



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 962 277**

⑮ Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2018 PCT/US2018/053389**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2019 WO19067875**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2018 E 18786639 (7)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2023 EP 3585162**

④ Título: **Roedores que comprenden un locus Ttr humanizado y métodos de uso**

⑩ Prioridad:

**29.09.2017 US 201762565980 P
01.06.2018 US 201862679142 P
21.08.2018 US 201862720292 P**

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2024

⑦ Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US**

⑦ Inventor/es:

**DRUMMOND SAMUELSON, MEGHAN;
HAINES, JEFFERY;
HARTFORD, SUZANNE;
FRENDEWEY, DAVID;
ZAMBROWICZ, BRIAN y
MURPHY, ANDREW J.**

⑦ Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 962 277 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Roedores que comprenden un locus *Ttr* humanizado y métodos de uso

5 **Antecedentes**

La transtirretina (TTR) es una proteína que se encuentra en el suero y el líquido cefalorraquídeo y que transporta la hormona tiroidea y la proteína de unión al retinol al retinol. El hígado secreta TTR a la sangre, mientras que el plexo coroideo lo secreta al líquido cefalorraquídeo. La TTR también se produce en el epitelio pigmentado de la retina y se secreta al vítreo. La TTR plegada de forma errónea y agregada se acumula en múltiples tejidos y órganos en las enfermedades de acumulación de amiloides: amiloidosis sistémica senil (SSA), polineuropatía amiloide familiar (FAP) y miocardiopatía amiloide familiar (FAC).

10 Un enfoque terapéutico prometedor para las enfermedades de amiloidosis por TTR es reducir la carga de TTR en el paciente. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de animales no humanos adecuados que proporcionen la verdadera diana humana o una aproximación cercana a la verdadera diana humana de los reactivos dirigidos a TTR humana en el locus *Ttr* endógeno, lo cual permite ensayar la eficacia y el modo de acción de dichos agentes en animales vivos, así como en estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos en un entorno donde la proteína humanizada y el gen humanizado son la única versión de TTR presente.

15 20 GANG ZHAO ET AL "Inconsistency between hepatic expression and serum concentration of transthyretin in mice humanized at the transthyretin locus: Inconsistent TTR expression in humanized mice" (GENES TO CELLS, vol. 13, n.º 12, 1 de diciembre de 2008) divulga un ratón que comprende un locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente que comprende una secuencia codificante de la secuencia de TTR humana.

25 25 MEI-HUI TENG ET AL "Amyloid and nonfibrillar deposits in mice transgenic for wild-type human transthyretin: a possible model for senile systemic amyloidosis" (LABORATORY INVESTIGATION, vol. 81, n.º 3, 1 de marzo de 2001) divulga un ratón que comprende una secuencia de TTR humana que comprende tanto una secuencia codificante como una secuencia no codificante de TTR. La secuencia de TTR humano no está situada en el locus *Ttr* endógeno.

30 **Sumario**

35 La invención proporciona roedores que comprenden un locus *TTR* humanizado como se define en la reivindicación 1, y también se proporcionan células que comprenden un locus *TTR* humanizado, como se define en la reivindicación 20

35 En un aspecto, se proporcionan células de roedor, o roedores que comprenden un locus *TTR* humanizado. Tal como se define en las reivindicaciones 20 y 1, respectivamente, la célula o roedor comprende en su genoma un locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente que comprende una secuencia de *TTR* humano que comprende tanto una secuencia codificante como una secuencia no codificante de *TTR*. Dichas células de roedor, o roedores, comprenden un locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente, en donde una región del locus *Ttr* endógeno que comprende tanto la secuencia codificante como la secuencia no codificante de *Ttr* se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TTR* humano correspondiente que comprende tanto la secuencia codificante como la secuencia no codificante de *TTR*. Los locus *Ttr* endógenos modificados genéticamente comprenden el promotor de *Ttr* endógeno. La secuencia de *TTR* humano está unida operativamente al promotor de *Ttr* endógeno.

45 45 En algunas de estas células de roedor, o roedores, la secuencia codificante de *Ttr* entera del locus *Ttr* endógeno se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente y la región del locus *Ttr* endógeno desde el codón de inicio de *Ttr* al codón de terminación de *Ttr* se ha eliminado y reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente.

50 50 En las células de roedor reivindicadas, y en roedores, el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende una región 3' no traducida de *TTR* humano. En los roedores reivindicados, la región 5' no traducida de *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente.

55 55 En algunas de estas células de roedor, o roedores, la región del locus *Ttr* endógeno desde el codón de inicio de *Ttr* al codón de terminación de *Ttr* se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TTR* humano que comprende la secuencia de *TTR* humano correspondiente y una región 3' no traducida de *TTR* humano, y la región 5' no traducida de *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente, y el promotor de *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente.

60 60 Opcionalmente, la secuencia de *TTR* humano en el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 18. Opcionalmente, el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente codifica una proteína que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1.

65 65 Opcionalmente, el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende una secuencia codificante que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %,

99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 90. Opcionalmente, el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 14 o 15.

- 5 En algunos de estos roedores, o células de roedor, el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente codifica una proteína precursora de transtirretina que comprende un péptido señal, la región del locus *Ttr* endógeno que codifica el péptido señal no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente, el primer exón del locus *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente, el primer exón del locus *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente y la región del locus *Ttr* endógeno desde el inicio del segundo exón de *Ttr* al codón de terminación de *Ttr* se ha eliminado y reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente.
- 10

En algunos de estos roedores, o células de roedor, la región del locus *Ttr* endógeno desde el segundo exón de *Ttr* al codón de terminación de *Ttr* se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TTR* humano que comprende la secuencia de *TTR* humano correspondiente y una región 3' no traducida de *TTR* humano, y la región 5' no traducida de *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente, y el promotor de *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente. Opcionalmente, la secuencia de *TTR* humano en el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 19. Opcionalmente, el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente codifica una proteína que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2. Opcionalmente, el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende una secuencia codificante que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 91. Opcionalmente, el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 16 o 17.

- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

En algunos de estos roedores, o células de roedor, el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente no comprende un casete de selección ni un gen indicador. En algunos de estos roedores, o células de roedor, el roedor, o célula de roedor, es homocigoto para el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente. En algunos de estos roedores, o células de roedor, el roedor, o célula de roedor, es heterocigoto para el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente.

Opcionalmente, el roedor es una rata o ratón. Opcionalmente, el animal no humano es un ratón.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para evaluar la actividad de un reactivo dirigido a *TTR* humana, que comprende evaluar la actividad de reactivos dirigidos a *TTR* humana en los roedores reivindicados, tal como se define en la reivindicación 10, que comprenden: (a) administrar el reactivo dirigido a *TTR* humana a cualquiera de los roedores reivindicados; y (b) evaluar la actividad del reactivo dirigido a *TTR* humana en los roedores reivindicados.

En algunos de estos métodos, la administración comprende el suministro mediado por virus adenoasociados (AAV), el suministro mediado por nanopartículas lipídicas (LNP) o el suministro hidrodinámico (HDD). Opcionalmente, la administración comprende el suministro mediado por LNP y, opcionalmente, la dosis de LNP está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg. Opcionalmente, la administración comprende el suministro mediado por AAV8.

En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende aislar un hígado del roedor y evaluar la actividad del reactivo dirigido a *TTR* humana en el hígado. Opcionalmente, la etapa (b) comprende además evaluar la actividad del reactivo dirigido a *TTR* humana en un órgano o tejido distinto del hígado.

En algunos de estos métodos, el reactivo dirigido a *TTR* humana es un agente de edición del genoma, y la evaluación comprende evaluar la modificación del locus *Ttr* modificado genéticamente. Opcionalmente, la evaluación comprende medir la frecuencia de inserciones o eliminaciones dentro del locus *Ttr* modificado genéticamente. En algunos de estos métodos, la evaluación comprende medir la expresión de un ARN mensajero de *Ttr* codificado por el locus *Ttr* modificado genéticamente. En algunos de estos métodos, la evaluación comprende medir la expresión de una proteína *TTR* codificada por el locus *Ttr* modificado genéticamente. Opcionalmente, medir la expresión de la proteína *TTR* comprende medir los niveles séricos de la proteína *TTR* en el roedor. Opcionalmente, la actividad se evalúa en el hígado del roedor.

En algunos de estos métodos, el reactivo dirigido a *TTR* humana comprende un agente nucleasa diseñado para establecer como diana una región de un gen *TTR* humano. Opcionalmente, el agente nucleasa comprende una proteína Cas y un ARN guía diseñado para establecer como diana una secuencia diana de ARN guía en el gen *TTR* humano. Opcionalmente, la proteína Cas es una proteína Cas9. Opcionalmente, el reactivo dirigido a *TTR* humana comprende además un ácido nucleico donante exógeno, en donde el ácido nucleico donante exógeno está diseñado para recombinarse con el gen *TTR* humano. Opcionalmente, el ácido nucleico donante exógeno es un oligodesoxinucleótido monocatenario (ODNmc).

En otro aspecto, se proporcionan métodos para optimizar la actividad de un reactivo dirigido a TTR humana *in vivo*, tal como se define en la reivindicación 18. Dichos métodos comprenden: (I) realizar cualquiera de los métodos anteriores para evaluar la actividad de reactivos dirigidos a TTR humana *in vivo* por primera vez en un primer roedor que comprende en su genoma un locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente que comprende una secuencia de *TTR* humana que comprende tanto una secuencia codificante como una secuencia no codificante de *TTR*; (II) cambiar una variable y realizar el método de la etapa (I) una segunda vez con la variable cambiada en un segundo roedor que comprende en su genoma el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente que comprende la secuencia de *TTR* humana que comprende tanto una secuencia codificante como una secuencia no codificante de *TTR*; y (III) comparar la actividad del reactivo dirigido a TTR humana en la etapa (I) con la actividad del reactivo dirigido a TTR humana en la etapa (II) y seleccionar el método que dé como resultado la mayor actividad. Opcionalmente, la etapa (III) puede comprender seleccionar el método que dé como resultado la mayor eficacia, mayor precisión, mayor consistencia o mayor especificidad.

15 Opcionalmente, la variable cambiada en la etapa (II) es el método de suministro para introducir el reactivo dirigido a TTR humana en el roedor. Opcionalmente, la administración comprende el suministro mediado por LNP y la variable cambiada en la etapa (II) es la formulación de LNP. Opcionalmente, la variable cambiada en la etapa (II) es la vía de administración para introducir el reactivo dirigido a TTR humana en el roedor. Opcionalmente, la variable cambiada en la etapa (II) es la concentración o cantidad del reactivo dirigido a TTR humana introducido en el roedor. Opcionalmente, la variable cambiada en la etapa (II) es la forma del reactivo dirigido a TTR humana introducido en el roedor. Opcionalmente, la variable cambiada en la etapa (II) es el reactivo dirigido a TTR humana introducido en el roedor.

25 En algunos de estos métodos, el reactivo dirigido a TTR humana comprende una proteína Cas (por ejemplo, una proteína Cas9) y un ARN guía diseñado para establecer como diana una secuencia diana de ARN guía en el gen *TTR* humano. Opcionalmente, la variable cambiada en la etapa (II) es la secuencia de ARN guía o la secuencia diana de ARN guía. Opcionalmente, la proteína Cas y el ARN guía se administran cada uno en forma de ARN, y la variable cambiada en la etapa (II) es la relación entre ARNm de Cas y ARN guía. Opcionalmente, la variable cambiada en la etapa (II) son las modificaciones del ARN guía.

30 En otro aspecto, se proporcionan métodos para obtener los roedores reivindicados que comprenden un locus *TTR* humanizado como se define en la reivindicación 21. Algunos de estos métodos comprenden: (a) introducir en una célula de roedor pluripotente: (i) un agente nucleasa que se dirige a una secuencia diana en el locus *Ttr* endógeno; y (ii) un vector de direccionamiento que comprende un inserto de ácido nucleico que comprende la secuencia de TTR humana flanqueada por un brazo de homología 5' correspondiente a una secuencia diana 5' en el locus *Ttr* endógeno y un brazo de homología 3' correspondiente a una secuencia diana 3' en el locus *Ttr* endógeno, en donde el vector de direccionamiento se recombinan con el locus *Ttr* endógeno para producir una célula de roedor pluripotente modificada genéticamente que comprende en su genoma el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente que comprende la secuencia de *TTR* humano; (b) introducir la célula de roedor pluripotente modificada genéticamente en un embrión hospedador de roedor; y (c) gestar el embrión hospedador de roedor en una madre subrogada, en donde la madre subrogada produce una descendencia F0 de un roedor modificado genéticamente tal como se define en la reivindicación 1.

45 En algunos de estos métodos, el agente nucleasa comprende una proteína Cas (por ejemplo, una proteína Cas9) y un ARN guía. En algunos de estos métodos, el vector de direccionamiento es un vector de direccionamiento grande de al menos 10 kb de longitud o en el que la suma total de los brazos de homología 5' y 3' tiene al menos 10 kb de longitud. En algunos de estos métodos, el roedor es un ratón o una rata. En algunos de estos métodos, el roedor es un ratón.

Breve descripción de las figuras

50 La **Figura 1A** muestra una alineación de proteínas precursoras de transtirretina (TTR) humana y de ratón (SEQ ID NO: 1 y 6, respectivamente). Están indicados el péptido señal, el dominio de unión a T4, los límites de exón/intrón de fase 0 y los límites de exón/intrón de fase 1/2.

55 La **Figura 1B** muestra una alineación de secuencias codificantes de transtirretina (TTR) humana y de ratón (SEQ ID NO: 90 y 92, respectivamente).

60 La **Figura 2** muestra esquemas (no dibujados a escala) del locus *Ttr* murino de tipo silvestre, una primera versión de un locus *Ttr* de ratón humanizado y una segunda versión de un locus *Ttr* de ratón humanizado. Están indicados los exones, intrones, regiones 5' no traducidas (UTR), 3' UTR, codones de inicio (ATG), codones de terminación (TGA) y las cicatrices de loxP de los casetes de selección. Los cuadros blancos indican la secuencia murina; los cuadros negros indican la secuencia humana.

65 La **Figura 3** muestra un esquema (no dibujado a escala) del direccionamiento para crear la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado. Se muestran el locus *Ttr* de ratón de tipo silvestre, el alelo F0 del locus *Ttr* de ratón humanizado con el casete de selección de neomicina de autoeliminación (SDC-Neo) (MAID 7576) y el alelo F1 del locus *Ttr* de ratón humanizado con la cicatriz de loxP procedente de la eliminación del casete de selección SDC-Neo (MAID 7577). Los cuadros blancos indican la secuencia murina; los cuadros negros indican la secuencia humana.

- 5 La **Figura 4** muestra un esquema (no dibujado a escala) del direccionamiento para crear la segunda versión del locus *Ttr* de ratón humanizado. Se muestran el locus *Ttr* de ratón de tipo silvestre, el alelo F0 del locus *Ttr* de ratón humanizado con el casete de selección SDC-Neo y el alelo F1 del locus *Ttr* de ratón humanizado con la cicatriz de loxP procedente de la eliminación del casete de selección SDC-Neo. Los cuadros blancos indican la secuencia murina; los cuadros negros indican la secuencia humana.
- 10 10 La **Figura 5A** muestra un esquema (no dibujado a escala) de la estrategia para el cribado del primer locus *Ttr* de ratón establecido como diana, incluidos ensayos de pérdida de alelos (7576mTU, 9090mTM y 9090mTD), ensayos de ganancia de alelos (7576hTU, 7576hTD, Neo), ensayos de retención (9090retU, 9090retU2, 9090retU3, 9090retD, 9090retD2, 9090retD3) y ensayos CRISPR diseñados para cubrir la región alterada por las guías de CRISPR (9090mTGU, mGU, 9090mTGD y mGD). Los cuadros blancos indican la secuencia murina; los cuadros negros indican la secuencia humana.
- 15 15 La **Figura 5B** muestra un esquema (no dibujado a escala) de la estrategia para el cribado del segundo locus *Ttr* de ratón establecido como diana, incluidos ensayos de pérdida de alelos (4552mTU, 9212mTU, 9090mTM, 9212mTD), ensayos de ganancia de alelos (7655hTU, 7576hTD, Neo), ensayos de retención (9204mretU, 9204mretD) y ensayos CRISPR diseñados para cubrir la región alterada por las guías de CRISPR (mGU, mGD y 9212mTGD). Los cuadros blancos indican la secuencia murina; los cuadros negros indican la secuencia humana.
- 20 20 La **Figura 6** muestra la expresión de ARNm de beta-actina (Actb), beta-2-microglobulina (B2M), transtirretina de *Mus musculus* (Mm *Ttr*) y transtirretina de *Homo sapiens* (Hs TTR) en muestras de hígado de (1) ratones homocigotos de la generación F0 para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado (MAID 7576; Alelo F0 de la Figura 3), (2) muestras de hígado de ratones de tipo silvestre, (3) muestras de bazo de ratones de la generación F0 homocigotos para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado y (4) muestras de bazo de ratones de tipo silvestre. Los valores de Ct más bajos indican una expresión más alta.
- 25 25 Las **Figuras 7A** y **7B** muestran los resultados de ensayos ELISA para niveles de proteína TTR humana (**Figura 7A**) y niveles de proteína TTR de ratón (**Figura 7B**) en suero y líquido cefalorraquídeo (CSF). Las muestras analizadas incluyen suero y CSF de ratones homocigotos de la generación F0 para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado (MAID 7576; alelo F0 de la Figura 3), controles CSF y suero humano y controles de CSF y suero de ratón (F1H4).
- 30 30 La **Figura 7C** muestra los resultados de ensayos ELISA para (1) niveles de proteína TTR humana y (2) TTR de ratón en suero. Las muestras analizadas incluyen muestras de suero de ratones homocigotos de la generación F0 para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado (MAID 7576; alelo F0 de la Figura 3) generado a partir de un primer clon (clon 7576C-G7), Ratones de generación F0 homocigotos para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado (MAID 7576; alelo F0 de la Figura 3) generado a partir de un segundo clon (clon 7576A-A5) y ratones de tipo silvestre (F1H4). Como controles se utilizaron suero de ratón y suero humano.
- 35 35 La **Figura 8** muestra la expresión de la proteína TTR humana determinada mediante transferencia Western en muestras de suero de ratones de tipo silvestre (F1H4), ratones de generación F0 homocigotos para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado (MAID 7576; alelo F0 de la Figura 3) generado a partir de un primer clon (clon 7576C-G7) y ratones de generación F0 homocigotos para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado generado a partir de un segundo clon (7576A-A5). Como control negativo se utilizó suero de ratón y como control positivo se utilizó suero humano. Como control de carga se utilizó IgG de ratón.
- 40 40 La **Figura 9** muestra la expresión de la proteína TTR humana determinada mediante transferencia Western en muestras de hígado y riñón de ratones de tipo silvestre (F1H4), ratones de generación F0 homocigotos para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado (MAID 7576; alelo F0 de la Figura 3) generado a partir de un primer clon (clon 7576C-G7) y ratones de generación F0 homocigotos para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado generado a partir de un segundo clon (7576A-A5). Como control negativo se utilizó suero de ratón y como control positivo se utilizó suero humano. Como control de carga se utilizó GAPDH.
- 45 45 La **Figura 10** muestra el porcentaje de edición del genoma (número total de inserciones o eliminaciones observadas sobre el número total de secuencias leídas en la reacción de PCR de un conjunto de células lisadas) en el locus *Ttr* de ratón humanizado determinado por secuenciación de última generación (NGS) en hepatocitos primarios aislados de ratones de la generación F0 homocigotos para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado (MAID 7576; alelo F0 de la Figura 3). Las muestras analizadas incluyeron hepatocitos no tratados y hepatocitos tratados con nanopartículas lipídicas que contienen ARNm de Cas9 y ARN guía diseñados para dirigirse a *TTR* humano.
- 50 50 Las **Figuras 11A-11H** muestran análisis de química sérica de alanina aminotransferasa (ALT) (**Figura 11A**), aspartato aminotransferasa (AST) (**Figura 11B**), triglicéridos (**Figura 11C**), colesterol (**Figura 11D**), lipoproteína de alta densidad (HDL) (**Figura 11E**), lipoproteína de baja densidad (LDL) (**Figura 11F**), ácidos grasos no esterificados (NEFA) (**Figura 11G**) y albúmina (**Figura 11H**) 14 días después de la inyección de nanopartículas lipídicas que contienen ARNm de Cas9 y ARN guía diseñados para dirigirse a la TTR humana en ratones de la generación F0 homocigotos para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado (MAID 7576; alelo F0 de la Figura 3). U/L se refiere a unidades por litro, mg/dl se refiere a miligramos por decilitro, mEq/l se refiere a miliequivalentes por litro y g/dl se refiere a gramos por decilitro.
- 55 55 La **Figura 12** muestra el porcentaje de edición del genoma (número total de inserciones o eliminaciones observadas sobre el número total de secuencias leídas en la reacción de PCR de un conjunto de células lisadas) en el locus *Ttr* de ratón humanizado determinado mediante secuenciación de última generación (NGS) en muestras de hígado 14 días después de la inyección de control de tampón o nanopartículas lipídicas que contienen ARNm de Cas9 y ARN guía diseñados para dirigirse a la TTR humana en ratones homocigotos de la generación F0 para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado (MAID 7576; alelo F0 de la Figura 3).

