

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un permutante circular de un Cas12a o una proteína diseñada genéticamente que comprende un polipéptido Cas12a (p. ej., un permutante circular de una o más de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**),

donde el permutante circular se une a un ácido nucleico, opcionalmente donde el permutante circular tiene actividad de nucleasa.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, donde el permutante circular comprende un enlazador (p. ej., un enlazador peptídico) entre dos residuos de aminoácidos del permutante circular, opcionalmente donde el enlazador está entre dos residuos de aminoácidos no consecutivos del Cas12a o proteína diseñada genéticamente.

3. El polipéptido de la reivindicación 2, donde uno de los dos residuos de aminoácidos está en el extremo N-terminal del Cas12a o proteína diseñada genéticamente, y el otro de los dos residuos de aminoácidos está en el extremo C-terminal del Cas12a o proteína diseñada genéticamente, opcionalmente donde uno de los dos residuos de aminoácidos es el residuo de aminoácido N-terminal del Cas12a o proteína diseñada genéticamente, y el otro de los dos residuos de aminoácidos es el residuo de aminoácido C-terminal del Cas12a o proteína diseñada genéticamente.

4. El polipéptido de la reivindicación 2 o 3, donde el enlazador tiene una longitud de 1, 5, o 10 aminoácidos a 12, 15, o 20 aminoácidos.

5. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 2–4, donde el enlazador es un enlazador de aminoácidos que comprende glicina y/o serina.

6. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el permutante circular tiene una ventana de edición diferente de aquella para el Cas12a o proteína

diseñada genéticamente, y/o donde el permutante circular tiene una mayor o reducida ventana de edición en comparación con aquella para el Cas12a o proteína diseñada genéticamente.

7. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el permutante circular tiene mayor actividad de nucleasa en comparación con el Cas12a o proteína diseñada genéticamente.

8. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el extremo N-terminal y/o extremo C-terminal del permutante circular están más cerca de un ácido nucleico diana (p. ej., un ácido nucleico diana unido) que el extremo N-terminal y/o extremo C-terminal del Cas12a o proteína diseñada genéticamente, opcionalmente donde el extremo N-terminal y/o extremo C-terminal del permutante circular están más cerca de la hebra no diana del ácido nucleico diana, que el extremo N-terminal y/o extremo C-terminal del Cas12a o proteína diseñada genéticamente.

9. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el residuo de aminoácido N-terminal y/o el residuo de aminoácido C-terminal del permutante circular es un residuo de aminoácido que está presente en un bucle del Cas12a o proteína diseñada genéticamente, o es un residuo de aminoácido que está inmediatamente antes o inmediatamente después de un bucle del Cas12a o proteína diseñada genéticamente, opcionalmente donde el bucle es un bucle expuesto en la superficie.

10. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el permutante circular se une a un ácido nucleico diana, opcionalmente donde el permutante circular se une al ácido nucleico diana en una mejorada (p. ej., más accesible) orientación en comparación con el Cas12a o proteína diseñada genéticamente.

11. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el permutante circular tiene mayor estabilidad (p. ej., mayor estabilidad térmica, estabilidad de expresión

y/o estabilidad purificada) en comparación con el Cas12a o proteína diseñada genéticamente.

12. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el permutante circular tiene mayor actividad de ARNasa en comparación con el Cas12a o proteína diseñada genéticamente.

13. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el permutante circular tiene modificada unión a ARNcr en comparación con el Cas12a o proteína diseñada genéticamente.

14. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el permutante circular tiene modificado acceso PAM en comparación con el Cas12a o proteína diseñada genéticamente.

15. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el permutante circular tiene por lo menos una mejora (p. ej., mayor actividad y/o unión) en comparación con una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**.

16. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende una citosina desaminasa, opcionalmente donde la citosina desaminasa está fusionada (directa o indirectamente) al extremo N– o C–terminal del permutante circular.

17. El polipéptido de cualquier reivindicación anterior, que además comprende un inhibidor de glicosilasa, opcionalmente donde el inhibidor de glicosilasa es un inhibidor de uracilo glicosilasa (UGI).

18. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende una adenina desaminasa, opcionalmente donde la adenina desaminasa está fusionada (directa o indirectamente) al extremo N– o C–terminal del permutante circular.

19. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1–18, que además comprende una transcriptasa inversa, opcionalmente donde la transcriptasa inversa está fusionada (directa o indirectamente) al extremo N– o C–terminal del permutante circular.
20. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende por lo menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con respecto a una o más de **SEQ ID NOs: 234–245, 299–310, 351–362, 390–399, 450–461, 486–497, 537–560, 609–639, 702–704, 735–740, y 757–760.**
21. Un polipéptido que comprende una primera secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con respecto a una porción de una de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**, donde la porción de aquella de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861** incluye el extremo N–terminal de aquella de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861** y menos que la secuencia de aminoácidos entera de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**, y el extremo N–terminal de aquella de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861** está en o después del residuo de aminoácido 70 del polipéptido.
22. El polipéptido de la reivindicación 20 o 22, donde el polipéptido se une a un ácido nucleico y/o donde el polipéptido tiene actividad de nucleasa.
23. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–22, donde el polipéptido comprende un enlazador (p. ej., un enlazador peptídico) entre dos residuos de aminoácidos del polipéptido, opcionalmente donde el enlazador está entre dos residuos de aminoácidos no consecutivos de un polipéptido original, y el polipéptido comprende una secuencia que es una variante del polipéptido original.

24. El polipéptido de la reivindicación 23, donde el polipéptido comprende una secuencia que es una variante de un polipéptido original, y donde uno de los dos residuos de aminoácidos está en el extremo N-terminal del polipéptido original, y el otro de los dos residuos de aminoácidos está en el extremo C-terminal del polipéptido original, opcionalmente donde uno de los dos residuos de aminoácidos es el residuo de aminoácido N-terminal del polipéptido original, y el otro de los dos residuos de aminoácidos es el residuo de aminoácido C-terminal del polipéptido original.
25. El polipéptido de la reivindicación 23 o 24, donde el enlazador tiene una longitud de 1, 5, o 10 aminoácidos a 12, 15, o 20 aminoácidos.
26. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 23–25, donde el enlazador es un enlazador de aminoácidos que comprende glicina y/o serina.
27. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–26, donde el polipéptido tiene una ventana de edición diferente de aquella para un Cas12a y/o una proteína diseñada genéticamente que comprende un polipéptido Cas12a (p. ej., una o más de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**) y/o donde el permutante circular tiene una mayor o reducida ventana de edición en comparación con aquella para un Cas12a y/o proteína diseñada genéticamente (p. ej., una o más de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**).
28. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–27, donde el polipéptido tiene mayor actividad de nucleasa en comparación con un polipéptido original, y el polipéptido comprende una secuencia que es una variante del polipéptido original, y/o donde el polipéptido tiene mayor actividad de nucleasa en comparación con un Cas12a y/o una proteína diseñada genéticamente que comprende un polipéptido Cas12a (p. ej., una o más de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**).

29. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–28, donde el polipéptido comprende una secuencia que es una variante de un polipéptido original, y donde el extremo N–terminal y/o extremo C–terminal del permutante circular están más cerca de un ácido nucleico diana (p. ej., un ácido nucleico diana unido) que el extremo N–terminal y/o extremo C–terminal de un polipéptido original, opcionalmente donde el extremo N–terminal y/o extremo C–terminal del polipéptido están más cerca de la hebra no diana del ácido nucleico diana, que el extremo N–terminal y/o extremo C–terminal del polipéptido original.

30. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–29, donde el polipéptido comprende una secuencia que es una variante de un polipéptido original, y donde el residuo de aminoácido N–terminal y/o el residuo de aminoácido C–terminal del polipéptido es un residuo de aminoácido que está presente en un bucle del polipéptido original, o es un residuo de aminoácido que está inmediatamente antes o inmediatamente después de un bucle del polipéptido original, opcionalmente donde el bucle es un bucle expuesto en superficie.

31. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–30, donde el polipéptido se une a un ácido nucleico diana, opcionalmente donde el polipéptido se une al ácido nucleico diana en una mejorada (p. ej., más accesible) orientación en comparación con un polipéptido original y/o un Cas12a y/o una proteína diseñada genéticamente que comprende un polipéptido Cas12a (p. ej., una o más de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**).

32. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–31, donde el polipéptido comprende una secuencia que es una variante de un polipéptido original, y donde el polipéptido tiene mayor estabilidad (p. ej., mayor estabilidad térmica, estabilidad de expresión y/o estabilidad purificada) en comparación con el polipéptido original, y/o donde el polipéptido tiene mayor estabilidad en comparación con un Cas12a y/o una proteína diseñada genéticamente que comprende un polipéptido Cas12a (p. ej., una o más de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 158–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**).

33. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–32, donde el polipéptido comprende una secuencia que es una variante de un polipéptido original, y donde el polipéptido tiene mayor actividad de ARNasa en comparación con el polipéptido original, y/o donde el polipéptido tiene mayor actividad de ARNasa en comparación con un Cas12a y/o una proteína diseñada genéticamente que comprende un polipéptido Cas12a (p. ej., una o más de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**).

34. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–33, donde el polipéptido comprende una secuencia que es una variante de un polipéptido original, y donde el polipéptido tiene modificada unión a ARNcr en comparación con el polipéptido original, y/o donde el polipéptido tiene modificada unión a ARNcr en comparación con un Cas12a y/o una proteína diseñada genéticamente que comprende un polipéptido Cas12a (p. ej., una o más de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**).

35. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–34, donde el polipéptido comprende una secuencia que es una variante de un polipéptido original, y donde el polipéptido tiene modificado acceso PAM en comparación con el polipéptido original, opcionalmente donde el polipéptido tiene modificado acceso PAM en comparación con un Cas12a o una proteína diseñada genéticamente que comprende un polipéptido Cas12a (p. ej., una o más de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**).

36. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–35, donde el polipéptido tiene por lo menos una mejora (p. ej., mayor actividad y/o unión) en comparación con una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de **SEQ ID NOs: 39–65, 69–132, 159–182, 281–284, 298, 400–401, 741, 761, y 850–861**.

37. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–36, donde el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un permutante circular y una citosina desaminasa, opcionalmente donde la citosina desaminasa está fusionada (directa o indirectamente) al extremo N– o C–terminal del permutante circular.
38. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–37, donde el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un permutante circular y un inhibidor de glicosilasa, opcionalmente donde el inhibidor de glicosilasa es un inhibidor de uracilo glicosilasa (UGI).
39. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–38, donde el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un permutante circular y una adenina desaminasa, opcionalmente donde la adenina desaminasa está fusionada (directa o indirectamente) al extremo N– o C–terminal del permutante circular.
40. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 20–39, donde el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un permutante circular y una transcriptasa inversa, opcionalmente donde la transcriptasa inversa está fusionada (directa o indirectamente) al extremo N– o C–terminal del permutante circular.
41. Un complejo que comprende:
el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1–40; y
un ácido nucleico guía.
42. El complejo de la reivindicación 41, donde el polipéptido está fusionado a una etiqueta peptídica.
43. El complejo de la reivindicación 41, donde el polipéptido está fusionado a un polipéptido de afinidad (p. ej., un polipéptido de afinidad que es capaz de unión a una etiqueta peptídica y/o un motivo de reclutamiento de ARN).

