con microproyectiles ("cañón génico"), Fugene, carga sónica directa, compresión celular, transfección óptica, fusión de protoplastos, impalefección, magnetofección, transferencia mediada por exosomas, transferencia mediada por nanopartículas lipídicas y cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el método comprende administrar uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican el polipéptido variante, una guía de ARN, ADN donante, etc.), uno o más transcritos de los mismos y/o un complejo polipéptido variante/guía de ARN preformado (es decir, complejo binario variante) a una célula. Los métodos de suministro intracelular a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: virus o agentes similares a virus; métodos de transfección de base química, tales como los que usan fosfato cálcico, dendrímeros, liposomas o polímeros catiónicos (por ejemplo, DEAE-dextrano o polietilénimina); métodos no químicos, tales como microinyección, electroporación, compresión celular, sonoporación, transfección óptica, impalefección, fusión de protoplastos, conjugación bacteriana, suministro de plásmidos o transposones; métodos basados en partículas, tales como el uso de un cañón génico, magnetofección o transfección asistida por imán, bombardeo de partículas; y métodos híbridos, tales como nucleofección. En algunas realizaciones, la presente solicitud proporciona además células

producidas mediante dichos métodos, y organismos (tales como animales, plantas, u hongos) que comprenden o se producen a partir de dichas células.

CÉLULAS

Las polipéptidos, composiciones o complejos descritos en el presente documento pueden administrarse a una diversidad de células. En algunas realizaciones, la célula es una célula aislada. En algunas realizaciones la célula está en cultivo celular. En algunas realizaciones, la célula es ex vivo. En algunas realizaciones, la célula se obtiene de un organismo vivo, y se mantiene en un cultivo celular. En algunas realizaciones, la célula es un organismo unicelular.

En algunas realizaciones, la célula es una célula procariota. En algunas realizaciones, la célula es una célula bacteriana o derivada de una célula bacteriana. En algunas realizaciones, la célula bacteriana no está relacionada con la especie bacteriana de la que deriva el polipéptido precursor. En algunas realizaciones, la célula es una célula de arquea o derivada de una de arquea. En algunas realizaciones, la célula es una célula eucariota. En algunas realizaciones, la célula es una célula vegetal o derivada de una célula vegetal. En algunas realizaciones, la célula es una célula fúngica o derivada de una célula fúngica. En algunas realizaciones, la célula es una célula animal o derivada de una célula animal. En algunas realizaciones, la célula es una célula de invertebrado o derivada de una célula de invertebrado. En algunas realizaciones, la célula es una célula de vertebrado o derivada de una célula de vertebrado. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero o derivada de una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. En algunas realizaciones, la célula es una célula de pez cebra. En algunas realizaciones, la célula es una célula de roedor. En algunas realizaciones, la célula se prepara sintéticamente, a veces denominada célula artificial.

En algunas realizaciones, la célula se obtiene de una estirpe celular. Se conocen en la técnica una amplia diversidad de estirpes celulares para cultivo de tejidos. Los ejemplos de estirpes celulares incluyen, pero sin limitación, 293T, MF7, K562, HeLa y variedades transgénicas de las mismas. Las estirpes celulares están disponibles de una diversidad de fuentes conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Manassas, Va.)). En algunas realizaciones, una célula transfectada con uno o más ácidos nucleicos (tales como vector codificante Ago y ADNg) o complejo de Ago-ADNg descrito en el presente documento se usa para establecer una nueva estirpe celular que comprende una o más secuencias derivadas de vectores para establecer una nueva estirpe celular que comprende modificación al ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, se usan células transfectadas transitoria o no transitoriamente con uno o más ácidos nucleicos (tales como el vector que codifica el polipéptido variante y la guía de ARN) o el complejo polipéptido variante/guía de ARN (es decir, complejo binario variante) descrito en el presente documento, o estirpes celulares derivadas de dichas células, para evaluar uno o más compuestos de ensayo.

En algunas realizaciones, el método comprende introducir en una célula hospedadora uno o más ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un ARN dirigido a ADN (por ejemplo, guía de ARN) y/o el polipéptido variante. En una realización, una célula que comprende una ADN diana es *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que comprenden secuencias

de nucleótidos que codifican un ARN dirigido a ADN (por ejemplo, guía de ARN) y/o el polipéptido variante incluyen vectores de expresión recombinantes, por ejemplo, que incluyen, de modo no taxativo, construcciones de virus adenoasociados, construcciones adenovirales recombinantes, construcciones lentivirales recombinantes, construcciones retrovirales recombinantes y similares.