5 La **Figura 13** muestra los resultados de un ELISA que analiza los niveles séricos de TTR humana en ratones de tipo silvestre (F1H4), ratones en los que se introdujeron plásmidos de TTR humanos mediante suministro hidrodinámico (HDD) y ratones en los que se introdujo un plásmido químérico de TTR de ratón/humano (la región codificada por el exón 1 es de ratón y la región codificada por los exones 2-4 es humana) mediante HDD. Se muestran dos controles negativos y se utilizó suero humano como control positivo.

10 La **Figura 14** muestra los resultados de un ELISA que analiza los niveles de TTR humana en lisados hepáticos 8 días después de la inyección de control de tampón o nanopartículas lipídicas que contienen ARNm de Cas9 y ARN guía 1 de *TTR* humano diseñado para dirigirse a *TTR* humano en ratones homocigotos de la generación F2 para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado (MAID 7576; alelo F1 de la Figura 3; derivado del clon 7576B-F10).

15 15 Las **Figuras 15A** y **15B** muestran los resultados de un ELISA que analiza los niveles de TTR humana en muestras de suero (dilución 1:5000 en la **Figura 15A** y dilución 1:10000 en la **Figura 15B**) 8 días después de la inyección de control de tampón o nanopartículas lipídicas que contienen ARNm de Cas9 y ARN guía 1 de *TTR* humano diseñado para dirigirse a *TTR* humano en ratones homocigotos de la generación F2 para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado (MAID 7576; alelo F1 de la Figura 3; derivado del clon 7576B-F10).

20 La **Figura 16** muestra los resultados de un ELISA que analiza los niveles de TTR humana en muestras de plasma sanguíneo de ratones hTTR^{7577/7577}, hTTR^{7655/7655}, hTTR^{7655/7656} y hTTR^{7656/7656} y hTTR^{7656/WT}.

25 25 Las **Figuras 17A** y **17B** muestran los resultados de un ELISA que analiza los niveles de TTR humana y de TTR de ratón en muestras de plasma sanguíneo de ratones hTTR^{WT/WT} y hTTR^{7577/7577} (3 meses de edad). Se utilizó suero humano como control.

30 30 La **Figura 17C** muestra la expresión de ARNm de mTTR (1) y hTTR (2) en muestras de hígado de ratones hTTR^{WT/WT} y hTTR^{7577/7577} de 3 meses de edad. Los valores de Ct más bajos indican una expresión más alta.

35 La **Figura 18** muestra los resultados de un ELISA que analiza los niveles de TTR humana en muestras de plasma sanguíneo de ratones de tipo silvestre (F1H4), hTTR^{7577/7577} (hTTR v1) y hTTR^{7656/7656} (hTTRv2) (de 2 a 3 meses de edad).

40 La **Figura 19** muestra el porcentaje de edición del genoma en el locus *Ttr* de ratón humanizado determinado mediante secuenciación de última generación (NGS) en muestras de hígado después de la inyección de control de tampón o nanopartículas lipídicas que contienen ARNm de Cas9 y ARN guía diseñados para dirigirse a *TTR* humano en ratones homocigotos para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado.

45 La **Figura 20** muestra los resultados de un ELISA que analiza los niveles de TTR humana en muestras de suero después de la inyección de control de tampón o nanopartículas lipídicas que contienen ARNm de Cas9 y ARN guía diseñados para dirigirse a *TTR* humano en ratones homocigotos para la primera versión del locus *Ttr* de ratón humanizado.

35 **Definiciones**

40 Los términos "proteína", "polipéptido", y "péptido", utilizados indistintamente en el presente documento, incluyen formas poliméricas de aminoácidos de cualquier longitud, incluidos aminoácidos codificados y no codificados y aminoácidos derivatizados o modificados química o bioquímicamente. Los términos también incluyen polímeros que se han modificado, tales como polipéptidos que tienen cadenas principales peptídicas modificadas. El término "dominio" se refiere a cualquier parte de una proteína o polipéptido que tiene una función o estructura particular.

45 45 Se dice que las proteínas tienen un "extremo N" y un "extremo C". La expresión "extremo N" se refiere al inicio de una proteína o polipéptido, terminado por un aminoácido con un grupo amino libre (-NH₂). La expresión "extremo C" se refiere al final de una cadena de aminoácidos (proteína o polipéptido), terminado por un grupo carboxilo libre (-COOH).

50 50 Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido", utilizadas indistintamente en el presente documento, incluyen formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, incluidos ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, o análogos o versiones modificadas de los mismos. Incluyen ADN o ARN mono-, bi- y multicatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN y polímeros que comprenden bases purínicas, bases pirimidínicas u otras bases de nucleótido naturales, modificadas químicamente, modificadas bioquímicamente, no naturales o derivatizadas.

55 55 Se dice que los ácidos nucleicos tienen "extremos 5'" y "extremos 3'" porque los mononucleótidos se hacen reaccionar para formar polinucleótidos de tal manera que el fosfato 5' de un anillo de pentosa mononucleotídico esté unido al oxígeno 3' de su vecino en una dirección a través de un enlace fosfodiéster. Un extremo de un oligonucleótido se denomina "extremo 5'" cuando su fosfato 5' no está unido al oxígeno 3' de un anillo de pentosa mononucleotídico. Un extremo de un oligonucleótido se denomina "extremo 3'" cuando su oxígeno 3' no está unido a un fosfato 5' de otro anillo de pentosa mononucleotídico. También se puede decir que una secuencia de un ácido nucleico, aunque sea interna a un oligonucleótido más grande, tiene extremos 5' y 3'. En una molécula de ADN, ya sea lineal o circular, los elementos discretos se denominan "cadena arriba" o 5' de los elementos "cadena abajo" o 3'.

60 60 La expresión "integrado genómicamente" se refiere a un ácido nucleico que se ha introducido en una célula de manera que la secuencia de nucleótidos se integra en el genoma de la célula. Puede usarse cualquier protocolo para la incorporación estable de un ácido nucleico en el genoma de una célula.

65 La expresión "vector de expresión" o "construcción de expresión" o "casete de expresión" se refiere a un ácido nucleico

- recombinante que contiene una secuencia codificante deseada unida operativamente a secuencias de ácido nucleico apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante unida operativamente en una célula hospedadora u organismo particular. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en procariotas por lo general incluyen un promotor, un operador (opcional) y un sitio de unión al ribosoma, así como otras secuencias. Generalmente
- 5 se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de terminación y poliadenilación, aunque se podrán eliminar algunos elementos y añadir otros sin sacrificar la expresión necesaria.
- La expresión "vector de direccionamiento" se refiere a un ácido nucleico recombinante que puede introducirse mediante recombinación homóloga, ligadura mediada por unión de extremos no homólogos o cualquier otro medio de recombinación a una posición diana en el genoma de una célula.
- 10 La expresión "vector viral" se refiere a un ácido nucleico recombinante que incluye al menos un elemento de origen viral e incluye elementos suficientes para o que permiten el empaquetamiento en una partícula de vector viral. El vector y/o partícula se puede utilizar con el fin de transferir ADN, ARN u otros ácidos nucleicos al interior de las células ex-vivo o *in vivo*. Se conocen numerosas formas de vectores virales.
- 15 El término "aislado" con respecto a las proteínas, ácidos nucleicos y células incluye proteínas, ácidos nucleicos y células que están relativamente purificadas con respecto a otros componentes celulares u organismos que normalmente pueden estar presentes *in situ*, hasta e incluyendo una preparación sustancialmente pura de la proteína, ácido nucleico o célula. El término "aislado" también incluye proteínas y ácidos nucleicos que no tienen homólogos de origen natural o proteínas o ácidos nucleicos que se han sintetizado químicamente y, por lo tanto, no están sustancialmente contaminados por otras proteínas o ácidos nucleicos. El término "aislado" también incluye proteínas, ácidos nucleicos o células que se han separado o purificado de la mayoría de los demás componentes celulares o componentes del organismo con los que están acompañados de forma natural (p. ej., otras proteínas celulares, ácidos nucleicos o componentes celulares o extracelulares).
- 20 La expresión "tipo silvestre" incluye entidades que tienen una estructura y/o actividad como la que se encuentra en un estado o contexto normal (en contraste con un estado o contexto mutante, enfermo, alterado, etc.). Los genes y polipéptidos de tipo silvestre a menudo existen en múltiples formas diferentes (p. ej., alelos).
- 25 La expresión "secuencia endógena" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se produce de forma natural dentro de una célula o animal no humano. Por ejemplo, una secuencia de *Ttr* endógena de un animal no humano se refiere a una secuencia de *Ttr* nativa que se produce de forma natural en el locus *Ttr* en el animal no humano.
- 30 La expresión "secuencias "exógenas" incluyen moléculas o secuencias que normalmente no están presentes en una célula en esa forma. La presencia normal incluye la presencia con respecto a la etapa de desarrollo particular y las condiciones ambientales de la célula. Una molécula o secuencia exógena, por ejemplo, puede incluir una versión mutada de una secuencia endógena correspondiente dentro de la célula, tal como una versión humanizada de la secuencia endógena, o puede incluir una secuencia correspondiente a una secuencia endógena dentro de la célula pero en una forma diferente (es decir, no dentro de un cromosoma). Por el contrario, las moléculas o secuencias endógenas incluyen moléculas o secuencias que normalmente están presentes en esa forma en una célula particular en una etapa de desarrollo particular en condiciones ambientales particulares.
- 35 El término "heterólogo", cuando se usa en el contexto de un ácido nucleico o una proteína indica que el ácido nucleico o la proteína comprende al menos dos segmentos que no se encuentran juntos de forma natural en la misma molécula. Por ejemplo, el término "heterólogo", cuando se usa con referencia a segmentos de un ácido nucleico o segmentos de una proteína, indica que el ácido nucleico o la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí (por ejemplo, unidas entre sí) en la naturaleza. Como ejemplo, una región "heteróloga" de un vector de ácido nucleico es un segmento de ácido nucleico dentro o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra asociado con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de un vector de ácido nucleico podría incluir una secuencia codificante flanqueada por secuencias que no se encuentran asociadas con la secuencia codificante en la naturaleza. Del mismo modo, una región "heteróloga" de una proteína es un segmento de aminoácidos dentro o unido a otra molécula peptídica que no se encuentra asociado con la otra molécula peptídica en la naturaleza (p. ej., una proteína de fusión o una proteína con una etiqueta). De forma similar, un ácido nucleico o proteína puede comprender un marcador heterólogo o una secuencia de secreción o localización heteróloga.
- 40 La "optimización de codones" aprovecha la degeneración de los codones, que se muestra por la multiplicidad de combinaciones de codones de tres pares de bases que especifican un aminoácido, y generalmente incluye un proceso de modificación de una secuencia de ácido nucleico para mejorar la expresión en células hospedadoras particulares mediante el reemplazo de al menos un codón de la secuencia nativa con un codón que se usa con más frecuencia o más frecuentemente en los genes de la célula hospedadora mientras se mantiene la secuencia de aminoácidos nativa. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 puede modificarse para sustituir codones que tengan una mayor frecuencia de uso en una célula procariota o eucariota determinada, incluyendo una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata, una célula de hámster o cualquier otra célula hospedadora, en comparación con la
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

secuencia de ácido nucleico de origen natural. Están disponibles tablas de uso de codones, por ejemplo, en la "Base de datos de uso de codones". Estas tablas se pueden adaptar de varias maneras. Véase Nakamura *et al.* (2000) Nucleic Acids Research 28:292. También se encuentran disponibles algoritmos informáticos para la optimización de codones de una secuencia particular para su expresión en un hospedador particular (véase, p. ej., Gene Forge).

- 5 El término "locus" se refiere a una ubicación específica de un gen (o secuencia significativa), secuencia de ADN, secuencia que codifica un polipéptido, o posición en un cromosoma del genoma de un organismo. Por ejemplo, un locus "*Ttr*" puede referirse a la ubicación específica de un gen *Ttr*, secuencia de ADN de *Ttr*, secuencia codificante de transtirretina o posición de *Ttr* en un cromosoma del genoma de un organismo en el que se ha identificado dónde 10 reside dicha secuencia. Un "locus "*Ttr*" puede comprender un elemento regulador de un gen *Ttr*, que incluye, por ejemplo, un potenciador, un promotor, una región no traducida (UTR) 5' y/o 3' o una combinación de los mismos.

- 15 El término "gen" se refiere a una secuencia de ADN en un cromosoma que codifica un producto (por ejemplo, un producto de ARN y/o un producto polipeptídico) e incluye la región codificante interrumpida con intrones no codificantes y la secuencia ubicada adyacente a la región codificante en los extremos tanto 5' como 3' de modo que el gen corresponda al ARNm de longitud completa (incluidas las secuencias no traducidas 5' y 3'). El término "gen" también incluye otras secuencias no codificantes que incluyen secuencias reguladoras (p. ej., promotores, potenciadores y sitios de unión de factores de transcripción), señales de poliadenilación, sitios internos de entrada al ribosoma, 20 silenciadores, secuencia aislante y regiones de unión a la matriz. Estas secuencias pueden estar cerca de la región codificante del gen (por ejemplo, dentro de 10 kb) o en sitios distantes, e influyen en el nivel o velocidad de transcripción y traducción del gen.

- 25 El término "alelo" se refiere a una forma variante de un gen. Algunos genes tienen una diversidad de formas diferentes, que se encuentran en la misma posición, o locus genético, en un cromosoma. Un organismo diploide tiene dos alelos en cada locus genético. Cada par de alelos representa el genotipo de un locus genético específico. Los genotipos se describen como homocigotos si hay dos alelos idénticos en un locus particular y como heterocigotos si los dos alelos difieren.

- 30 La "región codificante" o "secuencia codificante" de un gen consiste en la porción de ADN o ARN de un gen, compuesto por exones, que codifica una proteína. La región comienza en el codón de inicio en el extremo 5' y termina en el codón de terminación en el extremo 3'.

- 35 Un "promotor" es una región reguladora de ADN que normalmente comprende una caja TATA capaz de dirigir la ARN polimerasa II para iniciar la síntesis de ARN en el sitio de inicio de la transcripción apropiado para una secuencia polinucleotídica particular. Un promotor puede comprender adicionalmente otras regiones que influyen en la velocidad de inicio de la transcripción. Las secuencias promotoras divulgadas en el presente documento modulan la transcripción de un polinucleótido unido operativamente. Un promotor puede ser activo en uno o más de los tipos de células divulgados en el presente documento (p. ej., una célula eucariota, una célula de mamífero no humano, una célula humana, una célula de roedor, una célula pluripotente, un embrión en fase unicelular, una célula diferenciada, o una 40 combinación de las mismas. Un promotor puede ser, por ejemplo, un promotor constitutivamente activo, un promotor condicional, un promotor inducible, un promotor temporalmente restringido (por ejemplo, un promotor regulado por el desarrollo), o un promotor espacialmente restringido (por ejemplo, un promotor específico de célula o de tejido). Se pueden encontrar ejemplos de promotores, por ejemplo, en el documento WO 2013/176772,

- 45 "Unión operativa" o estar "unido operativamente" incluye la yuxtaposición de dos o más componentes (por ejemplo, un promotor y otro elemento de secuencia) de manera que ambos componentes funcionen normalmente y permitan la posibilidad de que al menos uno de los componentes pueda mediar una función que es ejercida sobre al menos uno de los otros componentes. Por ejemplo, un promotor puede estar unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor controla el nivel de transcripción de la secuencia codificante en respuesta a la presencia o ausencia de 50 uno o más factores reguladores de la transcripción. La unión operativa puede incluir secuencias que sean contiguas entre sí o que actúen en trans (por ejemplo, una secuencia reguladora puede actuar a distancia para controlar la transcripción de la secuencia codificante).

- 55 La "complementariedad" de los ácidos nucleicos significa que una secuencia de nucleótidos en una cadena de ácido nucleico, debido a la orientación de sus grupos de nucleobases, forma enlaces de hidrógeno con otra secuencia en una cadena de ácido nucleico opuesta. Las bases complementarias en el ADN suelen ser A con T y C con G. En el ARN, normalmente son C con G y U con A. La complementariedad puede ser perfecta o sustancial/suficiente. La complementariedad perfecta entre dos ácidos nucleicos significa que los dos ácidos nucleicos pueden formar una doble hélice en la que cada base de la doble hélice está unida a una base complementaria mediante emparejamiento de Watson-Crick. Complementaria sustancial o suficiente significa que una secuencia en una cadena no es completa y/o perfectamente complementaria a una secuencia en una cadena opuesta, pero que se produce un enlace suficiente entre las bases de las dos cadenas para formar un complejo híbrido estable en un conjunto de condiciones de hibridación (p. ej., concentración de sal y temperatura). Tales condiciones pueden predecirse usando las secuencias y cálculos matemáticos convencionales para predecir la Tm (temperatura de fusión) de las cadenas hibridadas, o 60 mediante la determinación empírica de la Tm usando métodos habituales. La Tm incluye la temperatura a la que una población de complejos de hibridación formados entre dos cadenas de ácido nucleico se desnaturaliza en un 50 % (es

decir, una población de moléculas de ácido nucleico bicatenario se disocia a la mitad en cadenas sencillas). A una temperatura por debajo de la T_m , se favorece la formación de un complejo de hibridación, mientras que a una temperatura superior a la T_m , se favorece la fusión o separación de las cadenas en el complejo de hibridación. La T_m puede estimarse para un ácido nucleico que tiene un contenido de G+C conocido en una solución acuosa de NaCl 1 M usando, p. ej., $T_m=81,5+0,41(\% \text{ G+C})$, aunque otros cálculos de T_m conocidos tienen en cuenta las características estructurales del ácido nucleico.

- 5 "Condición de hibridación" incluye el entorno acumulativo en el que una cadena de ácido nucleico se une a una 10 segunda cadena de ácido nucleico mediante interacciones de cadenas complementarias y enlaces de hidrógeno para producir un complejo de hibridación. Tales condiciones incluyen los componentes químicos y sus concentraciones (p. 15 ej., sales, agentes quelantes, formamida) de una solución acuosa u orgánica que contiene los ácidos nucleicos, y la temperatura de la mezcla. Otros factores, tales como la duración del tiempo de incubación o las dimensiones de la cámara de reacción pueden contribuir al entorno. Véase, p. ej., Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a ed., págs. 1,90-1,91, 9,47-9,51, 11,47-11,57 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

20 La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque es posible que 25 haya desajustes entre bases. Las condiciones apropiadas para la hibridación entre dos ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación, variables que son bien conocidas. Cuanto mayor sea el grado de complementación entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de la temperatura de fusión (30 T_m) para híbridos de ácidos nucleicos que tengan esas secuencias. Para hibridaciones entre ácidos nucleicos con tramos cortos de complementariedad (por ejemplo, complementariedad superior a 35 o menos, 30 o menos, 25 o menos, 22 o menos, 20 o menos o 18 o menos nucleótidos), la posición de los desajustes se vuelve importante (véase 35 Sambrook *et al.*, supra, 11,7-11,8). Normalmente, la longitud de un ácido nucleico hibridable es de al menos 40 aproximadamente 10 nucleótidos. Las longitudes mínimas ilustrativas para un ácido nucleico hibridable incluyen al menos aproximadamente 15 nucleótidos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos, al menos aproximadamente 22 nucleótidos, al menos aproximadamente 25 nucleótidos y al menos aproximadamente 30 nucleótidos. Asimismo, la temperatura y la concentración de sal de la solución de lavado se pueden ajustar cuando sea necesario de acuerdo con factores tales como la longitud de la región de complementación y el grado de complementación.

30 No es necesario que la secuencia del polinucleótido sea un 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana para que sea específicamente hibridable. Por otra parte, un polinucleótido puede hibridarse sobre uno o más 35 segmentos de modo que los segmentos intermedios o adyacentes no estén implicados en el suceso de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle o estructura de horquilla). Un polinucleótido (p. ej., ARNg) puede comprender al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácido nucleico diana a la que están dirigidos. Por ejemplo, un ARNg en el que 18 de 20 nucleótidos son complementarios a una región diana y, por lo tanto, se hibridarían específicamente, representaría un 90 % de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden estar agrupados o intercalados con nucleótidos complementarios y no tienen que ser contiguos entre sí o con nucleótidos complementarios.

40 El porcentaje de complementariedad entre tramos particulares de secuencias de ácidos nucleicos dentro de ácidos nucleicos se puede determinar de forma rutinaria utilizando programas BLAST (herramientas básicas de búsqueda de alineación local) y programas PowerBLAST (Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Zhang y Madden (1997) 45 Genome Res. 7:649-656,) o mediante el uso del programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando configuraciones predeterminadas, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.

50 Los métodos y composiciones divulgados en el presente documento emplean una diversidad de componentes 55 diferentes. Algunos componentes a lo largo de la descripción pueden tener variantes y fragmentos activos. Dichos componentes incluyen, por ejemplo, proteínas Cas, ARN de CRISPR, ARNtracr y ARN guía. La actividad biológica para cada uno de estos componentes se describe en otra parte del presente documento. El término "funcional" se refiere a la capacidad innata de una proteína o ácido nucleico (o un fragmento o variante del mismo) para presentar una actividad o función biológica. Tales actividades o funciones biológicas pueden incluir, por ejemplo, la capacidad de una proteína Cas para unirse a un ARN guía y a una secuencia de ADN diana. Las funciones biológicas de los fragmentos o variantes funcionales pueden ser las mismas o, de hecho, pueden cambiarse (por ejemplo, con respecto a su especificidad, selectividad o eficacia) en comparación con el original, pero con retención de la función biológica básica.