44. El complejo de la reivindicación 41, que además comprende un primer polipéptido de interés, opcionalmente donde el primer polipéptido de interés comprende una desaminasa, inhibidor de glicosilasa, y/o transcriptasa inversa,
45. El complejo de la reivindicación 44, donde el primer polipéptido de interés está fusionado a una etiqueta peptídica, y donde el polipéptido está fusionado a un polipéptido de afinidad que es capaz de unión a la etiqueta peptídica.
46. El complejo de la reivindicación 44, donde el polipéptido está fusionado a una etiqueta peptídica, y donde el primer polipéptido de interés está fusionado a un polipéptido de afinidad que es capaz de unión a la etiqueta peptídica.
47. El complejo de la reivindicación 44, donde el primer polipéptido de interés está fusionado a un motivo de reclutamiento de ARN, y donde el polipéptido está fusionado a un polipéptido de afinidad que es capaz de unión al motivo de reclutamiento de ARN.
48. El complejo de la reivindicación 44, donde el polipéptido está fusionado a un motivo de reclutamiento de ARN, y donde el primer polipéptido de interés está fusionado a un polipéptido de afinidad que es capaz de unión al motivo de reclutamiento de ARN.
49. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 41–48, donde el ácido nucleico guía es un ácido nucleico guía extendido, o además comprende un ácido nucleico guía extendido.
50. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 41–49, comprendido en un casete de expresión, opcionalmente donde el casete de expresión está comprendido en un vector.
51. Un casete de expresión optimizado por codones para la expresión en un organismo, que comprende:
un polinucleótido que codifica una secuencia de promotor, y

un polinucleótido que tiene por lo menos alrededor de 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más identidad de secuencia con respecto a una o más de **SEQ ID NOs: 247–258, 286–297, 327–338, 364–375, 402–411, 462–473, 503–514, 561–584, 640–670, 706–708, 742–747, 763–766, 784, y 787**, y/o que codifica un polipéptido que tiene por lo menos alrededor de 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más identidad de secuencia con respecto a una o más de **SEQ ID NOs: 234–245, 299–310, 351–362, 390–399, 450–461, 486–497, 537–560, 609–639, 702–704, 735–740, y 757–760**,

opcionalmente donde el polinucleótido que codifica el polipéptido está optimizado por codones para la expresión en el organismo.

52. El casete de expresión de la reivindicación 51, que además comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una desaminasa, inhibidor de glicosilasa, y/o transcriptasa inversa) que está optimizado por codones para la expresión en el organismo.

53. El casete de expresión de la reivindicación 51 o 52, donde el organismo es un animal, una planta, un hongo, una arquea o una bacteria.

54. Un método para modificar un ácido nucleico diana en una célula, donde el método comprende:

introducir el casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 51–53 en la célula, a fin de modificar así el ácido nucleico diana en la célula.

55. El método de la reivindicación 54, donde la célula es una célula vegetal (p. ej., una célula vegetal que incluye una pared celular), y el método además comprende regenerar la célula vegetal que comprende el ácido nucleico diana modificado, a fin de producir una planta que comprende el ácido nucleico diana modificado.

56. El método de cualquiera de las reivindicaciones 54 o 55, donde la introducción se lleva a cabo a una temperatura de alrededor de 20°C a alrededor de 42°C.

57. Un método para producir un polipéptido, donde el método comprende:
- cultivar una célula o grupo de células que han sido transformadas con un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene por lo menos alrededor de 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más identidad de secuencia con respecto a una o más de **SEQ ID NOs: 234–245, 299–310, 351–362, 390–399, 450–461, 486–497, 537–560, 609–639, 702–704, 735–740, y 757–760**; y
 - aislar dicho polipéptido (p. ej., aislar por diálisis, centrifugación, purificación de columna y/o similares), a fin de producir así el polipéptido.
58. Un método para modificar un ácido nucleico diana, donde el método comprende:
- poner en contacto el ácido nucleico diana con:
 - el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1–40; y
 - un ácido nucleico guía, a fin de modificar así el ácido nucleico diana.
59. El método de la reivindicación 58, donde el ácido nucleico diana está presente en una célula (p. ej., una célula eucariota), opcionalmente, donde el ácido nucleico diana está presente en una célula vegetal o en una célula humana.
60. El método de la reivindicación 58 o 59, que además comprende introducir una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido, en la célula, y producir el polipéptido en la célula.