

REIVINDICACIONES

1. Una variante de polipéptido 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.
2. El polipéptido variante de la reivindicación 1, en donde 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.
3. El polipéptido variante de la reivindicación 1 o 2, en donde 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.
4. El polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. El polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el polipéptido variante comprende una sustitución en P14 (por ejemplo, una sustitución P14R).
10. El polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el polipéptido variante comprende una sustitución en E311 (por ejemplo, una sustitución E311R).
11. El polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el polipéptido variante comprende una sustitución en D32 (por ejemplo, una sustitución D32R).

12. El polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el polipéptido variante comprende una sustitución en I61 (por ejemplo, una sustitución I61R).

13. El polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el polipéptido variante comprende una sustitución en G223 (por ejemplo, una sustitución G223).

14. El polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el polipéptido variante comprende una sustitución en N109 (por ejemplo, una sustitución N109R).

15. El polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el polipéptido variante comprende una sustitución en D719 (por ejemplo, una sustitución D719R).

16. El polipéptido variante de la reivindicación 5, en donde 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.

17. El polipéptido variante de la reivindicación 16, en donde 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).

18. El polipéptido variante de la reivindicación 16, en donde 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).

19. El polipéptido variante de la reivindicación 16, en donde 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).

20. El polipéptido variante de la reivindicación 16, en donde 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).

21. El polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 5-20, en donde 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.

22. El polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el polipéptido variante presenta una formación de complejos binarios aumentada con una guía de ARN, con respecto a un polipéptido precursor.

23. El polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde un complejo binario que comprende el polipéptido variante presenta una estabilidad aumentada, con respecto a un complejo binario precursor.

24. El polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde el polipéptido variante presenta una actividad nucleasa aumentada, con respecto a un polipéptido precursor.

25. Una composición que comprende el polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, 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.

26. La composición de la reivindicación 25, en donde la secuencia repetitiva directa es al menos un 90% idéntica con una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13 o comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 15.

27. La composición de la reivindicación 25, en donde la secuencia repetitiva directa es al menos un 95% idéntica con una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13 o comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 15.

28. La composición de la reivindicación 25, en donde 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.

29. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 25-28, en donde la secuencia espaciadora comprende de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud.

30. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 25-29, en donde 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).

31. La composición de la reivindicación 30, en donde la secuencia de 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.

32. La composición de la reivindicación 31, en donde la secuencia PAM es 5'-TTG-3', 5'-TTA-3', 5'-ATTG-3', 5'-TTTA-3' o 5'-TTTG-3'.

33. El polipéptido variante o la composición de cualquier reivindicación anterior, en donde el polipéptido variante comprende además una señal de localización nuclear (NLS).

34. El polipéptido variante o la composición de cualquier reivindicación anterior, en donde 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.

35. Una composición que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido variante y/o la guía de ARN de cualquier reivindicación anterior.

36. La composición de la reivindicación 35, en donde el ácido nucleico tiene codones optimizados para la expresión en una célula.

37. La composición de la reivindicación 35 o 36, en donde el ácido nucleico está unido operativamente a un promotor.

38. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 35-37, en donde el ácido nucleico está en un vector.

39. La composición de la reivindicación 38, en donde el vector comprende un vector retrovírico, un vector lentivírico, un vector fágico, un vector adenovírico, un vector adenoasociado o un vector de herpes simple.

40. El polipéptido variante o la composición de cualquier reivindicación anterior, en donde 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.

41. Una célula que comprende el polipéptido variante o la composición de cualquier reivindicación anterior.

42. La célula de la reivindicación 41, en donde la célula es una célula eucariota.

43. La célula de la reivindicación 41 o 42, en donde la célula es una célula de mamífero o una célula vegetal.

44. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 41-43, en donde la célula es una célula humana.

45. 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.

46. La composición de la reivindicación 45, en donde la alteración es una sustitución de la Tabla 2.

47. La composición de la reivindicación 46, en donde 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.

48. La composición de la reivindicación 46 o 47, en donde 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.

49. La composición de la reivindicación 47 o 48, en donde 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.

50. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-49, en donde la actividad enzimática potenciada es la actividad nucleasa potenciada.

51. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-50, en donde el polipéptido variante presenta una actividad de unión potenciada a una guía de ARN, con respecto al polipéptido precursor.

52. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-51, en donde el polipéptido variante presenta una especificidad de unión potenciada a una guía de ARN, con respecto al polipéptido precursor.

53. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-52, en donde 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 actividad de unión potenciada a un ácido nucleico diana (por ejemplo, actividad de unión en la diana), con respecto a un complejo binario precursor.

54. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-53, en donde 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.

55. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-54, en donde 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.

56. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-55, en donde 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.

57. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-56, en donde 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.

58. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-57, en donde 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 a el complejo binario precursor.

59. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-58, en donde 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.

60. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-59, en donde 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.

61. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-60, en donde 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 el intervalo de aproximadamente 7.3 a aproximadamente 8.6.

62. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-61, en donde 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.

63. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-62, en donde el polipéptido variante comprende un dominio RuvC o un dominio RuvC dividido.

64. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-63, en donde el polipéptido precursor comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

65. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-64, en donde la guía de ARN comprende una secuencia repetitiva directa y una secuencia espaciadora.

66. La composición de la reivindicación 65, en donde la secuencia repetitiva directa es al menos un 90% idéntica con una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13 o comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 15.

67. La composición de la reivindicación 65, en donde la secuencia repetitiva directa es al menos un 95% idéntica con una cualquiera de las SEQ ID NO: 4-13 o comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 15.

68. La composición de la reivindicación 65, en donde 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.

69. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 65-68, en donde la secuencia espaciadora comprende entre 15 y 35 nucleótidos de longitud.

70. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 65-69, en donde la secuencia espaciadora comprende complementariedad con una secuencia de cadena diana de un ácido nucleico diana.

71. La composición de la reivindicación 70, en donde el ácido nucleico diana comprende una secuencia de cadena no diana adyacente a una secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM).

72. La composición de la reivindicación 71, en donde la secuencia de 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.

73. La composición de la reivindicación 72, en donde la secuencia PAM es 5'-TTG-3', 5'-TTA-3', 5'-ATTG-3', 5'-TTTA-3' o 5'-TTTG-3'.

74. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-73, en donde 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.

75. Una composición que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido variante de una cualquiera de las reivindicaciones 45-74, en donde opcionalmente el ácido nucleico tiene codones optimizados para la expresión en una célula.

76. La composición de la reivindicación 75, en donde la célula es una célula eucariota.

77. La composición de la reivindicación 75 o 76, en donde la célula es una célula de mamífero o una célula vegetal.

78. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 75-77, en donde la célula es una célula humana.

79. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 75-78, en donde el ácido nucleico que codifica el polipéptido variante se une operativamente a un promotor.

80. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 75-79, en donde el ácido nucleico que codifica el polipéptido variante está en un vector.

81. La composición de la reivindicación 80, en donde el vector comprende un vector retrovírico, un vector lentivírico, un vector fágico, un vector adenovírico, un vector adenoasociado o un vector de herpes simple.

82. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 45-81, en donde la composición está presente en un sistema de administración que comprende una nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula lipídica), un liposoma, un exosoma, una microvesícula, o un cañón génico.

83. 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 una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

84. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-83.

85. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 84, en donde la secuencia de la molécula de ácido nucleico es un 95% idéntica a la seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2 o 21-27.

86. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 84, en donde 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.

87. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 84, en donde la secuencia de la molécula de ácido nucleico es un 95% idéntica a la seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22, 23, o 25.