60 El término "variante" se refiere a una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia más prevalente en una población (por ejemplo, en un nucleótido) o una secuencia de proteínas diferente de la secuencia más prevalente en una población (por ejemplo, en un aminoácido).

65 El término "fragmento", cuando se refiere a una proteína, significa una proteína que es más corta o tiene menos aminoácidos que la proteína de longitud completa. El término "fragmento", cuando se refiere a un ácido nucleico significa un ácido nucleico que es más corto o tiene menos nucleótidos que el ácido nucleico de longitud completa. Un

fragmento puede ser, por ejemplo, un fragmento N-terminal (es decir, eliminación de una porción del extremo C-terminal de la proteína), un fragmento C-terminal (es decir, eliminación de una porción del extremo N-terminal de la proteína), o un fragmento interno.

- 5 "Identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas hacen referencia a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación específica. Cuando se usa el porcentaje de identidad de secuencia en referencia a proteínas, las posiciones de los restos que no son idénticas a menudo difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas, donde se sustituyen restos de aminoácido por otros restos de aminoácido con propiedades químicas similares (p. ej., carga o hidrofobia) y, por lo tanto, no cambian las propiedades funcionales de la molécula. 10 Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservativas, puede ajustarse por exceso el porcentaje de identidad de secuencia para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren por dichas sustituciones conservativas tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos. Normalmente, esto implica puntuar una sustitución conservativa como un emparejamiento erróneo 15 parcial en lugar de completo, aumentando de este modo el porcentaje de identidad de secuencia. Así pues, por ejemplo, cuando se asigna a un aminoácido idéntico una puntuación de 1 y se asigna a una sustitución no conservativa una puntuación de cero, se asigna a una sustitución conservativa una puntuación entre cero y 1. La puntuación de sustituciones conservativas se calcula, p. ej., como se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).
- 20 20 "Porcentaje de identidad de secuencia" incluye el valor determinado comparando dos secuencias óptimamente alineadas (el mayor número de restos perfectamente coincidentes) en una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para 25 la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales se encuentran la base de ácido nucleico o el resto de aminoácido idénticos en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Salvo que se indique lo contrario (por ejemplo, la secuencia más corta incluye una secuencia heteróloga 30 unida), la ventana de comparación es la longitud total de la más corta de las dos secuencias que se comparan.

A menos que se indique lo contrario, los valores de identidad/similitud de secuencia incluyen el valor obtenido utilizando GAP versión 10 utilizando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos utilizando una ponderación de GAP de 50 y una ponderación de la longitud de 3 y la matriz de puntuación 35 nwgapdna.cmp; % de identidad y % de similitud de una secuencia de aminoácidos utilizando una ponderación de GAP de 8 y una ponderación de la longitud de 2 y la matriz de puntuación BLOSUM62; o cualquier programa equivalente de los mismos. "Programa equivalente" incluye cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualquiera en cuestión, genera una alineación que tiene emparejamientos de restos de nucleótidos o aminoácidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico en comparación con la 40 alineación correspondiente generada por GAP Versión 10.

El término "sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a la sustitución de un aminoácido que normalmente está presente en la secuencia por un aminoácido diferente de tamaño, carga o polaridad similar). Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un resto no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina o leucina 45 por otro resto no polar. Del mismo modo, los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un resto polar (hidrófilo) por otro, tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, o entre glicina y serina. Además, la sustitución de un resto básico tal como la lisina, arginina o histidina por otro, o la sustitución de un resto ácido tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro resto ácido son ejemplos adicionales de sustituciones 50 conservativas. Los ejemplos de sustituciones no conservativas incluyen la sustitución de un resto de aminoácido no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina, leucina, alanina o metionina para un resto polar (hidrófilo) tal como cisteína, glutamina, ácido glutámico o lisina y/o un resto polar para un resto no polar. Las categorizaciones típicas de aminoácidos se resumen en la siguiente **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificaciones de aminoácidos.

Alanina	Ala	A	No polar	Neutro	1,8
Arginina	Arg	R	Polar	Positivo	-4,5
Asparagina	Asn	N	Polar	Neutro	-3,5
Ácido aspártico	Asp	D	Polar	Negativo	-3,5
Cisteína	Cys	C	No polar	Neutro	2,5
Ácido glutámico	Glu	E	Polar	Negativo	-3,5
Glutamina	Gln	Q	Polar	Neutro	-3,5
Glicina	Gly	G	No polar	Neutro	-0,4
Histidina	His	H	Polar	Positivo	-3,2
Isoleucina	Ile	I	No polar	Neutro	4,5

(continuación)

Leucina	Leu	L	No polar	Neutro	3,8
Lisina	Lys	K	Polar	Positivo	-3,9
Metionina	Met	M	No polar	Neutro	1,9
Fenilalanina	Phe	F	No polar	Neutro	2,8
Prolina	Pro	P	No polar	Neutro	-1,6
Serina	Ser	S	Polar	Neutro	-0,8
Treonina	Thr	T	Polar	Neutro	-0,7
Triptófano	Trp	W	No polar	Neutro	-0,9
Tirosina	Tyr	Y	Polar	Neutro	-1,3
Valina	Val	V	No polar	Neutro	4,2

Una secuencia "homóloga" (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico) incluye una secuencia que es idéntica o sustancialmente similar a una secuencia de referencia conocida, de tal forma que es, por ejemplo, al menos un 50 %,

- 5 al menos un 55 %, 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 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de referencia conocida. Las secuencias homólogas pueden incluir, por ejemplo, secuencias ortólogas y secuencias parálogas. Los genes homólogos, por ejemplo, normalmente descienden de una secuencia de ADN ancestral común, ya sea a través de un evento de especiación (genes ortólogos) o un evento de duplicación genética (genes parálogos). Los genes "ortólogos" incluyen genes de diferentes especies que evolucionaron a partir de un gen ancestral común mediante especiación. Los ortólogos suelen conservar la misma función en el curso de la evolución. Los genes "parálogos" incluyen genes relacionados por duplicación dentro de un genoma. Los parálogos pueden desarrollar nuevas funciones en el curso de la evolución.
- 10 15 La expresión "*in vitro*" incluye entornos artificiales y procesos o reacciones que tienen lugar dentro de un entorno artificial (por ejemplo, un tubo de ensayo). La expresión "*in vivo*" incluye entornos naturales (p. ej., una célula, organismo o cuerpo) y procesos o reacciones que ocurren dentro de un entorno natural. La expresión "*ex-vivo*" incluye células que se han extraído del cuerpo de un individuo y procesos o reacciones que tienen lugar dentro de dichas células.
- 20 25 La expresión "gen indicador" se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica un producto génico (típicamente una enzima) que se analiza de manera fácil y cuantificable cuando una construcción que comprende la secuencia del gen indicador unida operativamente a un elemento promotor y/o potenciador endógeno o heterólogo se introduce en células que contienen (o que pueden hacerse que contengan) los factores necesarios para la activación de los elementos promotores y/o potenciadores. Los ejemplos de genes indicadores incluyen, pero sin limitación, genes que codifican la beta-galactosidasa (*lacZ*), los genes bacterianos de cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*), genes de luciferasa de luciérnaga, genes que codifican beta-glucuronidasa (GUS) y genes que codifican proteínas fluorescentes. Una "proteína indicadora" se refiere a una proteína codificada por un gen indicador.
- 30 35 40 45 50 45 55 La expresión "proteína indicadora fluorescente", tal como se utiliza en el presente documento, significa una proteína indicadora que es detectable basándose en la fluorescencia, en donde la fluorescencia puede proceder directamente de la proteína indicadora, la actividad de la proteína indicadora sobre un sustrato fluorogénico o una proteína con afinidad por la unión a un compuesto con etiqueta fluorescente. Los ejemplos de proteínas fluorescentes incluyen proteínas verdes fluorescentes (p. ej., GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, eGFP, Emerald, Azami verde, Azami verde monomérico, CopGFP, AceGFP y ZsGreen1), proteínas amarillas fluorescentes (p. ej., YFP, eYFP, Citrina, Venus, YPet, PhiYFP y ZsYellow1), proteínas azules fluorescentes (p. ej., BFP, eBFP, eBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire y T-sapphire), proteínas de color cian fluorescentes (p. ej., CFP, eCFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1 y Midoriishi-Cyan), proteínas rojas fluorescentes (p. ej., RFP, mKate, mKate2, mPlum, monómero de DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, monómero de DsRed, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry y Jred), proteínas de color naranja fluorescentes (p. ej., mOrange, mKO, Kusabira-Naranja, Kusabira-naranja monomérico, mTangerine y tdTomato) y cualquier otra proteína fluorescente adecuada cuya presencia en las células pueda detectarse mediante métodos de citometría de flujo.
- La reparación en respuesta a roturas de doble cadena (DSB) se produce principalmente a través de dos vías de reparación del ADN conservadas: recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ). Véase Kasperek & Humphrey (2011) Seminars in Cell & Dev. Biol. 22:886-897. Del mismo modo, la reparación de un ácido nucleico diana mediada por un ácido nucleico donante exógeno puede incluir cualquier proceso de intercambio de información genética entre los dos polinucleótidos.
- El término "recombinación" incluye cualquier proceso de intercambio de información genética entre dos polinucleótidos y puede producirse por cualquier mecanismo. La recombinación puede producirse mediante reparación dirigida por homología (HDR) o recombinación homóloga (HR). La HDR o HR incluye una forma de reparación de ácidos nucleicos que puede requerir homología de secuencia de nucleótidos, utiliza una molécula "donante" como molde para la reparación de una molécula "diana" (es decir, la que experimentó la rotura de la doble cadena) y conduce a la transferencia de información genética del donante a la diana. Sin desear quedar ligados a teoría particular alguna, dicha transferencia puede implicar la corrección de desajustes del ADN heterodúplex que se forma entre la diana rota

y el donante, y/o hibridación de cadena dependiente de síntesis, en la que el donante se utiliza para resintetizar la información genética que se convertirá en parte de la diana y/o procesos relacionados. En algunos casos, el polinucleótido donante, una porción del polinucleótido donante, una copia del polinucleótido donante o una porción de una copia del polinucleótido donante se integra en el ADN diana. Véase Wang *et al.* (2013) Cell 153:910-918; Mandates *et al.* (2012) PLOS ONE 7:e45768:1-9; y Wang *et al.* (2013) Nat Biotechnol. 31:530-532.

NHEJ incluye la reparación de roturas de doble cadena en un ácido nucleico mediante la ligadura directa de los extremos de la rotura entre sí o con una secuencia exógena sin la necesidad de un molde homólogo. La ligadura de secuencias no contiguas por NHEJ a menudo puede dar como resultado eliminaciones, inserciones o translocaciones cerca del sitio de la rotura bicitánera. Por ejemplo, NHEJ también puede dar como resultado la integración dirigida de un ácido nucleico donante exógeno mediante la ligadura directa de los extremos rotos con los extremos del ácido nucleico donante exógeno (es decir, captura basada en NHEJ). Dicha integración dirigida mediada por NHEJ puede preferirse para la inserción de un ácido nucleico donante exógeno cuando las vías de reparación dirigida por homología (HDR) no son fácilmente utilizables (por ejemplo, en células que no se dividen, células primarias y células que realizan mal la reparación del ADN basada en homología). Adicionalmente, a diferencia de la reparación dirigida por homología, no se necesita conocimiento sobre grandes regiones de identidad de secuencia que flanquean el sitio de escisión, lo que puede resultar beneficioso cuando se intenta la inserción dirigida en organismos que tienen genomas cuya secuencia genómica no se conoce completamente. La integración puede proceder mediante la ligadura de extremos romos entre el ácido nucleico donante exógeno y la secuencia genómica escindida, o mediante la ligadura de extremos adhesivos (es decir, que tienen salientes 5' o 3') usando un ácido nucleico donante exógeno que está flanqueado por salientes que son compatibles con los generados por un agente nucleasa en la secuencia genómica escindida. Véase, p. ej., los documentos US 2011/020722, WO 2014/033644, WO 2014/089290 y Maresca *et al.* (2013) Genoma Res. 23(3):539-546. Si se ligan extremos romos, puede ser necesaria la resección de la diana y/o del donante para generar regiones de microhomología necesarias para la unión de fragmentos, lo que puede crear alteraciones no deseadas en la secuencia diana.

La expresión "proteína de unión a antígeno" incluye cualquier proteína que se une a un antígeno. Los ejemplos de proteínas de unión a antígeno incluyen un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), un scFV, un bis-scFV, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un V-NAR, un VHH, un VL, un F(ab), un F(ab)₂, una DVD (proteína de unión a antígeno de dominio variable dual), una SVD (proteína de unión a antígeno de dominio variable único), un acoplador biespecífico de células T (BiTE) o un cuerpo de Davis (Patente de EE.UU. n.º 8.586.713).

El término "antígeno" se refiere a una sustancia, ya sea una molécula completa o un dominio dentro de una molécula, que es capaz de provocar la producción de anticuerpos con especificidad de unión a esa sustancia. El término antígeno también incluye sustancias que, en organismos hospedadores de tipo silvestre, no provocarían la producción de anticuerpos en virtud del autorreconocimiento, pero pueden provocar tal respuesta en un animal hospedador con ingeniería genética adecuada para romper la tolerancia inmunológica.

El término "epítopo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une una proteína de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo). Un epítopo puede formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos (también conocidos como epítopos lineales) normalmente se retienen tras la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario (también conocidos como epítopos conformacionales) normalmente se pierden durante el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo normalmente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones. Véase, p. ej., Epitope Mapping Protocols, en Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Un parátopo de anticuerpo como se describe en el presente documento generalmente comprende como mínimo una región determinante de complementariedad (CDR) que reconoce específicamente el epítopo heterólogo (por ejemplo, una región CDR3 de un dominio variable de cadena pesada y/o ligera).

El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de cadena pesada comprende tres dominios: C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera (C_L). Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada dominio variable de cadena pesada y cadena ligera comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3). La expresión anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D con respecto a su epítopo diana de aproximadamente 10⁻⁹ M o inferior (por ejemplo, aproximadamente 1

$\times 10^{-9}$ M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M o aproximadamente 1×10^{-12} M). En una realización, La K_n se mide por resonancia de plasmón superficial, p. ej., BIACORE™; en otra realización, la K_D se mide por ELISA.

- 5 La unión específica de una proteína de unión a antígeno a su antígeno diana incluye la unión con una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o 10^{10} M⁻¹. La unión específica es, de manera detectable, de mayor magnitud y puede diferenciarse de la unión inespecífica que se produce en al menos una diana no relacionada. La unión específica puede ser el resultado de la formación de enlaces entre grupos funcionales particulares o de un ajuste espacial particular (por ejemplo, tipo cerradura y llave), mientras que la unión inespecífica suele ser el resultado de fuerzas de van der Waals. Sin embargo, la unión específica no implica necesariamente que un anticuerpo monoclonal se una a una y solo una diana.

10 La expresión "ARN antisentido" se refiere a un ARN monocatenario que es complementario a una cadena de ARN mensajero transcrita en una célula.

- 15 La expresión "ARN de interferencia pequeño (ARNip)" se refiere a una molécula de ARN típicamente bicatenaria que induce la vía de interferencia del ARN (ARNi). Estas moléculas pueden variar en longitud (generalmente entre 18-30 pares de bases) y contener diversos grados de complementariedad con su ARNm diana en la cadena antisentido. Algunos, aunque no todos, los ARNip tienen bases colgantes no apareadas en el extremo 5' o 3' de la cadena sentido y/o la cadena antisentido. El término "ARNip" incluye dúplex de dos cadenas separadas, así como cadenas individuales
- 20 que pueden formar estructuras en horquilla que comprenden una región dúplex. La estructura bicatenaria puede ser, por ejemplo, menor de 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la estructura bicatenaria puede ser de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 19-25 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 19-23 nucleótidos de longitud.

- 25 La expresión "ARN en horquilla corto (ARNhc)" se refiere a una cadena única de bases de ARN que se autohibrida en una estructura en horquilla y puede inducir la vía de interferencia del ARN (ARNi) tras el procesamiento. Estas moléculas pueden variar en longitud (generalmente de aproximadamente 50-90 nucleótidos de longitud o, en algunos casos, hasta más de 250 nucleótidos de longitud, p. ej., para ARNhc adaptado a microARN). Las moléculas de ARNhc se procesan dentro de la célula para formar ARNip, lo que a su vez puede reducir la expresión genética. Los ARNhc se pueden incorporar en vectores. El término "ARNhc" también se refiere a una molécula de ADN a partir de la cual se puede transcribir una molécula de ARN en horquilla corto.

- 30 Las composiciones o métodos "que comprenden" o "que incluyen" uno o más elementos enumerados pueden incluir otros elementos no enumerados específicamente. Por ejemplo, una composición que "comprende" o "incluye" una proteína puede contener la proteína sola o en combinación con otros ingredientes. La expresión de transición "que consiste esencialmente en" significa que debe interpretarse que el alcance de una reivindicación abarca los elementos especificados enumerados en la reivindicación y los que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. Así pues, no está previsto que la expresión "que consiste esencialmente en", cuando se usa en una reivindicación de esta invención, se interprete como equivalente a "que comprende".

- 40 "Opcional" u "opcionalmente" significa que el suceso o circunstancia descrito a continuación puede suceder o no y que la descripción incluye casos en los que el suceso o circunstancia ocurre y casos en los que no.

- 45 La designación de un intervalo de valores incluye todos los números enteros dentro del intervalo o que lo definen, y todos los subintervalos definidos por números enteros dentro del intervalo.

- A menos que resulte evidente de otro modo por el contexto, el término "aproximadamente" abarca valores dentro de un margen estándar de error de medición (por ejemplo, SEM) de un valor establecido.

- 50 El término "y/o" se refiere y abarca todas y todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la ausencia de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

- 55 El término "o" se refiere a un miembro cualquiera de una lista particular y también incluye cualquier combinación de miembros de esa lista.

- Las formas singulares de los artículos "un", "una", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "una proteína" o "al menos una proteína" puede incluir una pluralidad de proteínas, incluyendo mezclas de las mismas.

- 60 Estadísticamente significativo significa $p \leq 0,05$.

Descripción detallada

- 65 I. Descripción general

Los roedores, métodos y células de roedor de la invención son los establecidos en las reivindicaciones. No forman

parte de la invención animales no humanos distintos de los roedores.

En el presente documento se divultan genomas de animales no humanos, células de animales no humanos y animales no humanos que comprenden en su genoma un locus *TTR* humanizado y métodos de uso de dichas células de

5 animales no humanos y animales no humanos. Las células de animales no humanos o los animales no humanos que comprenden un locus *TTR* humanizado expresa una proteína transtirretina humana o una proteína transtirretina químérica que comprende uno o más fragmentos de una proteína transtirretina humana. Dichas células de animales no humanos y dichos animales no humanos se pueden usar para evaluar el suministro o la eficacia de agentes dirigidos 10 a *TTR* humana (por ejemplo, agentes de edición del genoma CRISPR/Cas9) *ex-vivo* o *in vivo* y se pueden usar en métodos para optimizar el suministro o la eficacia de tales agentes *ex-vivo* o *in vivo*.

En algunas de las células de animales no humanos y de los animales no humanos divulgados en el presente documento, la mayoría o la totalidad del ADN genómico de *TTR* humano se inserta en el locus *Ttr* del animal no humano ortólogo correspondiente. En algunas de las células de animales no humanos y de los animales no humanos

15 divulgados en el presente documento, la mayoría o la totalidad del ADN genómico de *Ttr* del animal no humano se reemplaza uno por uno con el correspondiente ADN genómico de *TTR* humano ortólogo. En comparación con animales no humanos con inserciones de ADNc, los niveles de expresión deben ser más altos cuando se mantienen la estructura intrón-exón y la maquinaria de empalme, porque es más probable que los elementos reguladores conservados queden intactos y las transcripciones empalmadas que se someten a procesamiento de ARN son más estables que los ADNc.

20 Por el contrario, la inserción de ADNc de *TTR* humano (p. ej., junto con la inserción de un intrón de beta-globina artificial en la 5' UTR) en un locus *Ttr* de animal no humano anularía elementos reguladores conservados tales como los contenidos dentro del primer exón e intrón del *Ttr* de animal no humano. Es más probable que el reemplazo de la secuencia genómica de animal no humano con la correspondiente secuencia genómica humana ortóloga o la inserción

25 de la secuencia genómica de *TTR* humana en el correspondiente locus *Ttr* no humano ortólogo dé como resultado la expresión fiel del transgén a partir del locus *Ttr* endógeno. De forma similar, los animales no humanos transgénicos con inserción transgénica de secuencias codificantes de *TTR* humana en un locus genómico aleatorio en lugar del locus *Ttr* del animal no humano endógeno no reflejarán con tanta precisión la regulación endógena de la expresión de *Ttr*. Un alelo *TTR* humanizado resultante del reemplazo de la mayoría o de todos los ADN genómicos de animales no humanos uno por uno con el correspondiente ADN genómico humano ortólogo o la inserción de la secuencia genómica

30 de *TTR* humano en el correspondiente locus *Ttr* no humano ortólogo proporcionará la verdadera diana humana o una aproximación cercana de la verdadera diana humana de los reactivos dirigidos a *TTR* humana (por ejemplo, reactivos CRISPR/Cas9 diseñados para dirigirse a *TTR* humano), lo cual permite ensayar la eficacia y el modo de acción de dichos agentes en animales vivos, así como en estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos en un entorno donde la proteína humanizada y el gen humanizado son la única versión de *TTR* presente.

