

Se reivindica lo siguiente:

1. Un polinucleótido, donde el polinucleótido comprende un marco de lectura abierto (ORF), donde el ORF comprende:

una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido Cas9 de *N. meningitidis* (Nme) del extremo C al menos 90 % idéntico a cualquiera de las SEQ ID NO: 29, 32-41, 224-226, 231-233, 238-240, 245-247, 252-254, 259-261, 266-268, 273-275, 280-282, 287-289, 294-296, 301-303, o 316-321, donde Nme Cas9 es una Nme2 Cas9, una Nme1 Cas9 o Nme3 Cas9; y

una secuencia de nucleótidos que codifica una primera señal de localización nuclear (NLS).

2. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde el ORF comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una segunda NLS.

3. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde la primera y segunda NLS se seleccionan independientemente de las SEQ ID NO: 388 y 410-422.

4. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el polinucleótido comprende además una secuencia de poli-A o una secuencia de señal de poliadenilación.

5. El polinucleótido de la reivindicación 4, donde la secuencia de poli-A comprende nucleótidos distintos de adenina.

6. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde la secuencia de poli-A comprende 100-400 nucleótidos.

7. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde la secuencia de poli-A comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 409.

8. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el ORF comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia enlazadora entre la primera NLS y la segunda NLS.

9. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el ORF comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia espaciadora enlazadora entre la secuencia codificante de Nme Cas9 y la NLS proximal a la secuencia codificante de Nme Cas9.

10. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 8-9, donde el enlazador comprende al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 aminoácidos.

11. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, donde la secuencia

enlazadora comprende GGG o GGGS, opcionalmente donde la secuencia GGG o GGGS está en el extremo N de la secuencia espaciadora.

12. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde la secuencia enlazadora comprende una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 61-122.

13. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el ORF comprende además uno o más dominios funcionales heterólogos adicionales.

14. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde Nme Cas9 tiene actividad de endonucleasa de cadena doble.

15. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde Nme Cas9 tiene actividad de nickasa.

16. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde Nme Cas9 comprende un dominio de unión a ADN de dCas9.

17. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde NmeCas9 comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y 4-13, 220, 227, 234, 241, 248, 255, 262, 269, 276, 283, 290, 297, o 310-315.

18. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde NmeCas9 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y 4-13, 220, 227, 234, 241, 248, 255, 262, 269, 276, 283, 290, 297, o 310-315.

19. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde la secuencia que codifica NmeCas9 comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 15, 18-27, 29, 32-41, 221-226, 228-233, 235-240, 242-247, 249-254, 256-261, 263-268, 270-275, 277-282, 284-289, 291-296, 298-303, 304-309, o 316-321.

20. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, donde la secuencia que codifica la NmeCas9 comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 15, 18-27, 29, 32-41, 221-226, 228-233, 235-240, 242-247, 249-254, 256-261, 263-268, 270-275, 277-282, 284-289, 291-296, 298-303, 304-309, o 316-321.

21. Un polinucleótido que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un polipéptido que comprende:

una citidina desaminasa, que es opcionalmente una APOBEC3A desaminasa;

una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de nickasa Cas9 de *N. meningitidis* (Nme) del extremo C al menos 90 % idéntico a cualquiera de las SEQ ID NO:

1 y 4-13, 220, 227, 234, 241, 248, 255, 262, 269, 276, 283, 290, o 297, donde la nickasa Nme Cas9 es una nickasa Nme2 Cas9, una nickasa Nme1 Cas9 o una nickasa Nme3 Cas9; y

una secuencia de nucleótidos que codifica una primera señal de localización nuclear (NLS); donde el polipéptido no comprende un inhibidor de la uracilo glicosilasa (UGI).

22. El polinucleótido de la reivindicación 21, donde el ORF comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una segunda NLS.

23. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 21-22, donde la desaminasa está situada en el extremo N de una NLS en el polipéptido.

24. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 21-23, donde la citidina desaminasa está situada en el extremo N de la primera NLS y del segundo NLS en el polipéptido.

25. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 21-22, donde la citidina desaminasa está situada en el extremo C de una NLS en el polipéptido.

26. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 23-25, donde la citidina desaminasa está situada en el extremo C de la primera NLS y del segundo NLS en el polipéptido.

27. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 21-26, donde el ORF no comprende una secuencia codificante para una NLS del extremo C del ORF que codifica Nme Cas9.

28. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 21-26, donde el ORF no comprende una secuencia codificante del extremo C del ORF que codifica Nme Cas9.

29. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, donde la citidina desaminasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 87 % de identidad con las SEQ ID NO: 151.

30. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, donde la citidina desaminasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 80 % de identidad con las SEQ ID NO: 152-216.

31. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-28, donde la citidina desaminasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 14.

32. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-31, el ORF comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 42.

33. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, donde el polinucleótido

comprende una UTR 5' con al menos 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 391-398.

34. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-33, donde el polinucleótido comprende una UTR 5' que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 391-398.

35. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-34, donde el polinucleótido comprende una UTR 3' con al menos 90 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 399-406.

36. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-35, donde el polinucleótido comprende una UTR 3' que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 399-406.

37. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-36, donde el polinucleótido comprende una UTR 5' y una UTR 3' de la misma fuente.

38. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-37, donde el polinucleótido comprende un casquete 5', opcionalmente donde el casquete 5' es Cap0, Cap1 o Cap2.

39. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-38, donde al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de los codones del ORF son codones mínimos de adenina o codones mínimos de uridina.

40. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-39, donde el ORF comprende o consiste en codones que aumentan la traducción del ARNm en un mamífero.

41. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-40, donde el ORF comprende o consiste en codones que aumentan la traducción del ARNm en un ser humano.

42. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-41, donde el polinucleótido es un ARNm.

43. El polinucleótido de la reivindicación 42, donde el ORF comprende una secuencia que tiene al menos 90 %, 95 %, 98 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 29, 32-41, 224-226, 231-233, 238-240, 245-247, 252-254, 259-261, 266-268, 273-275, 280-282, 287-289, 294-296, 301-303, o 316-321.

44. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 42-43, donde al menos 10 % de la uridina en el ARNm se sustituye con una uridina modificada.

45. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 42-43, donde menos del 10 % de la uridina en el ARNm se sustituye con una uridina modificada.

46. El polinucleótido de la reivindicación 45, donde la uridina modificada es una o más de N1-metil-pseudouridina, pseudouridina, 5-metoxiuridina o 5-yodouridina.

47. El polinucleótido de la reivindicación 45, donde la uridina modificada es una o ambas

de N1-metil-pseudouridina o 5-metoxiuridina.

48. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 45-47, donde la uridina modificada es N1-metil-pseudouridina.

49. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 45-47, donde la uridina modificada es 5-metoxiuridina.

50. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 44 y 46-49, donde 15 % a 45 % de la uridina se sustituye con la uridina modificada.

51. El polinucleótido de la reivindicación 50, donde al menos 20 % o al menos 30 % de la uridina se sustituye con la uridina modificada.

52. El polinucleótido de la reivindicación 51, donde al menos 80 % o al menos 90 % de la uridina se sustituye con la uridina modificada.

53. El polinucleótido de la reivindicación 52, donde 100 % de la uridina se sustituye con la uridina modificada.

54. El polinucleótido de la reivindicación 42, donde menos de 10 % de los nucleótidos en el ARNm se sustituyen con un nucleótido modificado.

55. Una composición que comprende el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-54 y al menos un ARN guía (ARNg).

56. Una composición que comprende un primer polinucleótido que comprende un primer marco de lectura abierto (ORF) que codifica un polipéptido que comprende una citidina desaminasa, opcionalmente una APOBEC3A desaminasa y una nickasa NmeCas9, y un segundo polinucleótido que comprende un segundo marco de lectura abierto que codifica un inhibidor de uracil glicosilasa (UGI), donde el segundo polinucleótido es diferente del primer polinucleótido, y opcionalmente comprende además un ARN guía (ARNg).