5 En algunas realizaciones, la célula es una célula primaria. Por ejemplo, pueden hacerse pases de los cultivos de células primarias 0 veces, 1 vez, 2 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces o más. En algunas realizaciones, las células primarias se recogen de un individuo mediante cualquier método conocido. Por ejemplo, los leucocitos pueden recogerse por aféresis, leucocitaféresis, separación por
10 gradiente de densidad, etc. Las células de tejidos tales como piel, músculo, médula ósea, bazo, hígado, páncreas, pulmón, intestino, estómago, etc. pueden recogerse mediante biopsia. Puede usarse una disolución apropiada para la dispersión o suspensión de las células recogidas. En general, dicha disolución puede ser una solución salina equilibrada (por ejemplo, solución salina normal, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina equilibrada de Hank, etc.), convenientemente complementada con suero de ternero fetal u otros factores de origen natural, junto con un tampón aceptable a baja concentración. Los
15 tampones pueden incluir HEPES, tampones de fosfato, tampones de lactato, etc. Las células pueden usarse inmediatamente o pueden almacenarse (por ejemplo, mediante congelación). Las células congeladas pueden descongelarse y pueden reutilizarse. Las células pueden congelarse en un DMSO, suero, tampón medio (por ejemplo, DMSO al 10 %, suero al 50 %, medio tamponado al 40 %) y/o alguna otra dicha disolución común utilizada para conservar las células a temperaturas de congelación.

20 En algunas realizaciones, el polipéptido variante tiene actividad nucleasa que induce roturas bicatenarias o monocatenarias en un ácido nucleico diana, (por ejemplo ADN genómico). La rotura bicatenaria puede estimular vías de reparación del ADN endógeno celular, incluyendo Recombinación Dirigida por Homología (HDR), Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ) o Unión de Extremos no Homólogos Alternativos (A-NHEJ). La NHEJ puede reparar el ácido nucleico diana escindido sin necesidad
25 de un molde homólogo. Esto puede dar como resultado la supresión o inserción de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico diana. La HDR puede producirse con un molde homólogo, tal como el ADN donante. El molde homólogo puede comprender secuencias que son homólogas de las secuencias que flanquean el sitio de escisión del ácido nucleico diana. En algunos casos, HDR puede insertar una secuencia polinucleotídica exógena en el ácido nucleico diana escindido. Las modificaciones del ADN diana debido a
30 NHEJ y/o HDR pueden conducir a, por ejemplo, mutaciones, supresiones, alteraciones, integraciones, corrección de genes, reemplazo de genes, marcaje de genes, activación de transgenes, alteración de genes y/o inactivación de genes.

En algunas realizaciones, el cultivo celular se sincroniza para potenciar la eficiencia de los métodos. En algunas realizaciones, las células en las fases S y G2 se usan para la edición de genes mediada por
35 HDR. En algunas realizaciones, la célula puede someterse al método a cualquier ciclo celular. En algunas realizaciones, el recubrimiento de células reduce significativamente la eficacia del método. En algunas realizaciones, el método se aplica a un cultivo celular a no más de aproximadamente uno cualquiera del 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, o el 70 % de confluencia.

En algunas realizaciones, la unión del complejo polipéptido variante/guía de ARN (es decir, complejo binario variante) al ácido nucleico diana en la célula recluta una o más moléculas celulares endógenas o vías distintas de las vías de reparación del ADN para modificar el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la unión del complejo binario variante bloquea el acceso de una o más moléculas celulares endógenas o vías al ácido nucleico diana, modificando de ese modo el ácido nucleico diana. Por ejemplo, la unión del complejo binario variante puede bloquear la transcripción endógena o la maquinaria de traducción para disminuir la expresión del ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para modificar una molécula de ADN diana en una célula. El método comprende poner en contacto la molécula de ADN diana dentro de una célula con un polipéptido variante descrito en la presente; y un ARN dirigido a ADN de molécula única que comprende, en orden 5' a 3', un primer segmento de nucleótidos que se hibrida con una secuencia diana de la molécula de ADN diana; un enlazador de nucleótidos; y un segundo segmento de nucleótidos que se hibrida con el primer segmento de nucleótidos para formar un dúplex de ARN bicatenario. El polipéptido variante forma un complejo con el ARN dirigido a ADN de molécula única dentro de la célula y se modifica la molécula de ADN diana.