35 **II. Roedores que comprenden un locus *TTR* humanizado**

Los roedores y las células de roedor de la invención son los establecidos en las reivindicaciones. No forman parte de la invención animales no humanos distintos de los roedores.

40 Las células y animales no humanos divulgados en el presente documento comprenden en su genoma un locus *TTR* humanizado. Las células o animales no humanos que comprenden un locus *TTR* humanizado expresan una proteína transtirretina humana o una proteína transtirretina químérica parcialmente humanizada en la que uno o más fragmentos de la proteína transtirretina nativa se han reemplazado con fragmentos correspondientes de transtirretina humana.

45 **A. Transtirretina (TTR)**

Los roedores y las células de roedor de la invención son los establecidos en las reivindicaciones.

50 Las células y animales no humanos descritos en el presente documento comprenden un locus *transtirretina* (*Ttr*) humanizado. La transtirretina (TTR) es una proteína de transporte de líquido cefalorraquídeo y de suero de 127 aminoácidos y 55 kDa sintetizada principalmente por el hígado pero también producida por el plexo coroideo. También se la conoce como prealbúmina, prealbúmina de unión a tiroxina, ATTR, TBPA, CTS, CTS1, HEL111, HsT2651 y PALB. En su estado nativo, la TTR existe como un tetramero. En homocigotos, los homotetrámeros comprenden subunidades idénticas ricas en láminas beta de 127 aminoácidos. En heterocigotos, los tetrameros de TTR pueden estar formados por subunidades variantes y/o de tipo silvestre, normalmente combinadas de forma estadística. La TTR es responsable del transporte de tiroxina (T4) y RBP (proteína de unión a retinol) unida a retinol tanto en el suero como en el líquido cefalorraquídeo.

60 A menos que se desprenda lo contrario del contexto, la referencia a la transtirretina humana (TTR) o sus fragmentos o dominios incluye las secuencias de aminoácidos humanas naturales de tipo silvestre que incluyen isoformas y variantes alélicas de las mismas. La proteína precursora de transtirretina incluye una secuencia señal (normalmente de 20 aminoácidos), mientras que la proteína transtirretina madura no. Las secuencias de polipéptidos TTR ilustrativas se designan con los números de acceso NP_000362.1 (NCBI) y P02766.1 (UniProt) (idénticos, cada uno de ellos establecidos en la SEQ ID NO: 1). Los restos pueden numerarse de acuerdo con el número de acceso de UniProt P02766.1, con el primer aminoácido de la proteína madura (es decir, sin incluir la secuencia señal de 20 aminoácidos)

denominada resto 1. En cualquier otra proteína TTR, los restos se numeran de acuerdo con los restos correspondientes en el número de acceso de UniProt P02766.1 en la alineación máxima.

- 5 El gen *TTR* humano está ubicado en el cromosoma 18 e incluye cuatro exones y tres intrones. Un gen *TTR* humano ilustrativo es de los restos 5001-12258 en la secuencia designada por el número de acceso del GenBank NG_009490.1 (SEQ ID NO: 3). Los cuatro exones de la SEQ ID NO: 3 incluyen los restos 1-205, 1130-1260, 3354-3489 y 6802-7258, respectivamente. La secuencia codificante de *TTR* de la SEQ ID NO: 3 incluye los restos 137-205, 1130-1260, 3354-3489 y 6802-6909. Un ARNm de *TTR* humano ilustrativo se designa con el número de acceso del NCBI NM_000371.3 (SEQ ID NO: 4).
- 10 10 El gen *Ttr* de ratón se localiza en el cromosoma 18 y también incluye cuatro exones y tres intrones. Un gen *Ttr* de ratón ilustrativo es del resto 20665250 a 20674326 de la secuencia designada por el número de acceso del GenBank NC_000084.6 (SEQ ID NO: 5). Los cuatro exones de la SEQ ID NO: 5 incluyen los restos 1-258, 1207-1337, 4730-4865 y 8382-9077, respectivamente. La secuencia codificante de *Ttr* en la SEQ ID NO: 5 incluye los restos 190-258, 1207-1337, 4730-4865 y 8382-8489. Una proteína TTR de ratón ilustrativa se designa con el número de acceso de UniProt P07309.1 o el número de acceso de NCBI NP_038725.1 (idénticos, cada uno de ellos se establece en la SEQ ID NO: 6). Un ARNm de *Ttr* de ratón ilustrativo se designa con el número de acceso del NCBI NM_013697.5 (SEQ ID NO: 7).
- 15 20 Las siguientes proteínas TTR se proporcionan como ejemplos y no forman parte de la invención. Una proteína TTR de rata ilustrativa se designa con el número de acceso de UniProt P02767. Una proteína TTR de cerdo ilustrativa se designa con el número de acceso de UniProt P50390. Una proteína TTR de pollo ilustrativa se designa con el número de acceso de UniProt P27731. Una proteína TTR de vaca ilustrativa se designa con el número de acceso de UniProt O46375. Una proteína TTR de oveja ilustrativa se designa con el número de acceso de UniProt P12303. Una proteína TTR de chimpancé ilustrativa se designa con el número de acceso de UniProt Q5U7I5. Una proteína TTR de orangután ilustrativa se designa con el número de acceso de UniProt Q5NVS2. Una proteína TTR de conejo ilustrativa se designa con el número de acceso de UniProt P07489. Una proteína TTR de mono cynomolgus (macaco) ilustrativa se designa con el número de acceso de UniProt Q8HXW1.
- 25 30 35 La amiloidosis por transtirretina (TTR) es un trastorno sistémico caracterizado por una TTR plegada de forma errónea patogénica y el depósito extracelular de fibrillas de amiloide compuestas de TTR. La amiloidosis por TTR generalmente se produce por la desestabilización de la forma del tetrámero de TTR nativo (debido a condiciones ambientales o genéticas), que lleva a una disociación, plegamiento erróneo y agregación de TTR en fibrillas de amiloide que se acumulan en varios órganos y tejidos, produciendo una disfunción progresiva. Los monómeros disociados tienen propensión a formar agregados de proteínas plegados de forma errónea y fibrillas de amiloide.
- 30 40 En los seres humanos, tanto los tetrámeros de TTR de tipo silvestre como los tetrámeros mixtos formados por subunidades mutantes y de tipo silvestre pueden disociarse, plegarse de forma errónea y agregarse, conduciendo el proceso de amiloidogénesis a la degeneración del tejido postmitótico. Así pues, las amiloidosis por TTR abarcan enfermedades causadas por TTR plegada de forma errónea patogénica resultante de mutaciones en TTR o resultante de una TTR plegada de forma errónea no mutante.
- 45 50 La amiloidosis sistémica senil (ASS) y la amiloidosis cardíaca senil (SCA) son tipos de amiloidosis relacionados con la edad que resultan del depósito de amiloide de TTR de tipo silvestre fuera y dentro de los cardiomiositos del corazón. La amiloidosis por TTR también es la forma más común de amiloidosis hereditaria (familiar), que se produce por mutaciones que desestabilizan la proteína TTR. Las amiloidosis por TTR asociadas con mutaciones puntuales en el gen TTR incluyen la polineuropatía amiloide familiar (FAP), miocardiopatía amiloide familiar (FAC) y amiloidosis selectiva del sistema nervioso central (CNSA).
- 55 B. Loci *TTR* humanizados
- Los loci *Ttr* de los roedores y de las células de roedor de la invención son los establecidos en las reivindicaciones.
- 60 65 Un locus *TTR* humanizado divulgado en el presente documento puede ser un locus *Ttr* en el que todo el gen *Ttr* se reemplaza con la correspondiente secuencia de *TTR* humano ortólogo o puede ser un locus *Ttr* en el que solo una porción del gen *Ttr* se reemplaza con la secuencia de *TTR* humano ortólogo correspondiente (es decir, humanizado). Una secuencia de *TTR* humano que corresponde a un segmento particular de las secuencias de *Ttr* endógeno se refiere a la región de *TTR* humano que se alinea con el segmento particular de la secuencia de *Ttr* endógeno cuando el *TTR* humano y el *Ttr* endógeno están alineados de manera óptima. Opcionalmente, la secuencia de *TTR* humano se modifica para optimizar los codones en función del uso de codones en el animal no humano. Las regiones reemplazadas o insertadas (es decir, humanizadas) pueden incluir regiones codificantes tales como un exón, regiones no codificantes tales como un intrón, regiones no traducidas o regiones reguladoras (p. ej., un promotor, un potenciador o un elemento de unión a represor transcripcional), o cualquier combinación de los mismos.
- 65 Un locus *TTR* humanizado es uno en el que una región del locus *Ttr* endógeno se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TTR* humano ortólogo correspondiente (p. ej., secuencia de *TTR* humano ortólogo de tipo silvestre).

La región reemplazada o insertada del locus *Ttr* endógeno comprende tanto una secuencia codificante (es decir, todo o parte de un exón) como una secuencia no codificante (es decir, todo o parte de un intrón), tal como al menos un exón y al menos un intrón. Cualquier reemplazo distinto de los reemplazos definidos en las reivindicaciones no forma parte de la invención. La región reemplazada o insertada que comprende tanto la secuencia codificante como la secuencia no codificante puede ser una región contigua del locus *Ttr* endógeno, lo que significa que no hay ninguna secuencia intermedia entre la secuencia codificante reemplazada o insertada y la secuencia no codificante reemplazada o insertada. Por ejemplo, la región reemplazada o insertada puede comprender al menos un exón y al menos un intrón adyacente. La región reemplazada o insertada puede comprender un exón, dos exones, tres exones, cuatro exones o todos los exones del locus *Ttr* endógeno. La secuencia de *TTR* humano insertado puede comprender un exón, dos exones, tres exones, cuatro exones o todos los exones de un gen *TTR* humano. Del mismo modo, la región reemplazada puede comprender un intrón, dos intrones, tres intrones o todos los intrones del locus *Ttr* endógeno. La secuencia de *TTR* humano insertada puede comprender un intrón, dos intrones, tres intrones o todos los intrones de un gen *TTR* humano. Opcionalmente, uno o más intrones y/o uno o más exones del locus *Ttr* endógeno permanecen sin modificar (es decir, ni se han eliminado ni se han reemplazado). Por ejemplo, el primer exón del locus *Ttr* endógeno puede permanecer sin modificar. De forma similar, el primer exón y el primer intrón del locus *Ttr* endógeno pueden permanecer sin modificar.

En un ejemplo específico, toda la secuencia codificante de la proteína precursora de transtirretina se puede eliminar y reemplazar con la correspondiente secuencia de *TTR* humano ortólogo. Por ejemplo, la región del locus *Ttr* endógeno que comienza en el codón de inicio y termina en el codón de terminación se puede eliminar y reemplazar con la correspondiente secuencia de *TTR* humano ortólogo. En otro ejemplo específico, se puede insertar la secuencia codificante completa para la proteína precursora de transtirretina humana. Por ejemplo, se puede insertar la región del locus *TTR* humano que comienza en el codón de inicio y termina en el codón de terminación.

25 También se pueden humanizar regiones flanqueantes no traducidas que incluyen secuencias reguladoras. El primer exón de un locus *Ttr* normalmente incluye una región 5' no traducida cadena arriba del codón de inicio. Del mismo modo, el último exón de un locus *Ttr* normalmente incluye una región 3' no traducida cadena abajo del codón de terminación. Las regiones cadena arriba del codón de inicio de *Ttr* y cadena abajo del codón de terminación de *Ttr* pueden no modificarse o pueden eliminarse y reemplazarse con la correspondiente secuencia de *TTR* humano ortólogo. La región 3' no traducida (UTR) está humanizada, pero la 5' UTR sigue siendo endógena. En otro ejemplo específico, la 5' UTR sigue siendo endógena y la 3' UTR de *TTR* humano se inserta en el locus *Ttr* endógeno. Por ejemplo, la 3' UTR de *TTR* humano puede reemplazar la 3' UTR endógena o puede insertarse sin reemplazar la 3' UTR endógena (por ejemplo, puede insertarse cadena arriba de la 3' UTR endógena).

35 Se humanizan una o más regiones del locus *Ttr* endógeno que codifican uno o más dominios de la proteína precursora de transtirretina. Del mismo modo, una o más regiones del locus *Ttr* endógeno que codifican uno o más dominios de la proteína precursora de transtirretina puede permanecer sin modificar (es decir, sin eliminarse ni reemplazarse). Por ejemplo, las proteínas precursoras de transtirretina normalmente tienen un péptido señal en el extremo N. El péptido señal puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. La región del locus *Ttr* endógeno que codifica el péptido señal puede permanecer sin modificar (es decir, ni eliminada ni reemplazada), o puede eliminarse y reemplazarse con la correspondiente secuencia de *TTR* humano ortólogo.

40 El locus *TTR* humanizado incluye el promotor de *Ttr* de roedor endógeno. La secuencia codificante de la proteína precursora de transtirretina en el locus *Ttr* del gen endógeno modificado genéticamente está unida operativamente al promotor de *Ttr* endógeno. Por ejemplo, la secuencia de *TTR* humano está unida operativamente al promotor de *Ttr* endógeno.

45 Como ejemplo específico, el locus *TTR* humanizado puede ser aquel en el que la región del locus *Ttr* endógeno que se elimina y reemplaza con la correspondiente secuencia de *TTR* humano ortólogo o la región del locus *TTR* humano que se inserta comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, la región del codón de inicio al codón de terminación de *Ttr*. La secuencia de *TTR* humano que se inserta comprende además una 3' UTR de *TTR* humano. Por ejemplo, la secuencia de *TTR* humano en el locus *TTR* humanizado puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la región desde el codón de inicio hasta el final de la 3' UTR de *TTR*. La secuencia codificante de *Ttr* en el locus *Ttr* endógeno modificado está unida operativamente al promotor de *Ttr* endógeno. La secuencia de *TTR* humano en el locus *TTR* humanizado puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 18. El locus *TTR* humanizado puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 14 o 15. La secuencia codificante (CDS) en el locus *TTR* humanizado puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 90 (o secuencias degeneradas de la misma que codifican la misma proteína). La proteína precursora de la transtirretina humana resultante codificada por el locus *TTR* humanizado puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

50 Como otro ejemplo específico, el locus *TTR* humanizado puede ser aquel en el que la región del locus *Ttr* endógeno que se elimina y reemplaza con la correspondiente secuencia de *TTR* humano ortólogo o la región del locus *TTR*

humano que se inserta comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, la región desde el inicio del segundo exón al codón de terminación de *Ttr*. La secuencia de *TTR* humano que se inserta comprende además una 3' UTR de *TTR* humano. Por ejemplo, la secuencia de *TTR* humano en el locus *TTR* humanizado puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, la región desde el inicio del segundo exón hasta el extremo de la 3' UTR de *TTR*. La secuencia codificante de *Ttr* en el locus *Ttr* endógeno modificado está unida operativamente al promotor de *Ttr* endógeno. La secuencia de *TTR* humano en el locus *TTR* humanizado puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 19. El locus *TTR* humanizado puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 16 o 17. La secuencia codificante (CDS) en el locus *TTR* humanizado puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO: 91 (o secuencias degeneradas de la misma que codifican la misma proteína). La proteína precursora de transtirretina químérica resultante codificada por el locus *TTR* humanizado puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una secuencia que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

La proteína TTR expresada a partir de un locus *TTR* humanizado puede ser una proteína TTR completamente humana o una proteína TTR químérica endógena/humana (por ejemplo, si el animal no humano es un ratón, una proteína TTR químérica de ratón/humana). Por ejemplo, el péptido señal de la proteína precursora de transtirretina puede ser endógeno y el resto de la proteína puede ser humano. De manera alternativa, el extremo N de la proteína precursora de transtirretina puede ser endógeno y el resto de la proteína puede ser humano. Por ejemplo, los 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos N-terminales pueden ser endógenos y el resto puede ser humano. En un ejemplo específico, los 23 aminoácidos en el extremo N son endógenos y el resto de la proteína es humana.

Opcionalmente, un locus *TTR* humanizado puede comprender otros elementos. Los ejemplos de tales elementos pueden incluir cassetes de selección, genes indicadores, sitios de reconocimiento de recombinasa u otros elementos. Como ejemplo, un locus *TTR* humanizado puede comprender un casete de selección eliminable (por ejemplo, un casete de selección de autoeliminación) flanqueado por secuencias de reconocimiento de recombinasa (por ejemplo, sitios loxP). De manera alternativa, el locus *TTR* humanizado puede carecer de otros elementos (por ejemplo, puede carecer de un casete de selección y/o puede carecer de un gen indicador). En otros lugares del presente documento se divultan ejemplos de genes indicadores y proteínas indicadoras adecuados. Los ejemplos de marcadores de selección adecuados incluyen neomicina fosfotransferasa (neo_r), higromicina B fosfotransferasa (hyg_r), puromicina-N-acetiltransferasa (puro_r), blasticidina S desaminasa (bsr_r), xantina/guanina fosforribosil transferasa (gpt) y timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-k). Los ejemplos de recombinasas incluyen recombinasas Cre, Flp y Dre. Un ejemplo de un gen de recombinasa Cre es CreI, en la que dos exones que codifican la recombinasa Cre están separados por un intrón para impedir su expresión en una célula procariota. Dichas recombinasas pueden comprender además una señal de localización nuclear para facilitar la localización en el núcleo (por ejemplo, NLS-CreI). Los sitios de reconocimiento de recombinasa incluyen secuencias de nucleótidos que se reconocen por una recombinasa específica de sitio y pueden servir como sustrato para un suceso de recombinación. Los ejemplos de sitios de reconocimiento de recombinasa incluyen FRT, FRT11, FRT71, attP, att, sitios rox y lox tales como loxP, lox511, lox2272, lox66, lox71, loxM2 y lox5171.

Otros elementos tales como genes indicadores o cassetes de selección pueden ser cassetes de autoeliminación flanqueados por sitios de reconocimiento de recombinasa. Véase, p. ej., los documentos US 8.697.851 y WO 2013/0312129. A modo de ejemplo, el casete de autoeliminación puede comprender un gen CreI (comprende dos exones que codifican una recombinasa Cre, que están separados por un intrón) unido operativamente a un promotor de *Prm1* de ratón y un gen de resistencia a neomicina unido operativamente a un promotor de ubiquitina humana. Mediante el empleo del promotor de *Prm1*, el casete de autoeliminación se puede eliminar específicamente en células germinales masculinas de animales F0. El polinucleótido que codifica el marcador de selección puede unirse operativamente a un promotor activo en la célula que se está estableciendo como diana. En otra parte del presente documento se describen ejemplos de promotores. Como otro ejemplo específico, un casete de selección de autoeliminación puede comprender una secuencia codificante del gen de resistencia a higromicina unida operativamente a uno o más promotores (por ejemplo, tanto promotores de ubiquitina humana como de EM7) seguida de una señal de poliadenilación, seguida de una secuencia codificante de CreI unida operativamente a uno o más promotores (por ejemplo, un promotor de mPrm1), seguida de otra señal de poliadenilación, en donde todo el casete está flanqueado por sitios loxP.

El locus *TTR* humanizado también puede ser un alelo condicional. Por ejemplo, el alelo condicional puede ser un alelo multifuncional, tal como se describe en el documento US 2011/0104799. Por ejemplo, el alelo condicional puede comprender: (a) una secuencia de actuación en orientación sentido con respecto a la transcripción de un gen diana; (b) un casete de selección de fármacos (DSC) en orientación sentido o antisentido; (c) una secuencia de nucleótidos de interés (NSI) en orientación antisentido; y (d) un módulo condicional por inversión (COIN, que utiliza un intrón que divide el exón y un módulo invertible similar a una trampa génica) en orientación inversa. Véase, p. ej., el documento US 2011/0104799. El alelo condicional puede comprender además unidades recombinables que se recombinan tras la exposición a una primera recombinasa para formar un alelo condicional que (i) carece de la secuencia de actuación

y del DSC; y (ii) contiene el NSI en la orientación sentido y el COIN en orientación antisentido. Véase, p. ej., el documento US 2011/0104799.

5 C. Genomas de roedor, células de roedor y roedores que comprenden un locus *TTR* humanizado

Los roedores y las células de roedor de la invención son los establecidos en las reivindicaciones.

Se divultan genomas de animales no humanos y células de animales no humanos que comprenden un locus *TTR* humanizado como se describe en otra parte del presente documento, pero no forman parte de la invención. Los

10 genomas, las células o los animales no humanos pueden ser heterocigotos u homocigotos para el locus *TTR* humanizado. Un organismo diploide tiene dos alelos en cada locus genético. Cada par de alelos representa el genotipo de un locus genético específico. Los genotipos se describen como homocigotos si hay dos alelos idénticos en un locus particular y como heterocigotos si los dos alelos difieren.

15 Los genomas o células de animales no humanos pueden ser, por ejemplo, cualquier célula no humana que comprende un locus *Ttr* o un locus genómico homólogo u ortólogo al locus *TTR* humano. Los genomas pueden proceder de o las células pueden ser células eucariotas, que incluyen, por ejemplo, células animales, células de mamífero, células de mamífero no humano y células humanas. El término "animal" incluye mamíferos, peces, y pájaros. Una célula de mamífero puede ser, por ejemplo, una célula de mamífero no humano, una célula de roedor, una célula de rata, una

20 célula de ratón o una célula de hámster. Otros mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, primates no humanos, monos, simios, orangutanes, gatos, perros, conejos, caballos, ganado (por ejemplo, especies bovinas tales como vacas, bueyes, etc.; especies ovinas tales como ovejas, cabras y similares; y especies porcinas tales como cerdos y jabalíes). También se incluyen animales domesticados y animales agrícolas. La expresión "no humano" excluye a los

25 humanos.