57. La composición de la reivindicación 55 o 56, donde el ARNg es un ARN simple guía.

58. La composición de la reivindicación 55 o 56, donde el ARNg es un ARN doble guía.

59. Una composición que comprende el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-57, que comprende además un ARN simple guía, donde el ARN simple guía comprende una región guía y una región conservada, donde la región conservada comprende uno o más de:

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

(i) uno o más de los nucleótidos 37-48 y 53-64 se eliminan y, opcionalmente, uno o más de los nucleótidos 37-64 se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 36 se enlaza con el nucleótido 65 mediante al menos 2 nucleótidos; o

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

(i) se elimina uno o más de los nucleótidos 82-86 y 91-95 y, opcionalmente, se sustituye una o más de las posiciones 82-96 con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 81 se enlaza con el nucleótido 96 mediante al menos 4 nucleótidos; o

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

(i) uno o más de los nucleótidos 113-121 y 126-134 se eliminan y, opcionalmente, uno o más de los nucleótidos 113-134 se sustituyen con respecto a la SEQ ID NO: 500; y

(ii) el nucleótido 112 se enlaza con el nucleótido 135 mediante al menos 4 nucleótidos;

donde se elimina opcionalmente uno o ambos nucleótidos 144-145 en relación con la SEQ ID NO: 500;

donde al menos 10 nucleótidos son nucleótidos modificados.

60. Una composición que comprende el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-57, que comprende además un ARN simple guía, donde el ARN simple guía comprende una región guía y una región conservada, donde la región conservada comprende uno o más de:

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

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

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

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

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

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

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

(i) se eliminan uno o más de los nucleótidos 113 a 134 y, opcionalmente, se sustituyen con

respecto a la SEQ ID NO: 500; y

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

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

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

61. Un polipéptido codificado por un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-60.

62. Un vector que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-60.

63. Una construcción de expresión que comprende un promotor unido operativamente a una secuencia que codifica el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-60.

64. La construcción de expresión de la reivindicación 63, donde el promotor es un promotor de ARN polimerasa, opcionalmente un promotor de ARN polimerasa bacteriana.

65. La construcción de expresión de la reivindicación 63 o 64, que comprende además una secuencia de cola poli-A o una secuencia de señal de poliadenilación.

66. La construcción de expresión de la reivindicación 65, donde la secuencia de cola poli-A es una secuencia de cola poli-A codificada.

67. Un plásmido que comprende la construcción de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 63-66.

68. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 62, la construcción de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 63-66 o el plásmido de la reivindicación 67.

69. Una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido, composición o polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-61 y un portador farmacéuticamente aceptable.

70. Un kit que comprende el polinucleótido, composición o polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-61.

71. El uso del polinucleótido, composición o polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-61 para modificar un gen objetivo en una célula.

72. El uso del polinucleótido, composición o polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-61 para la elaboración de un medicamento para modificar un gen objetivo

en una célula.

73. El polinucleótido o composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-60, donde el polinucleótido o composición se formula como una composición de ensamblaje de ácido nucleico lipídico, opcionalmente una nanopartícula lipídica.

74. Un método para modificar un gen objetivo que comprende administrarle a una célula el polinucleótido, polipéptido o composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-61.

75. Un método para modificar un gen objetivo, que comprende administrarle a la célula una o más composiciones de ensamblaje de ácido nucleico lipídico, opcionalmente nanopartículas lipídicas, que comprenden el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-60, y uno o más ARN guía.

76. El método de cualquiera de las reivindicaciones 74-75, donde al menos una composición de ensamblaje de ácido nucleico lipídico comprende nanopartículas lipídicas (LNP), opcionalmente donde todas las composiciones de ensamblaje de ácido nucleico lipídico comprenden LNP.

77. El método de cualquiera de cualquiera de las reivindicaciones 74-75, donde al menos una composición de ensamblaje de ácido nucleico lipídico es una composición de lipoplejo.

78. La composición o método de cualquiera de cualquiera de las reivindicaciones 75-77, donde la composición del ensamblaje de ácido nucleico lipídico comprende un lípido ionizable.

79. Un método para producir un polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-54, que comprende poner en contacto la construcción de expresión de las reivindicaciones 63-66 con una ARN polimerasa y NTP que comprenden al menos un nucleótido modificado.

80. El método de la reivindicación 79, donde las NTP comprenden un nucleótido modificado.

81. El método de la reivindicación 79 u 80 donde el nucleótido modificado comprende una uridina modificada.

82. El método de la reivindicación 81, donde al menos 80 % o al menos 90 % o 100 % de las posiciones de uridina son uridinas modificadas.

83. El método de la reivindicación 81 u 82, donde la uridina modificada comprende o es una uridina sustituida, pseudouridina o una pseudouridina sustituida, opcionalmente N1-metil-psuedouridina.

84. El método de cualquiera de las reivindicaciones 79-83, donde la construcción de expresión comprende una secuencia de cola poli-A codificada.