KITS

La invención también proporciona kits que pueden usarse, por ejemplo, para realizar un método descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, los kits incluyen un polipéptido variante de la invención, por ejemplo, una variante de la Tabla 2. En algunas realizaciones, los kits incluyen un polinucleótido que codifica un polipéptido variante de este tipo, y opcionalmente el polinucleótido está comprendido dentro de un vector, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Los kits también pueden incluir opcionalmente una guía de ARN, por ejemplo, como se describe en el presente documento. La guía de ARN de los kits de la invención puede diseñarse para que se dirija a una secuencia de interés, como se conoce en la técnica. La variante de nucleasa CRISPR y la guía de ARN pueden envasarse dentro del mismo vial o en otro recipiente dentro de un kit o puede envasarse en viales independientes o en otros recipientes, cuyo contenido puede mezclarse antes de su uso. Los kits pueden incluir adicionalmente, opcionalmente, un tampón y/o instrucciones para el uso de la variante de nucleasa CRISPR y/o guía de ARN.

Todas las referencias y publicaciones citadas en el presente documento se incorporan en el presente documento por referencia.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente algunas realizaciones de la presente invención pero no pretenden limitar el alcance de la invención; se entenderá por su naturaleza de ejemplo que se pueden usar como alternativa otros procedimientos, metodologías o técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Ejemplo 1 - Modificación por ingeniería de construcciones variantes

En este Ejemplo, se generaron construcciones variantes.

Se construyeron moldes de ADN que comprendían mutaciones únicas a través de dos etapas de PCR usando cebadores mutagénicos directos y mutagénicos inversos pedidos a IDT™ (Integrated DNA Technologies, Inc.). En la primera etapa, se realizaron dos conjuntos de reacciones de PCR en 384 placas para generar dos fragmentos. Las regiones superpuestas de dos fragmentos de PCR contenían las mutaciones únicas deseadas y permitieron el ensamblaje de todo el molde de ADN a través de una segunda PCR. En la segunda etapa, los fragmentos purificados de la primera etapa se usaron como molde para la PCR superpuesta (OL PCR) y los oligos Dir e Inv que se hibridan con la cadena principal del vector como los cebadores de OL PCR. Los moldes de ADN lineales resultantes contenían un promotor T7, un terminador T7 y el marco de lectura abierto para el polipéptido.

Estos moldes de ADN lineales se usaron directamente en un sistema de transcripción y traducción sin células para expresar las variantes de polipéptidos que contienen las mutaciones únicas. Se transfirieron además individualmente las construcciones variantes a vectores de transfección transitorios. Adicionalmente, se prepararon moldes de ADN que comprendían mutaciones combinatorias mediante PCR y posteriormente se transfirieron a vectores de transfección transitoria.

Ejemplo 2 – Ensayo de polarización de fluorescencia para la detección de complejos binarios variantes

En este Ejemplo, la capacidad de un polipéptido de nucleasa de tipo silvestre o variante y una guía de ARN para formar un complejo binario se evalúa a través de un ensayo de polarización de fluorescencia.

Se sintetizan mediante IDT™ fragmentos de ADNmc lineales que comprenden el complemento inverso de la secuencia promotora de la ARN polimerasa T7 en dirección 5' de la secuencia repetitiva directa y la guía de ARN diana de 20 pb deseada. Después, se generan moldes de transcripción *in vitro* (IVT) de ADCbc lineal hibridando un oligo directo de T7 universal (95-4 °C a 5 °C/minuto) con el ADNmc del complemento inverso y se rellenan con el fragmento de Klenow (New England Biolabs®) durante 15 minutos a 25 °C. Después se transcribe la plantilla de IVT resultante en una guía de ARN usando el kit de síntesis de ARN de alto rendimiento HiScribe T7 (New England Biolabs®) a 37 °C durante 4 horas. Después de la transcripción, cada guía de ARN se purifica usando un kit concentrador y de limpieza de ARN (Zymo) y se almacena a -20 °C hasta su uso.

Después, la guía de ARN se marca con 6-carboxifluoresceína (6-FAM) (IDT™). El polipéptido de nucleasa 25 nM (polipéptido de tipo silvestre o variante) en tampón de ensayo 1X (Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), KCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM) se titula con concentraciones crecientes de una guía de ARN marcada (7.5 –250 nM). Se incuban los complejos a 37 °C durante 30 minutos antes de tomar medidas de polarización de fluorescencia usando un lector de microplacas (Infinite 200® Pro, Tecan).