25 Los roedores y las células de roedor de la invención son los establecidos en las reivindicaciones. Las células divulgadas en el presente documento, aunque no formen parte de la invención, también pueden estar en cualquier tipo de estado indiferenciado o diferenciado. Por ejemplo, una célula puede ser una célula totipotente, una célula pluripotente (por ejemplo, una célula pluripotente humana o una célula pluripotente no humana tal como una célula

30 madre embrionaria (ES) de ratón o una célula ES de rata), o una célula no pluripotente. Las células totipotentes incluyen células indiferenciadas que pueden dar lugar a cualquier tipo de célula, y las células pluripotentes incluyen células indiferenciadas que poseen la capacidad de desarrollarse en más de un tipo de célula diferenciada. Tales células pluripotentes y/o totipotentes pueden ser, por ejemplo, células ES o células similares a ES, tales como células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células ES incluyen células totipotentes o pluripotentes derivadas de

35 embriones que son capaces de contribuir a cualquier tejido del embrión en desarrollo tras su introducción en un embrión. Las células ES pueden proceder de la masa celular interna de un blastocisto y son capaces de diferenciarse en células de cualquiera de las tres capas germinales de los vertebrados (endodermo, ectodermo y mesodermo).

40 Las células divulgadas en el presente documento también pueden ser células germinales (por ejemplo, espermatozoides u ovocitos). Las células pueden ser células mitóticamente competentes o células mitóticamente inactivas, células meióticamente competentes o células meióticamente inactivas. De forma similar, las células también pueden ser células somáticas primarias o células que no son una célula somática primaria. Las células somáticas incluyen cualquier célula que no sea un gameto, célula germinal, gametocito o célula madre indiferenciada. Por ejemplo, las células pueden ser células hepáticas, tales como hepatoblastos o hepatocitos.

45 Las células adecuadas divulgadas en el presente documento también incluyen células primarias. Las células primarias incluyen células o cultivos de células que se han aislado directamente de un organismo, órgano o tejido. Las células primarias incluyen células que no están transformadas ni son inmortales. Incluyen cualquier célula obtenida de un organismo, órgano o tejido que no se ha sometido a pasos previos en cultivo tisular o que se ha sometido a pasos previos en cultivo tisular pero no puede someterse a pasos previos de manera indefinida en cultivo tisular. Dichas células pueden aislarse mediante técnicas convencionales e incluyen, por ejemplo, hepatocitos.

55 Otras células adecuadas divulgadas en el presente documento incluyen células inmortalizadas. Las células inmortalizadas incluyen células de un organismo multicelular que normalmente no proliferarían indefinidamente pero que, debido a una mutación o alteración, han evadido la senescencia celular normal y pueden seguir experimentando división. Estas mutaciones o alteraciones pueden producirse de forma natural o ser inducidas de manera intencionada. Un ejemplo específico de una línea celular inmortalizada es la línea celular de cáncer de hígado humano HepG2. Son bien conocidos numerosos tipos de células inmortalizadas. Las células inmortalizadas o primarias incluyen células que normalmente se usan para cultivar o para expresar genes o proteínas recombinantes.

60 Las células divulgadas en el presente documento también incluyen embriones en etapa unicelular (es decir, ovocitos fertilizados o cigotos). Estos embriones en etapa unicelular pueden tener cualquier origen genético (p. ej., BALB/c, C57BL/6, 129 o una combinación de los mismos para ratones), pueden ser frescos o congelados y pueden obtenerse por reproducción natural o fertilización *in vitro*.

65 Las células divulgadas en el presente documento pueden ser células sanas normales o pueden ser células enfermas

o portadoras de mutaciones.

En un ejemplo específico, las células animales no humanas son células madre embrionarias (ES) o células hepáticas, tales como células ES de ratón o rata o células hepáticas.

- 5 Los roedores de la invención, definidos en la reivindicación 1, pueden obtenerse por el método de la invención definido en la reivindicación 21. Los animales no humanos que comprenden un locus *TTR* humanizado como se describe en el presente documento pueden obtenerse por los métodos descritos en otros lugares del presente documento. El término "animal" incluye mamíferos, peces, y pájaros. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, primates no humanos, monos, simios, orangutanes, gatos, perros, caballos, conejos, roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres y cobayas) y ganado (por ejemplo, especies bovinas tales como vacas y bueyes; especies ovinas tales como ovejas y cabras; y especies porcinas tales como cerdos y jabalíes). También se incluyen animales domesticados y animales agrícolas. La expresión "animal no humano" excluye a los humanos. Los animales no humanos de la invención son roedores, tales como ratones y ratas. Otros animales no humanos no forman parte de la invención.
- 10 15 Los animales no humanos pueden tener cualquier origen genético. Por ejemplo, los ratones adecuados pueden ser de una cepa 129, una cepa C57BL/6, una mezcla de 129 y C57BL/6, una cepa BALB/c o una cepa Swiss Webster. Los ejemplos de cepas 129 incluyen 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (p. ej., 129S1/SV, 129S1/Svlm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1 y 129T2. Véase, p. ej., Festing *et al.* (1999) *Mammalian Genome* 10:836. Los ejemplos de cepas C57BL incluyen C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/Kal_wN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. Los ratones adecuados también pueden proceder de una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente (por ejemplo, 50 % 129 y 50 % C57BL/6). Del mismo modo, los ratones adecuados pueden proceder de una mezcla de cepas 129 mencionadas anteriormente o de una mezcla de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente (por ejemplo, la cepa 129S6 (129/SvEvTac)).

- 20 25 De forma similar, las ratas pueden ser de cualquier cepa de rata, que incluye, por ejemplo, una cepa de rata ACI, una cepa de rata Agutí Negro (DA), una cepa de rata Wistar, una cepa de rata LEA, una cepa de rata Sprague Dawley (SD), o una cepa de rata Fischer tal como Fisher F344 o Fisher F6. Las ratas también pueden obtenerse de una cepa derivada de una mezcla de dos o más cepas indicadas anteriormente. Por ejemplo, una rata adecuada puede ser de una cepa DA o una cepa ACI. La cepa de rata ACI se caracteriza por tener agutí negro, con vientre y patas blancas y un haplotipo *RT1^{a1}*. Dichas cepas están disponibles en una diversidad de fuentes incluidos los Harlan Laboratories. La cepa de rata Agutí negro (DA) se caracteriza por tener un pelaje agutí y un haplotipo *RT1^{a1}*. Dichas ratas están disponibles en una diversidad de fuentes incluidos los Charles River y Harlan Laboratories. Algunas ratas adecuadas pueden proceder de una cepa de ratas endogámicas. Véase, p. ej., el documento US 2014/0235933.

III. Métodos de utilización de roedores que comprenden un locus *TTR* humanizado para evaluar la eficacia de los reactivos dirigidos a *TTR* humana *in vivo* o *ex-vivo*

- 40 45 Los métodos para evaluar u optimizar la actividad de un reactivo dirigido a *TTR* humana utilizando los roedores de la invención se definen en las reivindicaciones 10 y 18.
- En el presente documento se divultan, pero no se reivindican, diversos métodos de utilización de animales no humanos que comprenden un locus *TTR* humanizado como se describe en otra parte del presente documento para evaluar u optimizar el suministro o eficacia de reactivos dirigidos a *TTR* humana (por ejemplo, moléculas o complejos terapéuticos) *in vivo* o *ex-vivo*. Debido a que los animales no humanos comprenden un locus *TTR* humanizado, los animales no humanos reflejarán con mayor precisión la eficacia de un reactivo dirigido a *TTR* humana. Estos animales no humanos son particularmente útiles para ensayar reactivos de edición del genoma diseñados para dirigirse al gen *TTR* humano porque los animales no humanos divulgados en el presente documento comprenden loci *Ttr* endógenos humanizados en lugar de inserciones transgénicas de secuencias de *TTR* humano en loci genómicos aleatorios, y los loci *Ttr* endógenos humanizados comprenden una secuencia de *TTR* genómico humano ortólogo de regiones tanto codificantes como no codificantes en lugar de una secuencia de ADNc artificial.

A. Métodos para ensayar la eficacia de los reactivos dirigidos a *TTR* humana *in vivo* o *ex-vivo*

- 55 La invención proporciona métodos para evaluar la actividad de un reactivo dirigido a *TTR* humana *in vivo* como se define en la reivindicación 10.
- 60 Se divultan diversos métodos, pero no se reivindican, para evaluar el suministro o la eficacia de reactivos dirigidos a *TTR* humana *in vivo* utilizando animales no humanos que comprenden un locus *TTR* humanizado como se describe en otra parte del presente documento. Dichos métodos pueden comprender: (a) introducir en el animal no humano un reactivo dirigido a *TTR* humana (es decir, administrar el reactivo dirigido a *TTR* humana en el animal no humano); y (b) evaluar la actividad del reactivo dirigido a *TTR* humana.
- 65 El reactivo dirigido a *TTR* humana puede ser cualquier agente biológico o químico que se dirija al locus *TTR* humano (el gen *TTR* humano), al ARNm de *TTR* humano o a la proteína transtirretina humana. Los ejemplos de reactivos

dirigidos a TTR humana se divultan en otra parte del presente documento e incluyen, por ejemplo, agentes de edición del genoma. Por ejemplo, el reactivo dirigido a TTR humana puede ser un ácido nucleico dirigido a TTR (por ejemplo, ARN guía CRISPR/Cas, ARN de horquilla corta (ARNhc) o ARN de interferencia pequeño (ARNip)) o un ácido nucleico que codifica una proteína dirigida a TTR (p. ej., proteínas Cas tales como Cas9, una ZFN o una TALEN). De manera alternativa, el reactivo dirigido a TTR humana puede ser un anticuerpo dirigido a TTR o una proteína de unión a antígeno, o cualquier otra molécula grande o pequeña que se dirija a TTR humana.

Dichos reactivos dirigidos a TTR humana se pueden administrar mediante cualquier método de suministro (p. ej., VAA, LNP o HDD) como se divulga con más detalle en otra parte del presente documento y por cualquier vía de administración. Los medios para suministrar complejos y moléculas terapéuticas y las vías de administración se divultan con más detalle en otra parte del presente documento. En métodos particulares, los reactivos se suministran mediante suministro mediado por AAV. Por ejemplo, AAV8 se puede utilizar para dirigirse al hígado. En otros métodos particulares, los reactivos se suministran mediante suministro mediado por LNP. En otros métodos particulares, los reactivos se suministran mediante suministro hidrodinámico (HDD). La dosis puede ser cualquier dosis adecuada. Por ejemplo, en algunos métodos en los que los reactivos (por ejemplo, ARNm y ARNg de Cas9) se suministran mediante suministro mediado por LNP, la dosis puede estar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,01 y aproximadamente 5 mg/kg, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 4 mg/kg, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 3 mg/kg, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 2 mg/kg, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1 mg/kg, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 6 mg/kg; entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 4 mg/kg, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3 mg/kg, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 2 mg/kg, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1 mg/kg, entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 6 mg/kg; entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 5 mg/kg, entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 4 mg/kg, entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 3 mg/kg, entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 2 mg/kg, entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg. En un ejemplo específico, la dosis está entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 6 mg/kg; entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3 mg/kg o entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 2 mg/kg. En un ejemplo específico, el reactivo dirigido a TTR humana es un reactivo de edición del genoma, la dosis de LNP es de aproximadamente 1 mg/kg y el porcentaje de edición del genoma en locus *TTR* humanizado está entre aproximadamente el 70% y aproximadamente el 80%. En otro ejemplo específico, el reactivo dirigido a TTR humana es un reactivo de edición del genoma, la dosis de LNP es de aproximadamente 0,3 mg/kg y el porcentaje de edición está entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 80 %. En otro ejemplo específico, el reactivo dirigido a TTR humana es un reactivo de edición del genoma, la dosis de LNP es de aproximadamente 0,1 mg/kg y el porcentaje de edición está entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 80 %. En otro ejemplo específico, la dosis de LNP es de aproximadamente 1 mg/kg y los niveles de TTR en suero se reducen a entre aproximadamente el 0 % y aproximadamente el 10 % o entre aproximadamente el 0 % y aproximadamente el 35 % de los niveles de control. En otro ejemplo específico, la dosis de LNP es de aproximadamente 0,3 mg/kg y los niveles de TTR en suero se reducen a entre aproximadamente el 0 % y aproximadamente el 95 % de los niveles de control. En otro ejemplo específico, la dosis de LNP es de aproximadamente 0,1 mg/kg y los niveles de TTR en suero se reducen a entre aproximadamente el 0 % y aproximadamente el 60 % o aproximadamente el 0 % y aproximadamente el 99 % de los niveles de control.

Los métodos para evaluar la actividad del reactivo dirigido a TTR humana son bien conocidos y se describen en otra parte del presente documento. La evaluación de la actividad puede realizarse en cualquier tipo de célula, cualquier tipo de tejido o cualquier tipo de órgano divulgado en otra parte del presente documento. En algunos métodos, la evaluación de la actividad se realiza en células hepáticas. Si el reactivo dirigido a TTR es un reactivo de edición del genoma (por ejemplo, un agente nucleasa), dichos métodos pueden comprender evaluar la modificación del locus *TTR* humanizado. Como ejemplo, la evaluación puede comprender medir la actividad de unión de extremos no homólogos (NHEJ) en el locus *TTR* humanizado. Esto puede comprender, por ejemplo, medir la frecuencia de inserciones o eliminaciones dentro del locus *TTR* humanizado. Por ejemplo, la evaluación puede comprender secuenciar el locus *TTR* humanizado en una o más células aisladas del animal no humano (por ejemplo, secuenciación de última generación). La evaluación puede comprender aislar un órgano diana (p. ej., hígado) o tejido del animal no humano y evaluar la modificación del locus *TTR* humanizado en el órgano o tejido diana. La evaluación también puede comprender la evaluación de la modificación del locus *TTR* humanizado en dos o más tipos de células diferentes dentro del órgano o tejido diana. De forma similar, la evaluación puede comprender aislar un órgano o tejido no diana (por ejemplo, dos o más órganos o tejidos no diana) del animal no humano y evaluar la modificación del locus *TTR* humanizado locus en el órgano o tejido no diana.

Dichos métodos también pueden comprender medir los niveles de expresión del ARNm producido por el locus *TTR* humanizado o medir los niveles de expresión de la proteína codificada por el locus *TTR* humanizado. Por ejemplo, los niveles de proteína se pueden medir en una célula, tejido o tipo de órgano en particular (p. ej., el hígado) o los niveles secretados se pueden medir en el suero. En otra parte del presente documento se divultan, pero no se reivindican, métodos para evaluar la expresión de ARNm de *Ttr* o proteína expresada a partir del locus *TTR* humanizado, y son bien conocidos.

Los diversos métodos divulgados, pero no reivindicados, anteriormente para evaluar la actividad *in vivo* también se pueden utilizar para evaluar la actividad de reactivos dirigidos a TTR humana *ex-vivo* como se describe en otra parte del presente documento.

5 Como ejemplo, si el reactivo dirigido a TTR humana es un reactivo de edición del genoma (por ejemplo, un agente nucleasa), puede evaluarse el porcentaje de edición en el locus *TTR* humanizado (p. ej., en células hepáticas). Por ejemplo, el porcentaje de edición (por ejemplo, el número total de inserciones o eliminaciones observadas con respecto al número total de secuencias leídas en la reacción PCR de un conjunto de células lisadas) puede ser al menos 10 aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 99 % o, por ejemplo, entre aproximadamente el 1 % y 15 aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 20 % y 20 aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 80 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 80 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 80 %, entre aproximadamente el 80 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 80 %, entre aproximadamente el 40 % y 25 aproximadamente el 80 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 80 % o entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 80 %.

Como otro ejemplo, se pueden evaluar los niveles séricos de TTR. Por ejemplo, los niveles séricos de TTR se pueden reducir en al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 99 % o, por ejemplo, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 90 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 90 % o entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 90 %.

45 En algunos métodos, el reactivo dirigido a TTR humana es un agente nucleasa, tal como un agente nucleasa CRISPR/Cas, que se dirige al gen *TTR* humano. Dichos métodos pueden comprender, por ejemplo: (a) introducir en el animal no humano un agente nucleasa diseñado para escindir el gen *TTR* humano (p. ej., proteína Cas tal como Cas9 y un ARN guía diseñado para dirigirse a una secuencia diana de ARN guía en el gen *TTR* humano); y (b) evaluar la modificación del locus *TTR* humanizado.

50 En el caso de una nucleasa CRISPR/Cas, por ejemplo, la modificación del locus *TTR* humanizado se inducirá cuando el ARN guía forme un complejo con la proteína Cas y dirija la proteína Cas al locus *TTR* humanizado, y el complejo Cas/ARN guía escinda la secuencia diana del ARN guía, desencadenando la reparación por parte de la célula (por ejemplo, mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) si no está presente una secuencia donante).

55 Opcionalmente, se pueden introducir dos o más ARN guía, cada uno diseñado para dirigirse a una secuencia diana de ARN guía diferente dentro del gen *TTR* humano. Por ejemplo, se pueden diseñar dos ARN guía para escindir una secuencia genómica entre las dos secuencias diana de ARN guía. La modificación del locus *TTR* humanizado se inducirá cuando el primer ARN guía forme un complejo con la proteína Cas y dirija la proteína Cas al locus *TTR* humanizado, el segundo ARN guía forme un complejo con la proteína Cas y dirija la proteína Cas al locus *TTR* humanizado, el primer complejo Cas/ARN guía escinda la primera secuencia diana de ARN guía, y el segundo complejo Cas/ARN guía escinda la segunda secuencia diana de ARN guía, dando como resultado la escisión de la secuencia intermedia.

60

65 Opcionalmente, también se introduce en el animal no humano un ácido nucleico donante exógeno capaz de recombinarse con y modificar un gen *TTR* humano. Opcionalmente, el agente nucleasa o la proteína Cas se pueden unir al ácido nucleico donante exógeno como se describe en otra parte del presente documento. Se inducirá la modificación del locus *TTR* humanizado, por ejemplo, cuando el ARN quíá forme un complejo con la proteína Cas y

dirija la proteína Cas al locus *TTR* humanizado, el complejo Cas/ARN guía escinda la secuencia diana del ARN guía, y el locus *TTR* humanizado se recombiné con el ácido nucleico donante exógeno para modificar el locus *TTR* humanizado. El ácido nucleico donante exógeno puede recombinarse con el locus *TTR* humanizado, por ejemplo, mediante reparación dirigida por homología (HDR) o mediante inserción mediada por NHEJ. Puede usarse cualquier tipo de ácido nucleico donante exógeno, del que se describen ejemplos en otra parte del presente documento.

B. Métodos para optimizar el suministro o eficacia del reactivo dirigido a TTR humana *in vivo* o *ex-vivo*

La invención proporciona métodos para optimizar la actividad de un reactivo dirigido a TTR humana *in vivo* como se define en la reivindicación 18.

En el presente documento se describen, pero no se reivindican, diversos métodos para optimizar el suministro de reactivos dirigidos a TTR humana en una célula o animal no humano u optimizar la actividad o eficacia de reactivos dirigidos a TTR humana *in vivo*. Dichos métodos pueden comprender, por ejemplo: (a) realizar el método para ensayar la eficacia de un reactivo dirigido a TTR humana como se ha descrito anteriormente por primera vez en un primer animal no humano o una primera célula que comprende un locus *TTR* humanizado; (b) cambiar una variable y realizar el método una segunda vez en un segundo animal no humano (es decir, de la misma especie) o una segunda célula que comprende un locus *TTR* humanizado con la variable cambiada; y (c) comparar la actividad del reactivo dirigido a TTR humana en la etapa (a) con la actividad del reactivo dirigido a TTR humana en la etapa (b) y seleccionar el método que dé como resultado la mayor actividad.

En otra parte del presente documento se divultan métodos para medir el suministro, eficacia o actividad de reactivos dirigidos a TTR humana. Por ejemplo, dichos métodos pueden comprender medir la modificación del locus *TTR* humanizado. Una modificación más eficaz del locus *TTR* humanizado puede significar diferentes cosas dependiendo del efecto deseado dentro de la célula o animal no humano. Por ejemplo, una modificación más eficaz del locus *TTR* humanizado puede significar uno o más o todos los niveles superiores de modificación, mayor precisión, mayor consistencia o mayor especificidad. Mayores niveles de modificación (es decir, mayor eficacia) del locus *TTR* humanizado se refiere a un mayor porcentaje de células establecidas como diana dentro de un tipo de célula diana particular, dentro de un tejido diana particular o dentro de un órgano diana particular (por ejemplo, hígado). Una mayor precisión se refiere a una modificación más precisa del locus *TTR* humanizado (por ejemplo, un mayor porcentaje de células diana que tienen la misma modificación o que tienen la modificación deseada sin inserciones y eliminaciones no deseadas adicionales (por ejemplo, indeles NHEJ)). Una mayor consistencia se refiere a una modificación más consistente del locus *TTR* humanizado entre diferentes tipos de células, tejidos u órganos diana si hay más de un tipo de célula, tejido u órgano que se desea establecer como diana (por ejemplo, modificación de un mayor número de tipos de células dentro del hígado). Si se desea establecer como objetivo un órgano en particular, una mayor consistencia también puede referirse a una modificación más consistente en todas las ubicaciones dentro del órgano (p. ej., el hígado). Una mayor especificidad puede referirse a una mayor especificidad con respecto al locus genómico o loci diana, mayor especificidad con respecto al tipo de célula diana, mayor especificidad con respecto al tipo de tejido diana o mayor especificidad con respecto al órgano diana. Por ejemplo, una mayor especificidad del locus genómico se refiere a una menor modificación de los loci genómicos fuera de la diana (por ejemplo, un porcentaje más bajo de células diana que tienen modificaciones no deseadas en loci genómicos fuera de la diana en lugar de o además de la modificación del locus genómico diana). Del mismo modo, una mayor especificidad del tipo de célula, tejido u órgano se refiere a una menor modificación de los tipos celulares, tipos de tejido o tipos de órganos fuera de la diana si se establece como diana un tipo de célula, tipo de tejido o tipo de órgano (p. ej., cuando se establece como diana un órgano en particular (p. ej., el hígado), hay menos modificación de células en órganos o tejidos que no son dianas previstas).

La variable que se cambia puede ser cualquier parámetro. Como ejemplo, la variable cambiada puede ser el material de acondicionamiento o el método de suministro mediante el cual el reactivo o reactivos dirigidos a TTR humana se introduce en la célula o en el animal no humano. En otra parte del presente documento se divultan ejemplos de métodos de suministro tales como LNP, HDD y AAV. Por ejemplo, la variable cambiada puede ser el serotipo de AAV. De forma similar, la administración puede comprender suministro mediado por LNP y la variable cambiada puede ser la formulación de LNP. Como otro ejemplo, la variable cambiada puede ser la vía de administración para la introducción del reactivo o reactivos dirigidos a TTR humana en la célula o animal no humano. En otra parte del presente documento se divultan ejemplos de vías de administración, tales como intravenosa, intravítreas, intraparenquimatosa e instilación nasal.

Como otro ejemplo, la variable cambiada puede ser la concentración o cantidad del reactivo o reactivos dirigidos a TTR humana introducidos. Como otro ejemplo, la variable cambiada puede ser la concentración o la cantidad de un reactivo dirigido a TTR humana introducido (p. ej., ARN guía, proteína Cas o ácido nucleico donante exógeno) en relación con la concentración o la cantidad de otro reactivo dirigido a TTR humana introducido (p. ej., ARN guía, Proteína Cas o ácido nucleico donante exógeno).

Como otro ejemplo, la variable cambiada puede ser el momento de introducir el reactivo o reactivos dirigidos a TTR humana en relación con el momento de evaluar la actividad o eficacia de los reactivos. Como otro ejemplo, la variable cambiada puede ser el número de veces o la frecuencia con la que se introducen el reactivo o reactivos dirigidos a

TTR humana. Como otro ejemplo, la variable cambiada puede ser el momento de introducción de un reactivo dirigido a TTR humana introducido (p. ej., ARN guía, proteína Cas o ácido nucleico donante exógeno) en relación con el momento de introducción de otro reactivo dirigido a TTR humana introducido (p. ej., ARN guía, Proteína Cas o ácido nucleico donante exógeno).

- 5 Como otro ejemplo, la variable cambiada puede ser la forma en la que se introducen el reactivo o reactivos dirigidos a TTR humana. Por ejemplo, se puede introducir un ARN guía en forma de ADN o en forma de ARN. Se puede introducir una proteína Cas (por ejemplo, Cas9) en forma de ADN, en forma de ARN o en forma de proteína (p. ej., formando complejos con un ARN guía). Un ácido nucleico donante exógeno puede ser ADN, ARN, monocatenario, bicatenario, 10 lineal, circular, etcétera. De forma similar, cada uno de los componentes puede comprender diversas combinaciones de modificaciones para la estabilidad, para reducir los efectos fuera de la diana, para facilitar el suministro, etc. Como otro ejemplo, la variable cambiada puede ser el reactivo o reactivos dirigidos a TTR humana que se introducen (por ejemplo, al introducir un ARN guía diferente con una secuencia diferente, introducir una proteína Cas diferente (por ejemplo, introducir una proteína Cas diferente con una secuencia diferente, o un ácido nucleico con una secuencia 15 diferente pero que codifica la misma secuencia de aminoácidos de la proteína Cas) o introducir un ácido nucleico donante exógeno diferente con una secuencia diferente).

En un ejemplo específico, el reactivo dirigido a TTR humana comprende una proteína Cas y un ARN guía diseñado para dirigir una secuencia diana de ARN guía en un gen *TTR* humano. En dichos métodos, la variable cambiada puede 20 ser la secuencia de ARN guía y/o la secuencia diana de ARN guía. En algunos de estos métodos, la proteína Cas y el ARN guía se pueden administrar cada uno en forma de ARN y la variable cambiada puede ser la relación entre ARNm de Cas y ARN guía (por ejemplo, en una formulación de LNP). En algunos de estos métodos, la variable cambiada puede ser modificaciones del ARN guía (por ejemplo, un ARN guía con una modificación se compara con un ARN guía sin la modificación).

25 **C. Reactivos dirigidos a TTR humana**

Un reactivo dirigido a TTR humana puede ser cualquier reactivo dirigido a un gen *TTR* humano, un ARNm de *TTR* humano o una proteína TTR humana. Por ejemplo, puede ser un reactivo de edición del genoma, tal como un agente 30 nucleasa que escinde una secuencia diana dentro del gen *TTR* humano, puede ser un oligonucleótido antisentido dirigido a un ARNm de *TTR* humano, puede ser una proteína de unión a antígeno dirigida a un epítopo de una proteína TTR humana, o puede ser una molécula pequeña dirigida a TTR humana. Los reactivos dirigidos a TTR humana en los métodos divulgados en el presente documento pueden ser reactivos dirigidos a TTR humana conocidos, pueden 35 ser supuestos reactivos dirigidos a TTR (p. ej., reactivos candidatos diseñados para dirigirse a TTR humana) o pueden ser reactivos en los que se está analizando la actividad dirigida a TTR humana.

(1) Agentes nucleasa dirigidos al gen TTR humano

Un reactivo dirigido a TTR humana puede ser un reactivo de edición del genoma tal como un agente nucleasa que 40 escinde una secuencia diana dentro del gen *TTR* humano. Una secuencia diana de nucleasa incluye una secuencia de ADN en la que un agente nucleasa induce una mella o rotura bicatenaria. La secuencia diana de un agente nucleasa puede ser endógena (o nativa) de la célula o la secuencia diana puede ser exógena a la célula. Una secuencia diana que es exógena a la célula no se encuentra de forma natural en el genoma de la célula. La secuencia diana también 45 puede ser exógena a los polinucleótidos de interés que se desea posicionar en el locus diana. En algunos casos, la secuencia diana está presente solo una vez en el genoma de la célula hospedadora.

La longitud de la secuencia diana puede variar e incluye, por ejemplo, secuencias diana que tienen aproximadamente 30-36 pb para un par de nucleasas con dedos de zinc (ZFN) (es decir, aproximadamente 15-18 pb para cada ZFN), aproximadamente 36 pb para una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN), o 50 aproximadamente 20 pb para un ARN guía CRISPR/Cas9.

Cualquier agente nucleasa que induzca una mella o rotura bicatenaria en una secuencia diana deseada se puede utilizar en los métodos y composiciones divulgados en el presente documento. Se puede emplear un agente nucleasa natural o nativo siempre que el agente nucleasa induzca una mella o rotura bicatenaria en una secuencia diana deseada. De manera alternativa, se puede emplear un agente nucleasa modificado o diseñado por ingeniería genética. Un "agente nucleasa diseñado por ingeniería genética" incluye una nucleasa que se ha diseñado (modificado o alterado) por ingeniería genética con respecto a su forma nativa para reconocer e inducir específicamente una mella o rotura bicatenaria en la secuencia diana deseada. Así pues, un agente nucleasa diseñado por ingeniería genética puede derivar de un agente nucleasa nativo de origen natural o puede crearse o sintetizarse artificialmente. La 55 nucleasa modificada por ingeniería genética puede inducir una mella o rotura bicatenaria en una secuencia diana, por ejemplo, en donde la secuencia diana no es una secuencia que habría sido reconocida por un agente nucleasa nativo (no diseñado por ingeniería genética o no modificado). La modificación del agente nucleasa puede ser tan pequeña como un aminoácido en un agente de escisión de proteínas o un nucleótido en un agente de escisión de ácidos nucleicos. A la producción de una mella o rotura bicatenaria en una secuencia diana u otro ADN se le puede denominar 60 en el presente documento "corte" o "escisión" de la secuencia diana u otro ADN.

5 También se divultan variantes activas y fragmentos de las secuencias diana ilustradas. Dichas variantes activas pueden comprender al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia respecto a la secuencia diana dada, en donde las variantes activas conservan actividad biológica y, por tanto, pueden ser reconocidas y escindidas por un agente nucleasa de una manera específica de secuencia. Son bien conocidos los ensayos para medir la rotura bicanteraria de una secuencia diana mediante un agente nucleasa. Véase, p. ej., Frendewey *et al.* (2010) *Methods in Enzymology* 476:295-307.

10 La secuencia diana del agente nucleasa se puede ubicar en cualquier lugar dentro o cerca del locus *Ttr*. La secuencia diana puede ubicarse dentro de una región codificante del gen *Ttr*, o dentro de regiones reguladoras que influyen en la expresión del gen. Una secuencia diana del agente nucleasa puede ubicarse en un intrón, un exón, un promotor, un potenciador, una región reguladora o cualquier región codificante no proteica.

15 Un tipo de agente nucleasa es una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN). Las nucleasas efectoras TAL son una clase de nucleasas específicas de secuencia que pueden usarse para producir roturas de doble cadena en secuencias diana específicas en el genoma de un organismo procariota o eucariota. Las nucleasas efectoras TAL se crean fusionando un efecto similar a un activador de la transcripción (TAL) nativo o diseñado por ingeniería genética, o una parte funcional del mismo, al dominio catalítico de una endonucleasa, tal como, por ejemplo, *FokI*. El único dominio de unión al ADN del efecto TAL modular permite el diseño de proteínas con potencialmente cualquier especificidad de reconocimiento de ADN dada. Así pues, los dominios de unión al ADN de las nucleasas efectoras TAL se pueden diseñar por ingeniería genética para reconocer sitios diana de ADN específicos y, por lo tanto, se utilizan para realizar roturas de doble cadena en las secuencias diana deseadas. Véase el documento WO 2010/079430; Morbitzer *et al.* (2010) *PNAS* 10.1073/pnas.1013133107; Scholze & Boch (2010) *Virulence* 1:428-432; Christian *et al.* *Genetics* (2010) 186:757-761; Li *et al.* (2010) *Nuc. Acids Res.* (2010) doi:10.1093/nar/gkq704; y Miller *et al.* (2011) *Nature Biotechnology* 29:143-148.

25 Se divultan ejemplos de nucleasas TAL adecuadas y métodos para preparar nucleasas TAL adecuadas, p. ej., en el documento US EP 2011/0239315 A1, US 2011/0269234 A1, US 2011/0145940 A1, US 2003/0232410 A1, US 2005/0208489 A1, US 2005/0026157 A1, US 2005/0064474 A1, US 2006/0188987 A1 y US 2006/0063231 A1. En diversas realizaciones, las nucleasas efectoras TAL están diseñadas por ingeniería genética para cortar en o cerca de una secuencia de ácido nucleico objetivo en, p. ej., un locus de interés o un locus genómico de interés, en donde la secuencia de ácido nucleico diana está en o cerca de una secuencia que va a ser modificada por un vector de direccionamiento. Las nucleasas TAL adecuadas para su uso con los diversos métodos y composiciones divulgadas en el presente documento incluyen aquellas que están diseñadas específicamente para unirse en o cerca de secuencias de ácido nucleico diana que se modificarán mediante vectores de direccionamiento como se describe en el presente documento.

30 En algunas TALEN, cada monómero de la TALEN comprende 33-35 repeticiones de TAL que reconocen un único par de bases a través de dos restos hipervariables. En algunas TALEN, el agente nucleasa es una proteína químérica que comprende un dominio de unión al ADN basado en repeticiones TAL unido operativamente a una nucleasa independiente tal como una endonucleasa *FokI*. Por ejemplo, el agente nucleasa puede comprender un primer dominio de unión a ADN basado en repeticiones TAL y un segundo dominio de unión a ADN basado en repeticiones TAL, en donde cada uno de los dominios de unión a ADN basados en repeticiones TAL primero y segundo está unido operativamente a una nucleasa *FokI*, en donde el primer y el segundo dominios de unión al ADN basados en repeticiones TAL reconocen dos secuencias de ADN diana contiguas en cada cadena de la secuencia de ADN diana separadas por una secuencia espaciadora de longitud variable (12-20 pb), y en donde las subunidades de nucleasa *FokI* se dimerizan para crear una nucleasa activa que rompe una doble cadena en una secuencia diana.

40 El agente nucleasa empleado en los diversos métodos y composiciones divulgados en el presente documento puede comprender además una nucleasa con dedos de zinc (ZFN). En algunas ZFN, cada monómero de la ZFN comprende 50 3 o más dominios de unión a ADN basados en dedos de zinc, en donde cada dominio de unión a ADN basado en dedos de zinc se une a un subsituto de 3 pb. En otras ZFN, la ZFN es una proteína químérica que comprende un dominio de unión al ADN basado en dedos de zinc unido operativamente a una nucleasa independiente tal como una endonucleasa *FokI*. Por ejemplo, el agente nucleasa puede comprender una primera ZFN y una segunda ZFN, en donde cada una de la primera ZFN y la segunda ZFN está operativamente unida a una subunidad de nucleasa *FokI*, en donde la primera y la segunda ZFN reconocen dos secuencias de ADN diana contiguas en cada cadena de la secuencia de ADN diana separadas por un espaciador de aproximadamente 5-7 pb, y en donde las subunidades de nucleasa *FokI* se dimerizan para crear una nucleasa activa que produce una rotura bicanteraria. Véanse, p. ej., los documentos US20060246567; US20080182332; US20020081614; US20030021776; WO/2002/057308A2; US20130123484; US20100291048; WO/2011/017293A2; y Gaj *et al.* (2013) *Trends in Biotechnology*, 31(7):397-405.

55 60 Otro tipo de agente nucleasa es una meganucleasa. Las meganucleasas se han clasificado en cuatro familias en función de los motivos de secuencia conservados, las familias son las familias de caja LAGLIDADG, GIY-YIG, H-N-H e His-Cys. Estos motivos participan en la coordinación de iones metálicos y la hidrólisis de enlaces fosfodiéster. Las meganucleasas son notables por sus secuencias diana largas y por tolerar algunos polimorfismos de secuencia en sus sustratos de ADN. Se conocen los dominios, la estructura y la función de la meganucleasa, véase, por ejemplo, Guhan y Muniyappa (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:199-248; Lucas *et al.*, (2001) *Nucleic Acids Res* 29:960-9;

Jurica y Stoddard, (1999) *Cell Mol Life Sci* 55:1304-26; Stoddard, (2006) *6 Rev Biophys* 38:49-95; y Mover *et al.*, (2002) *Nat Struct Biol* 9:764. En algunos ejemplos, se utiliza una variante natural y/o una meganucleasa derivada diseñada por ingeniería genética. Se conocen métodos para modificar la cinética, interacciones de cofactores, la expresión, las condiciones óptimas y/o la especificidad de la secuencia diana y la detección de actividad. Véase, p. ej., Epinat *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Res* 31:2952-62; Chevalier *et al.*, (2002) *Mol Cell* 10:895-905; Gimble *et al.*, (2003) *Mol Biol* 334:993-1008; Seligman *et al.*, (2002) *Nucleic Acids Res* 30:3870-9; Sussman *et al.*, (2004) *J Mol Biol* 342:31-41; Rosen *et al.*, (2006) *Nucleic Acids Res* 34:4791-800; Chames *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e178; Smith *et al.*, (2006) *Nucleic Acids Res* 34:e149; Gruen *et al.*, (2002) *Nucleic Acids Res* 30:e29; Chen y Zhao, (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e154; el documento WO2005105989; el documento WO2003078619; el documento WO2006097854; el documento WO2006097853; el documento WO2006097784; y el documento WO200403134.

Se puede utilizar cualquier meganucleasa, que incluye, por ejemplo, I-SceI, I-SceII, I-SceIII, I-SceIV, I-SceV, I-SceVI, I-SceVII, I-Ceul, I-CeuAIIP, I-Crel, I-CrepsbIP, I-CrepsbIIIP, I-CrepsbIIIP, I-CrepsbIVP, I-Tlil, I-Ppol, PI-Pspl, F-Scel, F-Scell, F-Svul, F-Tevl, F-Tevll, I-Amal, 1-Anil, I-Chul, I-Cmoel, I-Cpal, I-Cpall, I-Csml, I-Cvul, I-CvuAIP, I-Ddil, I-Ddill, I-Dirl, I-Dmol, I-Hmul, I-Hmull, I-HsNIP, I-Llal, I-Msol, I-Naal, I-Nanl, I-NcIIP, I-NgrlP, I-Nitl, I-Njal, I-Nsp236IP, I-Pakl, I-Pb0lP, I-PculP, I-PcuAl, I-PcuVI, I-PgrlP, I-PoblP, I-Portl, I-PorlIP, I-PbplP, I-SpBetaIP, I-Scal, I-SexIP, I-SneIP, I-SpomI, I-SpomCP, I-SpomIP, I-SpomIIP, I-SqulP, I-Ssp6803I, I-StPhiJP, I-StPhiST3P, I-StPhiSTe3bP, I-TdelP, I-Tevl, I-Tevll, I-Tevlll, I-UarAP, I-UarHGPAIP, I-UarHGPA13P, I-VinIP, I-ZbilP, PI-Mtul, PI-MtuHIP PI-MtuHIIP, PI-Pful, PI-Pfull, PI-Pkol, PI-Pkoll, PI-Rma43812IP, PI-SpBetaIP, PI-SceI, PI-Tful, PI-Tfull, PI-Thyl, PI-Tlil, o cualquier variante activa o fragmento de las mismas.

Las meganucleasas pueden reconocer, por ejemplo, secuencias de ADN bicatenario de 12 a 40 pares de bases. En algunos casos, la meganucleasa reconoce una secuencia diana perfectamente coincidente en el genoma.

Algunas meganucleasas son nucleasas autodirigidas (homing). Un tipo de nucleasa autodirigida es una familia LAGLIDADG de nucleasas autodirigidas que incluye, por ejemplo, I-SceI, I-Crel e I-Dmol.

Los agentes nucleasa pueden comprender además sistemas CRISPR/Cas como se describe con más detalle a continuación.

También se divultan variantes activas y fragmentos de agentes nucleasa (es decir, un agente nucleasa diseñado por ingeniería genética). Dichas variantes activas pueden comprender al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con el agente nucleasa nativo, en donde las variantes activas conservan la capacidad de cortar en una secuencia diana deseada y, por tanto, conservan la actividad inductora de mella o rotura bicatenaria. Por ejemplo, cualquiera de los agentes nucleasa descritos en el presente documento puede modificarse a partir de una secuencia de endonucleasa nativa y diseñarse para reconocer e inducir una mella o rotura bicatenaria en una secuencia diana que no fue reconocida por el agente nucleasa nativo. Así pues, algunas nucleasas diseñadas por ingeniería genética tienen una especificidad para inducir una mella o rotura bicatenaria en una secuencia diana que es diferente de la secuencia diana del agente nucleasa nativo correspondiente. Se conocen ensayos de actividad para inducir mellas o roturas de doble cadena y generalmente miden la actividad y especificidad general de la endonucleasa en sustratos de ADN que contienen la secuencia diana.

El agente nucleasa puede introducirse en una célula o en un animal no humano mediante cualquier medio conocido. Un polipéptido que codifica el agente nucleasa puede introducirse directamente en la célula o en un animal no humano. De manera alternativa, se puede introducir un polinucleótido que codifica el agente nucleasa en la célula o en el animal no humano. Cuando se introduce un polinucleótido que codifica el agente nucleasa, el agente nucleasa puede expresarse de forma transitoria, condicional o constitutiva dentro de la célula. El polinucleótido que codifica el agente nucleasa puede estar contenido en un casete de expresión y estar unido operativamente a un promotor condicional, un promotor inducible, un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido. En otra parte del presente documento se analizan con más detalle ejemplos de promotores. De manera alternativa, el agente nucleasa se puede introducir en la célula como un ARNm que codifica el agente nucleasa.

Un polinucleótido que codifica un agente nucleasa puede integrarse de manera estable en el genoma de una célula y unirse operativamente a un promotor activo en la célula. De manera alternativa, un polinucleótido que codifica un agente nucleasa puede estar en un vector de direccionamiento.

Cuando el agente nucleasa se proporciona a la célula mediante la introducción de un polinucleótido que codifica el agente nucleasa, dicho polinucleótido que codifica un agente nucleasa puede modificarse para sustituir codones que tengan una mayor frecuencia de uso en la célula de interés, en comparación con la secuencia polinucleotídica de origen natural que codifica el agente nucleasa. Por ejemplo, el polinucleótido que codifica el agente nucleasa se puede modificar para sustituir codones que tengan una mayor frecuencia de uso en una célula eucariota de interés dada, incluida una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata o cualquier otra célula hospedadora de interés, en comparación con la secuencia polinucleotídica de origen natural.