También se investiga la formación de complejos binarios a diferentes temperaturas. Se realizan experimentos de unión adicionales descritos anteriormente de forma isotérmica a 25, 50, 60 y 70 °C.

La formación de un complejo binario tras la titulación de un polipéptido de nucleasa (polipéptido de tipo silvestre o variante) con concentraciones crecientes de una guía de ARN (o la formación de un complejo binario tras la titulación de una guía de ARN con concentraciones crecientes de un polipéptido de nucleasa) da como resultado cambios en la señal de polarización de fluorescencia, en unidades de milipolarización

(mP). Se genera una curva de unión trazando los cambios en la señal de polarización de fluorescencia en un intervalo de concentraciones de una guía de ARN.

Este Ejemplo indica cómo pueden determinarse y compararse las afinidades de unión de los polipéptidos de nucleasa (polipéptido de tipo silvestre o variante) a guías de ARN.

5 **Ejemplo 3 – Ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética de ARN para la detección del complejo binario variante**

Este Ejemplo describe el uso de un EMSA de ARN para determinar la capacidad de un polipéptido de nucleasa (de tipo silvestre o variante) para unirse a una guía de ARN.

10 Las guías de ARN sintético de IDT™ se marcan con un IRDye® 800CW 5' (también conocido como colorante IR800 o IR800) usando el kit de marcaje EndTag 5' (Vector® Laboratories) y maleimida IRDye® 800CW (LI-COR® Biosciences), como se detalló anteriormente en Yan et al., 2018. Después del marcaje, se limpian y se concentran las guías de ARN mediante extracción con fenol cloroformo. Las concentraciones se cuantifican mediante Nanodrop™.

15 Para los ensayos de unión de ARN, se diluyen polipéptidos de nucleasa (polipéptidos de tipo silvestre o variante) a 2.5 µM en tampón de unión 1X (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9. Después, los polipéptidos se diluyen en serie de 2.5 µM a 37.5 µM en tampón de unión 1X. Los polipéptidos se diluyen de nuevo 1:10 en tampón de unión 1X más una guía de ARN marcada con IR800 50 nM y se mezclan minuciosamente. Estas reacciones pueden incluir además 0.5-5 µg de ARNt, que sirve como inhibidor competitivo para disminuir la unión no específica del polipéptido al ARN y, por lo tanto, facilitar determinaciones precisas de unión específica. Se incuban las reacciones a 37 °C durante 1 hora. Se añade 1 µl de azul de bromofenol 100X a las reacciones para la visualización del frente del colorante, después toda la reacción se carga en un gel de retardo de ADN al 6 % (ThermoFisher Scientific™), que funciona durante 90 minutos a 80 V. Se forman imágenes del gel en Licor® Odyssey® CLx.

25 Este ensayo se basa en el principio de que la velocidad a la que el ARN migra a través del gel está determinada por su tamaño. Una muestra de ARN solamente puede migrar una distancia particular. Sin embargo, si el ARN se une a un polipéptido, aparece una banda que representa un complejo de ARN más grande y menos móvil, que se "desplaza hacia arriba" en el gel.

30 Se miden las intensidades de dos tipos de bandas: 1) una banda de ARN solamente y 2) una banda de ARN "desplazada hacia arriba" unida a polipéptido. Si todo el ARN está unido a un polipéptido, solamente se observa una banda desplazada hacia arriba. A medida que disminuye la concentración de polipéptido, la intensidad de la banda desplazada hacia arriba disminuye, mientras que la intensidad de la banda de ARN solo aumenta. En comparación con las afinidades de unión del ARN por los polipéptidos de nucleasa (polipéptidos de tipo silvestre o variante), una mayor afinidad polipéptido/ARN se caracteriza por una unión más específica a concentraciones más bajas de polipéptido.

35 Este Ejemplo indica cómo pueden determinarse y compararse las afinidades de unión de polipéptidos de nucleasa de tipo silvestre a las guías de ARN y las afinidades de unión de los polipéptidos variantes a las guías de ARN.

Ejemplo 4 - Ensayo de Escisión *in vitro* para los Complejos Binarios Variantes

Este Ejemplo describe métodos para preparar RNP de y para determinar actividad bioquímica *in vitro* de RNP.

Los vectores que codifican un polipéptido de tipo silvestre o variante se transforman en *E. coli* BL21 (DE3) (New England Biolabs®) y se expresan en un promotor T7. Las células transformadas se hacen crecer inicialmente durante la noche en 5 mL de caldo de Luria (TEKNOVA™) + kanamicina 50 µg/mL, seguido por inoculación en 1 L de medios de caldo Terrific (TEKNOVA™) + kanamicina 50 µg/mL. Se hacen crecer células a 37°C hasta una DO₆₀₀ de 0.6-0.8, luego se induce la expresión de proteína con IPTG 0.5 mM. Luego se hacen crecer cultivos a 18°C durante 14-18 horas adicionales. Se recogen los cultivos y se sedimentan a través de centrifugación, luego se resuspenden en 1mL de tampón de extracción por 5 g de sedimento celular (HEPES 50 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM, glicerol al 5%, TCEP 0.5 mM). Se lisan las células mediante un disruptor celular (Constant System Limited), luego se centrifugan a 20,000 x g durante 20 minutos a 4°C para clarificar el lisado. Se añade polietilenimina (PEI) al 0.2% al lisado clarificado y se incuba a 4°C con rotación constante de un extremo a otro durante 20 minutos. Luego se centrifuga el lisado de nuevo a 20,000 x g durante 10 minutos. Se purifica el lisado a través de cromatografía de intercambio de iones. Después de la purificación, se procesan las fracciones en geles SDS-PAGE y las fracciones que contienen proteína del tamaño apropiado se agrupan y se concentran usando unidades centrífugas Amicon Ultra15 de 30 kD. Se intercambian las proteínas con tampón en HEPES 12.5 mM pH 7.0, NaCl 120 mM, TCEP 0.5 mM y glicerol al 50%. Luego se miden concentraciones usando Nanodrop (ThermoFisher Scientific™), y se almacenan las proteínas a -20°C.

Se preparan RNP usando una razón de 2:1 de ARNcr sintético (Integrated DNA Technologies) con respecto a proteína. Las RNP se complejan durante 30 minutos a 37 °C en NEBuffer™ 2 1X (NEB2; New England Biolabs®; NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9). Después de la formación de complejos, se diluyen las RNP usando 1X NEB2 como tampón de dilución. Las reacciones Apo (proteína sin ARN guía) se preparan de la misma manera, formando el volumen de ARNcr con H₂O.

Se añade un sustrato de ADNbc diana (Integrated DNA Technologies) a 20 nM a las muestras de RNP y apo. Se mezclan las reacciones a fondo, luego se incuban a 37°C durante 1 hora y luego se extinguen con 1 µL de Proteinasa K 20 mg/ml (ThermoFisher Scientific™). Las reacciones se incubaron durante otros 15 a 50 °C, después la reacción entera se ejecutó en un E-gel de agarosa al 2 % (ThermoFisher Scientific™). Los geles se visualizaron con bromuro de etidio en un Gel Doc™ EZ Gel Imager (BioRad®).

Se miden las intensidades de dos tipos de bandas: 1) una banda de ADN de longitud completa (sin escindir) y 2) una o más bandas de ADN escindidas desplazadas hacia abajo. Se caracteriza un RNP inactivo por una banda de ADN de longitud completa. Una RNP activa produce una o más bandas de ADN escindidas desplazadas hacia abajo. A medida que disminuye la concentración de una RNP activa, aumenta la intensidad de la banda de longitud completa y disminuye la intensidad de la(s) banda(s) escindida(s). En comparación con la actividad de múltiples RNP, una RNP que tiene mayor actividad que otro se caracteriza por bandas escindidas más intensas a concentraciones de RNP más bajas.

El método de este Ejemplo permite la comparación de la actividad de escisión *in vitro* de RNP de tipo natural o variantes (complejos binarios) en el ADN diana.

Ejemplo 5 – Ensayos de estabilidad *in vitro* de polipéptidos variantes y complejos binarios variantes

En este Ejemplo, se evalúa la estabilidad de una RNP variante.

Para el estudio de estabilidad acelerada se generan RNP (5 μ M) de la misma forma que se describe en el Ejemplo 4, y posteriormente se almacenan las muestras a 25 °C durante 48 horas.

Los ensayos de escisión *in vitro* (como se describe en el Ejemplo 4) se realizan en las muestras de RNP. Se comparan estos resultados con los del Ejemplo 4 para determinar el grado en el que las RNP variantes almacenadas a 25 °C durante 48 horas conservan la actividad bioquímica.