(2) Sistemas CRISPR/Cas dirigidos al gen TTR humano

Un tipo particular de reactivo dirigido a *TTR* humano puede ser un sistema CRISPR/Cas que se dirige al gen *TTR* humano. Los sistemas CRISPR/Cas incluyen transcritos y otros elementos involucrados en la expresión o dirección

5 de la actividad de genes Cas. Un sistema CRISPR/Cas puede ser, por ejemplo, un sistema de tipo I, tipo II o tipo III. De manera alternativa, un sistema CRISPR/Cas puede ser un sistema de tipo V (por ejemplo, subtipo V-A o subtipo 10 V-B). Los sistemas CRISPR/Cas utilizados en las composiciones y métodos divulgados en el presente documento pueden ser de origen no natural. Un sistema "que no es de origen natural" incluye cualquier cosa que indique la 15 participación de la mano del hombre, tal como que uno o más componentes del sistema se hayan alterado o mutado de su estado natural, estando al menos sustancialmente libres de al menos otro componente con el que están 20 asociados naturalmente en la naturaleza, o estando asociados con al menos otro componente con el que no están 25 asociados de manera natural. Por ejemplo, los sistemas CRISPR/Cas no naturales pueden emplear complejos 30 CRISPR que comprenden un ARNg y una proteína Cas que no se encuentran juntos de forma natural, una proteína Cas que no se produce de forma natural, o un ARNg que no se produce de forma natural.

15 **Proteínas Cas y polinucleótidos que codifican proteínas Cas.** Las proteínas Cas generalmente comprenden al menos un dominio de unión o reconocimiento de ARN que puede interactuar con los ARN guía (ARNg, que se describen con más detalle a continuación). Las proteínas Cas también pueden comprender dominios nucleasa (por ejemplo, dominios DNasa o RNasa), dominios de unión al ADN, dominios helicasa, dominios de interacción proteína-proteína, dominios de dimerización y otros dominios. Algunos de estos dominios (por ejemplo, dominios DNasa) 20 pueden provenir de una proteína Cas nativa. Se pueden agregar otros dominios similares para producir una proteína Cas modificada. Un dominio nucleasa posee actividad catalítica para la escisión de ácidos nucleicos, que incluye la rotura de los enlaces covalentes de una molécula de ácido nucleico. La escisión puede producir extremos romos o escalonados, y puede ser monocatenaria o bicatenaria. Por ejemplo, una proteína Cas9 de tipo silvestre normalmente 25 crearía un producto de escisión romo. De manera alternativa, una proteína Cpf1 de tipo silvestre (por ejemplo, FnCpf1) 30 puede dar como resultado un producto de escisión con un saliente 5' de 5 nucleótidos, produciéndose la escisión después del par de bases 18 de la secuencia PAM en la cadena no diana y después de la base 23 en la cadena diana. Una proteína Cas puede tener actividad de escisión completa para crear una rotura bicatenaria en un locus genómico diana (por ejemplo, una rotura bicatenaria con extremos romos), o puede ser una nickasa que crea una rotura 35 monocatenaria en un locus genómico diana.

Los ejemplos de proteínas Cas incluyen Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e (CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9 (Csn1 o Csx12), Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, 40 Cse1 (CasA), Cse2 (CasB), Cse3 (CasE), Cse4 (CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, 45 Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, 50 Csf2, Csf3, Csf4 y Csf1966, y homólogos o versiones modificadas de las mismas.

Una proteína Cas ilustrativa es una proteína Cas9 o una proteína derivada de la proteína Cas9. Las proteínas Cas9 55 provienen de un sistema CRISPR/Cas de tipo II y normalmente comparten cuatro motivos clave con una arquitectura conservada. Los motivos 1, 2 y 4 son motivos similares a RuvC y el motivo 3 es un motivo HNH. Las proteínas Cas9 ilustrativas son de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas* sp., *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus* sp., *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor beccsii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finegoldia magna*, *Natranaerobium thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter* sp., *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsonii*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc* sp., *Arthrobacteria maxima*, *Arthrobacteria platensis*, *Arthrobacteria* sp., *Lyngbya* sp., *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria* sp., *Petrotoga mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Acaryochloris marina*, *Neisseria meningitidis* o *Campylobacter jejuni*. En el documento WO 2014/131833 se describen ejemplos adicionales de los miembros de la familia Cas9. Una proteína Cas9 ilustrativa es Cas9 de *S. pyogenes* (SpCas9) (a la que se le ha asignado el número de acceso de SwissProt Q99ZW2). Otra proteína Cas9 ilustrativa es Cas9 de *S. aureus* (SaCas9) (a la que se le ha asignado el número de acceso de UniProt J7RUA5). Otra proteína Cas9 ilustrativa es Cas9 de *Campylobacter jejuni* (CjCas9) (a la que se le ha asignado el número de acceso de UniProt QOP897). Véase, p. ej., Kim et al. (2017) Nat. Comm. 8:14500. SaCas9 es más pequeña que SpCas9 y CjCas9 es más pequeña que SaCas9 y SpCas9. Una secuencia de proteína Cas9 ilustrativa puede comprender, consistir esencialmente en o 60 consistir en la SEQ ID NO: 94. Un ADN ilustrativo que codifica la proteína Cas9 puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en la SEQ ID NO: 93.

Otro ejemplo de proteína Cas es una proteína Cpf1 (CRISPR de *Prevotella* y *Francisella* 1). Cpf1 es una proteína grande (de aproximadamente 1300 aminoácidos) que contiene un dominio nucleasa similar a RuvC homólogo al dominio correspondiente de Cas9 junto con un homólogo al grupo rico en arginina característico de Cas9. Sin embargo, Cpf1 carece del dominio nucleasa HNH que está presente en las proteínas Cas9, y el dominio similar a RuvC es contiguo

- en la secuencia de Cpf1, a diferencia de Cas9, donde contiene insertos largos que incluyen el dominio HNH. Véase, p. ej., Zetsche *et al.* (2015) *Cell* 163(3):759-771. Las proteínas Cpf1 ilustrativas son de *Francisella tularensis* 1, *Francisella tularensis* subsp. *novicida*, *Prevotella albensis*, *Lachnospiraceae bacterium* MC2017 1, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium* GW2011_GWA2 33_10, *Parcubacteria bacterium* GW2011_GWC2_44_17, *Smithella* sp. SCADC, *Acidaminococcus* sp. BV3L6, *Lachnospiraceae bacterium* MA2020, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi* 237, *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium* ND2006, *Porphyromonas crevioricanis* 3, *Prevotella disiens* y *Porphyromonas macacae*. La Cpf1 de *Francisella novicida* U112 (FnCpf1; a la que se le ha asignado el número de acceso UniProt A0Q7Q2) es una proteína Cpf1 ilustrativa.
- 5 Las proteínas Cas pueden ser proteínas de tipo silvestre (es decir, aquellas que se encuentran en la naturaleza), proteínas Cas modificadas (es decir, variantes de la proteína Cas) o fragmentos de proteínas Cas de tipo silvestre o modificadas. Las proteínas Cas también pueden ser variantes o fragmentos activos con respecto a la actividad catalítica de proteínas Cas de tipo silvestre o modificadas. Las variantes o fragmentos activos con respecto a la actividad catalítica pueden comprender al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la proteína Cas de tipo silvestre o modificada o una porción de la misma, en donde las variantes activas conservan la capacidad de cortar en un sitio de escisión deseado y, por tanto, conservan la actividad inductora de mella o inductora de rotura bicatenaria. Se conocen ensayos de actividad para inducir mellas o inducir roturas de doble cadena y generalmente miden la actividad y especificidad general de la proteína Cas en sustratos de ADN que contienen el sitio de escisión.
- 10 20 Las proteínas Cas se pueden modificar para aumentar o disminuir una o más afinidades de unión a ácidos nucleicos, especificidades de unión a ácidos nucleicos y/o la actividad enzimática. Las proteínas Cas también se pueden modificar para cambiar cualquier otra actividad o propiedad de la proteína, tal como la estabilidad. Por ejemplo, se pueden modificar, eliminar o inactivar uno o más dominios nucleasa de la proteína Cas, o una proteína Cas se puede truncar para eliminar dominios que no son esenciales para la función de la proteína o para optimizar (por ejemplo, mejorar o reducir) la actividad o una propiedad de la proteína Cas.
- 15 25 30 Un ejemplo de una proteína Cas modificada es la proteína SpCas9-HF1 modificada, que es una variante de alta fidelidad de Cas9 de *Streptococcus pyogenes* que alberga alteraciones (N497A/R661A/Q695A/Q926A) diseñadas para reducir los contactos de ADN no específicos. Véase, p. ej., Kleinstiver *et al.* (2016) *Nature* 529(7587):490-495. Otro ejemplo de proteína Cas modificada es la variante eSpCas9 modificada (K848A/K1003A/R1060A) diseñada para reducir los efectos fuera de la diana. Véase, p. ej., Slaymaker *et al.* (2016) *Science* 351(6268):84-88. Otras variantes de SpCas9 incluyen K855A y K810A/K1003A/R1060A.
- 35 40 45 50 55 60 65 Las proteínas Cas pueden comprender al menos un dominio nucleasa, tal como un dominio DNasa. Por ejemplo, una proteína Cpf1 de tipo silvestre comprende generalmente un dominio similar a RuvC que escinde las dos cadenas de ADN diana, quizás en una configuración dimérica. Las proteínas Cas también pueden comprender al menos dos dominios nucleasa, tales como dominios DNasa. Por ejemplo, una proteína Cas9 de tipo silvestre generalmente comprende un dominio nucleasa similar a RuvC y un dominio nucleasa similar a HNH. Los dominios RuvC y HNH pueden cortar cada uno una cadena diferente de ADN bicatenario para hacer una rotura bicatenaria en el ADN. Véase, p. ej., Jinek *et al.* (2012) *Science* 337:816-821.
- Uno o más o todos los dominios nucleasa pueden eliminarse o mutarse de modo que ya no sean funcionales o tengan una actividad nucleasa reducida. Por ejemplo, si uno de los dominios nucleasa se elimina o muta en una proteína Cas9, la proteína Cas9 resultante puede denominarse nickasa y puede generar una rotura monocatenaria en una secuencia diana de ARN guía dentro de un ADN de doble cadena, pero no una rotura bicatenaria (es decir, puede escindir la cadena complementaria o la cadena no complementaria, pero no ambas). Si ambos dominios nucleasa se han eliminado o mutado, la proteína Cas resultante (por ejemplo, Cas9) tendrá una capacidad reducida para escindir ambas cadenas de un ADN bicatenario (por ejemplo, una proteína Cas nula o inactiva para nucleasa, o una proteína Cas catalíticamente muerta (dCas)). Un ejemplo de una mutación que convierte Cas9 en una nickasa es una mutación D10A (aspartato a alanina en la posición 10 de Cas9) en el dominio RuvC de Cas9 de *S. pyogenes*. Del mismo modo, H939A (histidina a alanina en la posición del aminoácido 839), H840A (histidina a alanina en la posición del aminoácido 840) o N863A (asparagina a alanina en la posición del aminoácido N863) en el dominio HNH de Cas9 de *S. pyogenes* puede convertir la Cas9 en una nickasa. Otros ejemplos de mutaciones que convierten Cas9 en una nickasa incluyen las mutaciones correspondientes a Cas9 de *S. thermophilus*. Véase, p. ej., Sapranauskas *et al.* (2011) *Nucleic Acids Research* 39:9275-9282 y el documento WO 2013/141680. Estas mutaciones pueden generarse utilizando métodos tales como la mutagénesis dirigida, mutagénesis mediada por PCR o síntesis de genes totales. Se pueden encontrar ejemplos de otras mutaciones que crean nickasas, por ejemplo, en los documentos WO 2013/176772 y WO 2013/142578. Si todos los dominios de nucleasa se eliminan o mutan en una proteína Cas (p. ej., ambos dominios nucleasa se eliminan o mutan en una proteína Cas9), la proteína Cas resultante (p. ej., Cas9) tendrá una capacidad reducida para escindir las dos cadenas de un ADN bicatenario (p. ej., una proteína Cas nula o inactiva para nucleasas). Un ejemplo específico es un doble mutante de Cas9 D10A/H840A de *S. pyogenes* o un doble mutante correspondiente en una Cas9 de otra especie cuando se alinea óptimamente con Cas9 de *S. pyogenes*. Otro ejemplo específico es un doble mutante de Cas9 D10A/N863A de *S. pyogenes* o un doble mutante correspondiente en una Cas9 de otra especie cuando se alinea óptimamente con Cas9 de *S. pyogenes*.

También se conocen ejemplos de mutaciones inactivadoras en los dominios catalíticos de proteínas Cas9 de *Staphylococcus aureus*. Por ejemplo, la enzima Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9) puede comprender una sustitución en la posición N580 (por ejemplo, sustitución N580A) y una sustitución en la posición D10 (por ejemplo, sustitución D10A) para generar una proteína Cas inactiva para nucleasas. Véase, p. ej., el documento WO 5 2016/106236.

También se conocen ejemplos de mutaciones inactivadoras en los dominios catalíticos de proteínas Cpf1. Con referencia a las proteínas Cpf1 de *Francisella novicida* U112 (FnCpf1), *Acidaminococcus* sp. BV3L6 (AsCpf1), *Bacteria lachnospiraceae* ND2006 (LbCpf1) y *Moraxella bovoculi* 237 (MbCpf1 Cpf1), tales mutaciones pueden incluir 10 mutaciones en las posiciones 908, 993 o 1263 de AsCpf1 o posiciones correspondientes en ortólogos de Cpf1, o en las posiciones 832, 925, 947 o 1180 de LbCpf1 o posiciones correspondientes en ortólogos de Cpf1. Tales mutaciones pueden incluir, por ejemplo, una o más de las mutaciones D908A, E993A y D1263A de AsCpf1 o mutaciones correspondientes en ortólogos de Cpf1, o D832A, E925A, D947A y D1180A de LbCpf1 o mutaciones correspondientes en ortólogos de Cpf1. Véase, p. ej., el documento US 15 2016/0208243.

Las proteínas Cas (p. ej., proteínas Cas activas para nucleasas o proteínas Cas inactivas para nucleasas) también 20 pueden unirse operativamente a polipéptidos heterólogos como proteínas de fusión. Por ejemplo, una proteína Cas puede fusionarse con un dominio de escisión o un dominio de modificación epigenética. Véase el documento WO 2014/089290. Las proteínas Cas también se pueden fusionar a un polipéptido heterólogo proporcionando una estabilidad aumentada o disminuida. El dominio o polipéptido heterólogo fusionados se pueden ubicar en el extremo N, el extremo C o internamente dentro de la proteína Cas.

Como ejemplo, una proteína Cas puede fusionarse con uno o más polipéptidos heterólogos que proporcionan la 25 localización subcelular. Dichos polipéptidos heterólogos pueden incluir, por ejemplo, una o más señales de localización nuclear (NLS) tales como la NLS de SV40 monopartita y/o una NLS bipartita de alfa-importina para dirigirse al núcleo, una señal de localización mitocondrial para dirigirse a las mitocondrias, una señal de retención en el ER (retículo endoplasmático) y similares. Véase, p. ej., Lange *et al.* (2007) J. Biol. Chem. 282:5101-5105. Dichas señales de 30 localización subcelular pueden ubicarse en el extremo N, el extremo C o en cualquier lugar dentro de la proteína Cas. Una NLS puede comprender un tramo de aminoácidos básicos y puede ser una secuencia monopartita o una secuencia bipartita. Opcionalmente, una proteína Cas puede comprender dos o más NLS, incluyendo un NLS (por ejemplo, un NLS de alfa-importina o un NLS monopartito) en el extremo N y un NLS (por ejemplo, un NLS de SV40 o un NLS bipartito) en el extremo C. Una proteína Cas también puede comprender dos o más NLS en el extremo N y/o dos o más NLS en el extremo C.

Las proteínas Cas también pueden estar unidas operativamente a un dominio de penetración celular o a un dominio 35 de transducción de proteínas. Por ejemplo, el dominio de penetración celular puede derivar de la proteína TAT de VIH-1, el motivo de penetración de células TLM del virus de la hepatitis B humana, MPG, Pep-1, VP22, un péptido que penetra en las células del virus del herpes simple o una secuencia peptídica de poliarginina. Véase, p. ej., los documentos WO 2014/089290 y WO 2013/176772. El dominio de penetración celular puede ubicarse en el extremo N, el extremo C o en cualquier lugar dentro de la proteína Cas.

Las proteínas Cas también pueden unirse operativamente a un polipéptido heterólogo para facilitar el seguimiento o la 40 purificación, tal como una proteína fluorescente, una etiqueta de purificación o una etiqueta de epítopo. Los ejemplos de proteínas fluorescentes incluyen proteínas verdes fluorescentes (p. ej., GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, eGFP, Emerald, Azami verde, Azami verde monomérico, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), proteínas amarillas fluorescentes (p. ej., YFP, eYFP, Citrina, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), proteínas azules fluorescentes (p. ej., eBFP, eBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), proteínas de color cian fluorescentes (p. ej., eCFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), proteínas rojas fluorescentes (p. ej., mKate, mKate2, mPlum, monómero de DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, monómero de DsRed, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred), proteínas de color naranja fluorescentes (p. ej., mOrange, mKO, Kusabira-Naranja, Kusabira-naranja monomérico, mTangerine, tdTomato) y cualquier otra proteína fluorescente adecuada. Los ejemplos 45 de etiquetas incluyen glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa, tiorredoxina (TRX), poli(NANP), etiqueta de purificación por afinidad en tandem (TAP, por sus siglas en inglés), myc, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, hemaglutinina (HA), nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, 50 S1, T7, V5, VSV-G, histidina (His), proteína transportadora de biotina carboxilo (BCCP) y calmodulina.

Las proteínas Cas también pueden estar unidas a ácidos nucleicos donantes exógenos o ácidos nucleicos marcados. Tal unión (es decir, unión física) se puede conseguir a través de interacciones covalentes o interacciones no 55 covalentes, y la unión puede ser directa (por ejemplo, a través de fusión directa o conjugación química, que se puede lograr mediante modificación de restos de cisteína o lisina en la proteína o modificación de inteína), o se puede lograr a través de uno o más conectores intermedios o moléculas adaptadoras tales como estreptavidina o aptámeros. Véase, p. ej., Pierce *et al.* (2005) Mini Rev. Med. Chem. 5(1):41-55; Duckworth *et al.* (2007) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 46(46):8819-8822; Schaeffer y Dixon (2009) Australian J. Chem. 62(10): 1328-1332; Goodman *et al.* (2009) 60 Chembiochem. 10(9):1551-1557; y Khatwani *et al.* (2012) Bioorg. Med. Chem. 20(14):4532-4539. Las estrategias no covalentes para sintetizar conjugados de proteína y ácido nucleico incluyen los métodos de biotina-estreptavidina y níquel-histidina. Los conjugados covalentes de proteína y ácido nucleico se pueden sintetizar conectando proteínas y

- ácidos nucleicos funcionalizados apropiadamente utilizando una amplia diversidad de químicas. Algunas de estas químicas implican la unión directa del oligonucleótido a un resto de aminoácido en la superficie de la proteína (por ejemplo, una lisina amina o una cisteína tiol), mientras que otros esquemas más complejos requieren una modificación postraduccional de la proteína o la participación de un dominio proteico catalítico o reactivo. Los métodos para la unión covalente de proteínas a ácidos nucleicos pueden incluir, por ejemplo, entrecruzamiento químico de oligonucleótidos con restos lisina o cisteína de proteína, ligadura de proteínas expresadas, métodos quimioenzimáticos y el uso de fotoaptámeros. El ácido nucleico donante exógeno o el ácido nucleico marcado se puede unir al extremo C, el extremo N o a una región interna dentro de la proteína Cas. En un ejemplo, el ácido nucleico donante exógeno o el ácido nucleico marcado está unido al extremo C o al extremo N de la proteína Cas. Del mismo modo, la proteína Cas se puede unir al extremo 5', al extremo 3' o a una región interna dentro del ácido nucleico donante exógeno o ácido nucleico marcado. Es decir, el ácido nucleico donante exógeno o el ácido nucleico marcado puede unirse en cualquier orientación y polaridad. Por ejemplo, la proteína Cas puede estar unida al extremo 5' o al extremo 3' del ácido nucleico donante exógeno o del ácido nucleico marcado.
- Las proteínas Cas se pueden proporcionar en cualquier forma. Por ejemplo, una proteína Cas se puede proporcionar en forma de una proteína, tal como una proteína Cas complejada con un ARNg. De manera alternativa, una proteína Cas se puede proporcionar en forma de un ácido nucleico que codifica la proteína Cas, tal como un ARN (p. ej., ARN mensajero (ARNm)) o ADN. Opcionalmente, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede tener codones optimizados para una traducción eficaz en proteína en una célula u organismo particular. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede modificarse para sustituir codones que tengan una mayor frecuencia de uso en una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata o cualquier otra célula hospedadora de interés, en comparación con la secuencia polinucleotídica de origen natural. Cuando se introduce en la célula un ácido nucleico que codifica la proteína Cas, la proteína Cas puede expresarse en la célula de forma transitoria, condicional o constitutiva.
- Las proteínas Cas proporcionadas como ARNm pueden modificarse para mejorar la estabilidad y/o las propiedades de inmunogenicidad. Las modificaciones pueden realizarse en uno o más nucleósidos dentro del ARNm. Los ejemplos de modificaciones químicas de las nucleobases de ARNm incluyen pseudouridina, 1-metil-pseudouridina y 5-metil-citidina. Por ejemplo, se puede utilizar ARNm de Cas poliadenilado y protegido que contiene N1-metil pseudouridina. Del mismo modo, los ARNm de Cas pueden modificarse mediante empobrecimiento en uridina utilizando codones sinónimos.
- Los ácidos nucleicos que codifican proteínas Cas pueden integrarse de manera estable en el genoma de la célula y unirse operativamente a un promotor activo en la célula. De manera alternativa, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas Cas pueden estar unidos operativamente a un promotor en una construcción de expresión. Las construcciones de expresión incluyen cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen u otra secuencia de un ácido nucleico de interés (p. ej., un gen Cas) y que puede transferir dicha secuencia de un ácido nucleico de interés a una célula diana. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede estar en un vector de direccionamiento que comprende un inserto de ácido nucleico y/o un vector que comprende un ADN que codifica un ARNg. De manera alternativa, puede estar en un vector o plásmido que está separado del vector de direccionamiento que comprende el inserto de ácido nucleico y/o separado del vector que comprende el ADN que codifica el ARNg. Los promotores que pueden usarse en una construcción de expresión incluyen promotores activos, por ejemplo, en una o más de una célula eucariota, una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula de mamífero no humano, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata, una célula de hámster, una célula de conejo, una célula pluripotente, una célula madre embrionaria (ES) o un cigoto. Dichos promotores pueden ser, por ejemplo, promotores condicionales, promotores inducibles, promotores constitutivos o promotores específicos de tejido. Opcionalmente, el promotor puede ser un promotor bidireccional que dirige la expresión tanto de una proteína Cas en una dirección como de un ARN guía en la otra dirección. Dichos promotores bidireccionales pueden consistir en (1) un promotor de Pol III completo, convencional, unidireccional que contiene 3 elementos de control externo: un elemento de secuencia distal (DSE), un elemento de secuencia proximal (PSE) y una caja TATA; y (2) un segundo promotor de Pol III básico que incluye un PSE y una caja TATA fusionados al extremo 5' del DSE en orientación inversa. Por ejemplo, en el promotor de H1, el DSE es adyacente al PSE y a la caja TATA, y el promotor puede volverse bidireccional creando un promotor híbrido en el que la transcripción en la dirección inversa se controla añadiendo un PSE y caja TATA derivada del promotor de U6. Véase, p. ej., el documento US 2016/0074535. El uso de un promotor bidireccional para expresar genes que codifican una proteína Cas y un ARN guía permite simultáneamente la generación de cassetes de expresión compactos para facilitar el suministro.