También se incubaba el polipéptido Apo (sin guía de ARN) a 25 °C durante 48 horas. Se realizan ensayos de EMSA de ARN en las muestras de apo usando el método descrito en el Ejemplo 3. Se comparan estos resultados con los del Ejemplo 3 para determinar el grado en el que un polipéptido variante es capaz de formar un complejo binario con una guía de ARN.

Las muestras de Apo incubadas a 25 °C durante 48 horas también forman complejo con guías de ARN para formar RNP, usando el método descrito en el Ejemplo 4. Después se realizan ensayos de escisión *in vitro* de acuerdo con los métodos del Ejemplo 4. Se comparan los resultados del ensayo con los del Ejemplo 4 para evaluar los niveles de actividad de RNP variantes formadas con la proteína incubada a 25 °C.

Los métodos de este Ejemplo permiten comparar la estabilidad de los polipéptidos de tipo silvestre y variantes y las RNP (complejos binarios) de tipo silvestre y variantes. Un polipéptido de nucleasa que demuestra una mayor unión específica a una guía de ARN que otro polipéptido de nucleasa a la guía de ARN es indicativo de un polipéptido más estable. Una RNP que demuestra una escisión *in vitro* más robusta de un ADN diana que la escisión por otro RNP es indicativa de un complejo binario más estable.

Ejemplo 6 – Ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética de ADN para la detección del complejo ternario Variante

Este ejemplo describe el uso de un ADN EMSA para determinar la capacidad de un ARN guía, un polipéptido nucleasa (polipéptido de tipo natural o variante) y un sustrato de ADN diana para formar un complejo ternario.

Los vectores que codifican un polipéptido de tipo silvestre o variante se transforman en *E. coli* BL21 (DE3) (New England BioLabs®) y BL21(DE3)pLySS (Novagen®). Las células transformadas se hacen crecer inicialmente durante la noche en 5 mL de caldo Luria (TEKNOVA™) + kanamicina 50 μ g/mL, seguido por inoculación en 1 L de medios de caldo Terrific (TEKNOVA™) + kanamicina 50 μ g/mL. Se hacen crecer células a 37°C hasta una DO₆₀₀ de 0.6-0.8, luego se induce la expresión de proteína con IPTG 0.5 mM. Luego se hacen crecer cultivos a 18°C durante 14-18 horas adicionales. Se recogen los cultivos y se sedimentan a través de centrifugación, luego se resuspenden en 1mL de tampón de extracción por 5 g de sedimento celular (HEPES 50 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM, glicerol al 5%, TCEP 0.5 mM). Se lisan las células mediante un disruptor celular (Constant System Limited), luego se centrifugan a 20,000 x g durante 20 minutos a 4°C para clarificar el lisado. Se añade polietilenimina (PEI) al 0.2% al lisado clarificado y se

incuba a 4°C con rotación constante de un extremo a otro durante 20 minutos. Luego se centrifuga el lisado de nuevo a 20,000 x g durante 10 minutos. Se purifica el lisado a través de cromatografía de intercambio de iones. Después de la purificación, se procesan las fracciones en geles SDS-PAGE y las fracciones que contienen proteína del tamaño apropiado se combinan y se concentran usando unidades centrífugas Amicon® Ultra15 de 30 kD. Se intercambiaron los tampones de las proteínas en HEPES 12.5 mM pH 7.0, NaCl 120 mM, TCEP 0.5 mM y glicerol al 50 %. Después se midieron las concentraciones usando Nanodrop™ (ThermoFisher Scientific™) y las proteínas se almacenaron a -20 °C.

Se preparan RNP usando una relación 2:1 de una guía de ARN sintético (Integrated DNA Technologies, IDT™) con respecto al polipéptido. Las dianas adyacentes a las secuencias de PAM descritas en el presente documento se seleccionan, y las guías de ARN se diseñan usando una secuencia repetitiva directa como se describe en el presente documento. Las RNP se complejan durante 30 minutos a 37 °C en NEBuffer™ 1X (NEB2; New England Biolabs®; NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9). Después de la formación de complejo, se realiza una dilución en serie 1:2 de 5 puntos de 5 µM a 37.5 µM, usando NEB2 1X como tampón de dilución. Las reacciones Apo (polipéptido sin guía de ARN) se preparan de la misma manera, completando el volumen de la guía de ARN con H₂O.

Los sustratos diana de ADNcd se generan mediante PCR a partir de un oligo (Integrated DNA Technologies). Antes de la PCR, el extremo 5' del cebador directo se marca con un colorante IR800, como se describe en Yan et al., 2018. Usando Amplitaq Gold® (ThermoFisher Scientific™), el sustrato de ADNbc se amplifica después con el cebador directo marcado IR800 y el cebador inverso sin marcar. El ADNbc resultante se purifica con un kit concentrador y de limpieza de ARN (Zymo) y se cuantificó mediante Nanodrop™ (ThermoFisher Scientific™).

Las muestras de RNP y las muestras de Apo (control) se diluyen 1:10 en tampón de unión 1X (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, TCEP 1 mM, glicerol al 10 %, EDTA 2 mM, pH 8.0) más sustrato de ADN diana marcado con IR800 20 nM y se mezclaron bien. Se incuban las reacciones a 37 °C durante 1 hora. Se añade azul de bromofenol a las reacciones para la visualización del frente del colorante, después toda la reacción se carga en un gel de retardo de ADN al 6 % (ThermoFisher Scientific™), que funcionó durante 90 minutos a 80 V. Se forman imágenes del gel en Licor® Odyssey® CLx.

En este ensayo, la velocidad a la que el ADN migra a través del gel se determina por su tamaño. Una muestra de ADN solamente escapaz de migrar una distancia particular. Sin embargo, si un RNP se une al ADN, aparece una banda que representa un complejo de ADN más grande y menos móvil, que se "desplaza hacia arriba" en el gel.

Este Ejemplo muestra cómo la afinidad de las RNP variantes (complejos binarios variantes) por las dianas de ADN (para producir un complejo ternario) se puede comparar con la afinidad de las RNP de tipo silvestre (complejos binarios de tipo silvestre por las dianas de ADN).

Ejemplo 7 – Direccionamiento de genes de mamíferos por polipéptidos variantes de combinación

Este Ejemplo describe la evaluación indel en múltiples dianas utilizando efectores de tipo silvestre y variantes (por ejemplo, variantes de nucleasa CRISPR) introducidos en células de mamífero mediante transfección transitoria.

El efector de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 3 (TS) y variantes de nucleasa CRISPR de la SEQ ID NO: 3 se clonaron individualmente en una cadena principal pcda3.1 (Invitrogen). A continuación, los plásmidos se prepararon al máximo y se diluyeron. Las dianas adyacentes a las secuencias de PAM descritas en el presente documento se seleccionaron, y las guías de ARN se diseñaron usando una secuencia repetitiva directa como se describe en el presente documento. La guía de ARN y las secuencias diana se muestran en la Tabla 5. Las guías de ARN se clonaron en una cadena principal pUC19 (New England Biolabs®). A continuación, los plásmidos se prepararon al máximo y se diluyeron.

Tabla 5. Dianas de mamíferos y ARNcr correspondientes.

Identificador de diana	Secuencia de PAM	Secuencia diana	Secuencia de ARNcr
EMX1	5'-ATTG-3'	CCGCCGCTTCCTGAGCCAT C (SEQ ID NO: 16)	CUUGUUGUAUAUGUCCUUUUUAUAG GUAUUAACAACCCGCCGCUUCCU GAGCCAUC (SEQ ID NO: 17)
VEGFA	5'-TTTA-3'	TCCAGACCACCAATGGGCA C (SEQ ID NO: 18)	CUUGUUGUAUAUGUCCUUUUUAUAG GUAUUAACAACUCCAGACCACCA AUGGGCAC (SEQ ID NO: 19)
AAVS1	5'-TTTG-3'	TGAGAATGGTGCGTCCTAG G (SEQ ID NO: 20)	CUUGUUGUAUAUGUCCUUUUUAUAG GUAUUAACAACUGAGAAUGGUGC GUCCUAGG (SEQ ID NO: 28)

Aproximadamente 16 horas antes de la transfección, se sembraron en placa 25,000 células HEK293T en DMEM/FBS al 10 % + Pen/Estrep (medios D10) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. El día de la transfección, las células eran confluentes al 70-90 %. Para cada pocillo que va a transfectarse, se preparó una mezcla de Lipofectamine 2000™ y Opti-MEM™ y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos (Disolución 1). Después de la incubación, la mezcla Lipofectamine 2000™:Opti-MEM™ se agregó a una mezcla separada que contenía plásmido nucleasa, plásmido guía de ARN y Opti-MEM™ (Disolución 2). En el caso de los controles negativos, el plásmido guía de ARN no se incluyó en la Disolución 2. La disolución 1 y la disolución 2 se mezclaron pipeteando hacia arriba y hacia abajo y después se incubaron a temperatura ambiente durante 25 minutos. Después de la incubación, la mezcla de las Disoluciones 1 y 2 se añadió gota a gota a cada pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía las células. Aproximadamente 72 horas después de la transfección, las células se tripsinizaron añadiendo TrypLE™ al centro de cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 5 minutos. Después, se añadieron de medios D10 a cada pocillo y se mezclaron para resuspender las células. Las células resuspendidas se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos para obtener un sedimento, y el sobrenadante se descartó. Luego, el sedimento celular se resuspendió en un tampón QuickExtract™ (Lucigen®) y las células se incubaron a 65 °C durante 15 minutos, 68 °C durante 15 minutos y 98 °C durante 10 minutos.

Se prepararon muestras para la secuenciación de última generación mediante dos ciclos de PCR. El primer ciclo (PCR1) se usó para amplificar regiones genómicas específicas en función de la diana. Se

realizó la PCR del ciclo 2 (PCR2) para añadir adaptadores e índices de Illumina. Después, las reacciones se agruparon y se purificaron mediante purificación en columna. Los ciclos de secuenciación se realizaron usando un kit NextSeq 500/550 Mid o High Output v2.5 de 150 ciclos.

De las primeras treinta y una variantes modificadas, cada una consiste en una única sustitución de arginina con respecto al polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3, veintiséis de las variantes demostraron una mayor actividad indel en comparación con el polipéptido precursor. Siete de los mutantes puntuales de mayor rendimiento se analizaron adicionalmente en combinaciones de dos, tres, cuatro y cinco siguiendo el mismo método descrito anteriormente. Los resultados en las Figuras 1-3 demuestran que las sustituciones P14R, E311R, D32R, I61R, G223R, N109R y/o D719R aumentaron la actividad nucleasa en comparación con el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3.

El polipéptido variante que comprende las sustituciones P14R, E311R y D32R; el polipéptido variante que comprende las sustituciones P14R, E311R y G223R; el polipéptido variante que comprende las sustituciones P14R, E311R, D32R e I61R; y el polipéptido variante que comprende las sustituciones D32R, N109R, E311R y D719R se analizaron adicionalmente para determinar la actividad indel en tres objetivos AAVS1, tres VEGFA y tres EMX1 adicionales. La actividad indel para cada uno de los polipéptidos variantes promediada en las doce dianas fue aproximadamente de 6 a 7 veces mayor en comparación con la actividad indel del polipéptido precursor. La variante que comprende las sustituciones P14R, E311R, D32R e I61R produjo el mayor aumento en la actividad indel de las cuatro variantes sometidas a prueba en el conjunto de doce dianas.

Ejemplo 8 – Direccionamiento de genes de mamíferos por polipéptidos variantes puntuales

Este Ejemplo describe la evaluación de indels en múltiples dianas usando efectores de tipo silvestre y variantes introducidos en células de mamífero por transfección transitoria. Setenta y nueve variantes, cada una de las cuales comprende una única sustitución de glicina con respecto a la SEQ ID NO: 3, se clonaron individualmente en una cadena principal de pcDNA3.1 (Invitrogen), como se describe en el Ejemplo 7. Las guías de ARN y el protocolo de transfección celular fueron como se describe en el Ejemplo 7.

Las siguientes catorce variantes mostraron una mayor actividad indel en todas las dianas en comparación con el polipéptido precursor de la SEQ ID NO: 3: K208G, D302G, D590G, E154G, D567G, L38G, D145G, C13G, T338G, P14G, D55G, K221G, K35G y E736G. La actividad indel para los polipéptidos variantes se muestra en **la Fig. 4**. La actividad indel para cada uno de los variantes promediada en las tres dianas fue aproximadamente de 1.2 a 2.1 veces mayor en comparación con la actividad indel del polipéptido precursor. Cada una de las catorce variantes exhibió una mayor actividad indel en las tres dianas, con la excepción de D590G, que se desempeñó de manera similar al polipéptido precursor en la diana VEGFA. El E736G produjo el mayor aumento en la actividad indel de todas las variantes sometidas a prueba.