ARN guía. Un "ARN guía" o "ARNg" es una molécula de ARN que se une a una proteína Cas (por ejemplo, proteína Cas9) y dirige la proteína Cas a una ubicación específica dentro de un ADN diana. Los ARN guía pueden comprender dos segmentos: un "segmento de direccionamiento al ADN" y un "segmento de unión a proteínas". "Segmento" incluye una sección o región de una molécula, tal como un tramo contiguo de nucleótidos en un ARN. Algunos ARNg, tales como los de Cas9, pueden comprender dos moléculas de ARN separadas: un "ARN activador" (por ejemplo, ARNtracr) y un "ARN direccionador" (por ejemplo, ARN CRISPR o ARNcr). Otros ARNg son una única molécula de ARN (polinucleótido de ARN único), y también se pueden denominar "ARNg de una sola molécula", "ARN de guía único", o "ARNgu". Véase, p. ej., los documentos WO 2013/176772, WO 2014/065596, WO 2014/089290, WO 2014/093622,

WO 2014/099750, WO 2013/142578 y WO 2014/131833. Para Cas9, por ejemplo, un ARN de guía único puede comprender un ARNcr fusionado a un ARNtracr (por ejemplo, a través de un conector). Para Cpfl, por ejemplo, solo se necesita un ARNcr para lograr la unión y/o la escisión de una secuencia diana. Los términos "ARN guía" y "ARNg" incluyen tanto ARNg de doble molécula (es decir, modulares) como ARNg de una sola molécula.

- 5 Un ARNg de dos moléculas ilustrativo comprende una molécula similar a ARNcr ("ARN CRISPR" o "ARN direccionador" o "ARNcr" o "repetición de ARNcr") y una molécula correspondiente similar a ARNtracr ("ARN CRISPR de acción trans" o "ARN activador") o "ARNtracr"). Un ARNcr comprende tanto el segmento dirigido al ADN (monocatenario) del ARNg como un tramo de nucleótidos (es decir, la cola del ARNcr) que forma la mitad del dúplex de ARNbc del segmento de unión a proteínas del ARNg. Un ejemplo de una cola de ARNcr, ubicada cadena abajo (3') del segmento de dirección al ADN, comprende, consiste esencialmente en o consiste en GUUUUAGAGCUAUGC (SEQ ID NO: 87). Cualquiera de los segmentos de dirección al ADN divulgados en el presente documento se puede unir al extremo 5' de SEQ ID NO: 87 para formar un ARNcr.
- 10 15 Un ARNtracr correspondiente (ARN activador) comprende un tramo de nucleótidos que forma la otra mitad del dúplex de ARNbc del segmento de unión a proteínas del ARNg. Un tramo de nucleótidos de un ARNcr es complementario e híbrida con un tramo de nucleótidos de un ARNtracr para formar el dúplex de ARNbc del dominio de unión a proteínas del ARNg. De esta manera, se puede decir que cada ARNcr tiene un ARNtracr correspondiente. Un ejemplo de una secuencia de ARNtracr comprende, consiste esencialmente en o consiste en
- 20 AGCAUAGCAAGUAAAAAUAGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACC GAGUCGGUGCUUU (SEQ ID NO: 88).

En sistemas en los que se necesitan tanto un ARNcr como un ARNtracr, el ARNcr y el ARNtracr correspondiente hibridan para formar un ARNg. En sistemas en los que solo se necesita un ARNcr, el ARNcr puede ser el ARNg. El ARNcr proporciona además el segmento de dirección al ADN monocatenario que se dirige a una secuencia diana del ARN guía mediante hibridación con la cadena opuesta (es decir, la cadena complementaria). Si se usa para modificación dentro de una célula, la secuencia exacta de una determinada molécula de ARNcr o ARNtracr puede diseñarse para que sea específica de las especies en las que se utilizarán las moléculas de ARN. Véase, p. ej., Mali et al. (2013) *Science* 339:823-826; Jinek et al. (2012) *Science* 337:816-821; Hwang et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:227-229; Jiang et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:233-239; y Cong et al. (2013) *Science* 339:819-823.

El segmento de dirección al ADN (ARNcr) de un ARNg determinado comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia (es decir, la cadena complementaria de la secuencia de reconocimiento del ARN guía en la cadena opuesta a la secuencia diana del ARN guía) en un ADN diana. El segmento de dirección al ADN de un ARNg interactúa con un ADN diana de una manera específica de secuencia mediante hibridación (es decir, emparejamiento de bases). De esta manera, la secuencia de nucleótidos del segmento de dirección al ADN puede variar y determina la localización dentro del ADN diana en la que el ARNg y el ADN diana interactuarán. El segmento de dirección al ADN de un ARNg en cuestión se puede modificar para hibridar con cualquier secuencia deseada dentro de un ADN diana. Los ARNcr naturales difieren según el sistema CRISPR/Cas y el organismo, pero a menudo contienen un segmento de dirección de entre 21 y 72 nucleótidos de longitud, flanqueado por dos repeticiones directas (DR) de una longitud de entre 21 y 46 nucleótidos (véase, p. ej., el documento WO 2014/131833). En el caso de *S. pyogenes*, los DR tienen 36 nucleótidos de longitud y el segmento de dirección tiene 30 nucleótidos de longitud. El DR ubicado en 3' es complementario e híbrida con el ARNtracr correspondiente, que a su vez se une a la proteína Cas.

45 50 55 60 65 El segmento de dirección al ADN puede tener una longitud de al menos aproximadamente 12 nucleótidos, al menos aproximadamente 15 nucleótidos, al menos aproximadamente 17 nucleótidos, al menos aproximadamente 18 nucleótidos, al menos aproximadamente 19 nucleótidos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos, al menos aproximadamente 25 nucleótidos, al menos aproximadamente 30 nucleótidos, al menos aproximadamente 35 nucleótidos o al menos aproximadamente 40 nucleótidos. Los segmentos de dirección al ADN pueden tener una longitud de aproximadamente 12 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 12 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 12 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 12 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 12 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 12 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos o de aproximadamente 12 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos. Por ejemplo, el segmento de dirección al ADN puede ser de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos (por ejemplo, de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos o de aproximadamente 17 nucleótidos, aproximadamente 18 nucleótidos, aproximadamente 19 nucleótidos o aproximadamente 20 nucleótidos). Véase, p. ej., el documento US 2016/0024523. Para Cas9 de *S. pyogenes*, un segmento de dirección al ADN típico tiene entre 16 y 20 nucleótidos de longitud o entre 17 y 20 nucleótidos de longitud. Para Cas9 de *S. aureus*, un segmento de dirección al ADN típico tiene entre 21 y 23 nucleótidos de longitud. Para Cpfl, un segmento de dirección al ADN típico tiene al menos 16 nucleótidos de longitud o al menos 18 nucleótidos de longitud.

Los ARNtracr pueden estar en cualquier forma (p. ej., ARNtracr de longitud completa o ARNtracr parciales activos) y de longitudes variables. Pueden incluir transcritos primarios o formas procesadas. Por ejemplo, los ARNtracr (como parte de un ARN de guía única o como una molécula separada como parte de un ARNg de dos moléculas) pueden

- comprender, consistir esencialmente o consistir en la totalidad o una porción de una secuencia de ARNtracr de tipo silvestre (por ejemplo, aproximadamente o más de aproximadamente 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85 o más nucleótidos de una secuencia de ARNtracr de tipo silvestre). Los ejemplos de secuencias de ARNtracr de tipo silvestre de *S. pyogenes* incluyen versiones de 171 nucleótidos, 89 nucleótidos, 75 nucleótidos y 65 nucleótidos. Véase, p. ej.,
- 5 Deltcheva et al. (2011) *Nature* 471:602-607; el documento WO 2014/093661. Los ejemplos de ARNtracr dentro de ARN de guía única (ARNgu) incluyen los segmentos de ARNtracr que se encuentran dentro de las versiones +48, +54, +67 y +85 de ARNgu, donde "+n" indica que hasta el nucleótido +n de ARNtracr de tipo silvestre está incluido en el ARNgu. Véase el documento US 8697359.
- 10 El porcentaje de complementariedad entre el segmento de direccionamiento al ADN diana y la cadena complementaria de la secuencia de reconocimiento de ARN guía dentro del ADN diana puede ser al menos de un 60 % (por ejemplo, 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 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 %). El porcentaje de complementariedad entre el segmento de direccionamiento al ADN diana y la cadena complementaria de la secuencia de reconocimiento de ARN guía dentro del ADN diana puede ser al menos de un 60 % sobre aproximadamente 20 nucleótidos contiguos. A modo de ejemplo, el porcentaje de complementariedad entre el segmento de direccionamiento al ADN y la cadena complementaria de la secuencia de reconocimiento de ARN guía dentro del ADN diana es de un 100 % sobre los 14 nucleótidos contiguos en el extremo 5' de la cadena complementaria de la secuencia de reconocimiento del ARN guía dentro de la cadena complementaria del ADN diana y de tan solo el 0 % sobre el resto. En tal caso, se puede considerar que el segmento de direccionamiento al ADN tiene 14 nucleótidos de longitud. Como otro ejemplo, el porcentaje de complementariedad entre el segmento de direccionamiento al ADN y la cadena complementaria de la secuencia de reconocimiento de ARN guía dentro del ADN diana es de un 100 % sobre los siete nucleótidos contiguos en el extremo 5' de la cadena complementaria de la secuencia de reconocimiento del ARN guía dentro de la cadena complementaria del ADN diana y de tan solo el 0 % sobre el resto. En tal caso, se puede considerar que el segmento de direccionamiento al ADN tiene 7 nucleótidos de longitud. En algunos ARN guía, al menos 17 nucleótidos dentro del segmento de direccionamiento al ADN son complementarios al ADN diana. Por ejemplo, el segmento de direccionamiento al ADN puede tener 20 nucleótidos de longitud y puede comprender 1, 2 o 3 desajustes con la cadena complementaria de la secuencia de reconocimiento del ARN guía. Preferentemente, los desajustes no son adyacentes a una secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM) (por ejemplo, los desajustes están en el extremo 5' del segmento de direccionamiento al ADN, o los desajustes están al menos a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 pares de bases de distancia de la secuencia PAM).
- 15 20 25 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El segmento de unión a proteínas de un ARNp puede comprender dos tramos de nucleótidos que son complementarios entre sí. Los nucleótidos complementarios del segmento de unión a proteínas hibridan para formar un dúplex de ARN bicatenario (ARNbc). El segmento de unión a proteínas de un ARNp en cuestión interactúa con una proteína Cas, y el ARNp dirige la proteína Cas unida a una secuencia de nucleótidos específica dentro del ADN diana a través del segmento de direccionamiento al ADN.
- Los ARN de guía única tienen el segmento de direccionamiento al ADN y una secuencia de armazón (es decir, la secuencia de unión a proteínas o de unión a Cas del ARN guía). Por ejemplo, dichos ARN guía tienen un segmento de direccionamiento al ADN en 5' y una secuencia de armazón en 3'. Las secuencias de armazón ilustrativas comprenden, consisten esencialmente en o consisten en:
- GUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGGUAAAAAUAGGCUAGGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG
GUGCU (versión 1; SEQ ID NO: 89);
- GUUGGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGGUAAAUAAGGCUAGGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACC
GAGUCGGUGC (versión 2; SEQ ID NO: 8);
- GUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGGUAAAAAUAGGCUAGGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG
GUGC (versión 3; SEQ ID NO: 9);
- y
GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGGUUUAAAUAAGGCUAGGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGG
CACCGAGUCGGUGC (versión 4; SEQ ID NO: 10). Los ARN guía dirigidos a cualquier secuencia diana de ARN guía pueden incluir, por ejemplo, un segmento de direccionamiento al ADN en el extremo 5' del ARN guía fusionado a cualquiera de las secuencias de armazón de ARN guía ilustrativas en el extremo 3' del ARN guía. Es decir, cualquiera de los segmentos de direccionamiento al ADN divulgados en el presente documento puede unirse al extremo 5' de una cualquiera de las SEQ ID NO: 89, 8, 9 o 10 para formar un ARN de guía única (ARN guía químico). Las versiones 1, 2, 3 y 4 del ARN guía, tal como se divultan en otra parte del presente documento, se refieren a segmentos de direccionamiento al ADN (es decir, secuencias guía o guías) unidos con las versiones 1, 2, 3 y 4 del armazón, respectivamente.
- Los ARN guía pueden incluir modificaciones o secuencias que proporcionen características deseables adicionales (p. ej., estabilidad modificada o regulada; direccionamiento subcelular; seguimiento con una etiqueta fluorescente; un sitio de unión para una proteína o complejo de proteínas; y similares). Los ejemplos de tales modificaciones incluyen, por

ejemplo, una caperuza 5' (p. ej., una caperuza de 7-metilguanilato (m7G)); una cola 3' poliadenilada (es decir, una cola 3' poli(A)); una secuencia de ribointerruptor (p. ej., para permitir la estabilidad regulada y/o la accesibilidad regulada por proteínas y/o complejos de proteínas); una secuencia de control de la estabilidad; una secuencia que forma un dúplex de ARNbc (es decir, una horquilla); una modificación o secuencia que dirige el ARN a una localización subcelular (por ejemplo, núcleo, mitocondria, cloroplastos y similares); una modificación o secuencia que proporciona seguimiento (por ejemplo, conjugación directa con una molécula fluorescente, conjugación con una fracción que facilita la detección fluorescente, una secuencia que permite la detección fluorescente, etc.); una modificación o secuencia que proporciona un sitio de unión para proteínas (por ejemplo, proteínas que actúan sobre el ADN, incluyendo ADN metiltransferasas, ADN desmetilasas, histona acetiltransferasas, histona desacetilasas y similares); y combinaciones de los mismos. Otros ejemplos de modificaciones incluyen estructuras dúplex de tallo-bucle diseñadas por ingeniería genética, regiones abultadas diseñadas por ingeniería genética, horquillas 3' diseñadas por ingeniería genética de la estructura dúplex de tallo-bucle, o cualquier combinación de las mismas. Véase, p. ej., el documento US 2015/0376586. Un abultamiento puede ser una región desapareada de nucleótidos dentro del dúplex formado por la región similar a ARNcr y la región mínima similar a ARNtracr. Un abultamiento puede comprender, en un lado del dúplex, un 5'-XXXY-3' desapareado donde X es cualquier purina e Y puede ser un nucleótido que puede formar un par oscilante con un nucleótido en la cadena opuesta y una región de nucleótidos no apareado en el otro lado del dúplex.

Los ácidos nucleicos no modificados pueden ser propensos a la degradación. Los ácidos nucleicos exógenos también pueden inducir una respuesta inmunitaria innata. Las modificaciones pueden ayudar a introducir estabilidad y reducir la inmunogenicidad. Los ARN guía pueden comprender nucleósidos modificados y nucleótidos modificados que incluyen, por ejemplo, uno o más de los siguientes: (1) alteración o reemplazo de uno o ambos oxígenos de fosfato no enlazantes y/o de uno o más de los oxígenos de fosfato enlazantes en el enlace de la cadena principal de fosfodiéster; (2) alteración o reemplazo de un constituyente del azúcar ribosa tal como alteración o sustitución del 2' hidroxilo del azúcar ribosa; (3) reemplazo de la fracción fosfato con enlazadores defoso; (4) modificación o reemplazo de una nucleobase de origen natural; (5) reemplazo o modificación de la cadena principal de ribosa-fosfato; (6) modificación del extremo 3' o del extremo 5' del oligonucleótido (p. ej., eliminación, modificación o reemplazo de un grupo fosfato terminal o conjugación de una fracción); y (7) modificación del azúcar. Otras posibles modificaciones del ARN guía incluyen modificaciones o reemplazo de uracilos o tractos de poliuracilo. Véase, p. ej., los documentos WO 2015/048577 y US 2016/0237455.

Se pueden realizar modificaciones similares en ácidos nucleicos que codifican Cas, tales como ARNm de Cas.

Como ejemplo, los nucleótidos en el extremo 5' o 3' de un ARN guía pueden incluir enlaces fosforotioato (p. ej., las bases pueden tener un grupo fosfato modificado que es un grupo fosforotioato). Por ejemplo, un ARN guía puede incluir enlaces fosforotioato entre los 2, 3 o 4 nucleótidos terminales en el extremo 5' o 3' del ARN guía. Como otro ejemplo, los nucleótidos en el extremo 5' y/o 3' de un ARN guía pueden tener modificaciones 2'-O-metilo. Por ejemplo, un ARN guía puede incluir modificaciones 2'-O-metilo en los nucleótidos 2, 3 o 4 terminales en el extremo 5' y/o 3' del ARN guía (por ejemplo, el extremo 5'). Véase, p. ej., el documento WO 2017/173054 A1 y Finn et al. (2018) Cell Reports 22:1-9. En un ejemplo específico, el ARN guía comprende análogos de 2'-O-metilo y enlaces internucleotídicos de fosforotioato 3' en los primeros tres restos de ARN terminales 5' y 3'. En otro ejemplo específico, el ARN guía se modifica de manera que todos los grupos 2'OH que no interactúan con la proteína Cas9 se reemplazan con análogos de 2'-O-metilo, y la región de la cola del ARN guía, que tiene una interacción mínima con Cas9, está modificada con enlaces internucleotídicos fosforotioato 5' y 3'. Véase, p. ej., Yin et al. (2017) Nat. Biotech. 35(12):1179-1187. Otros ejemplos de ARN guía modificados se describen, por ejemplo, en el documento WO 2018/107028 A1.

Los ARN guía se pueden proporcionar en cualquier forma. Por ejemplo, el ARNg puede proporcionarse en forma de ARN, ya sea como dos moléculas (ARNcr y ARNtracr separados) o como una molécula (ARNgu) y, opcionalmente, en forma de un complejo con una proteína Cas. El ARNg también se puede proporcionar en forma de ADN que codifica el ARNg. El ADN que codifica el ARNg puede codificar una sola molécula de ARN (ARNgu) o moléculas de ARN separadas (p. ej., ARNcr y ARNtracr separados). En el último caso, el ADN que codifica el ARNg se puede proporcionar como una molécula de ADN o como moléculas de ADN separadas que codifican el ARNcr y el ARNtracr, respectivamente.

Cuando un ARNg se proporciona en forma de ADN, el ARNg puede expresarse en la célula de forma transitoria, condicional o constitutiva. Los ADN que codifican ARNg pueden integrarse de manera estable en el genoma de la célula y unirse operativamente a un promotor activo en la célula. De manera alternativa, los ADN que codifican ARNg pueden unirse operativamente a un promotor en una construcción de expresión. Por ejemplo, el ADN que codifica el ARNg puede estar en un vector que comprende un ácido nucleico heterólogo, tal como un ácido nucleico que codifica una proteína Cas. De manera alternativa, puede ser en un vector o un plásmido que esté separado del vector que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas. Los promotores que pueden usarse en tales construcciones de expresión incluyen promotores activos, por ejemplo, en una o más de una célula eucariota, una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula de mamífero no humano, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata, una célula de hámster, una célula de conejo, una célula pluripotente, una célula madre embrionaria (ES), una célula madre adulta, una célula progenitora de desarrollo restringido, una célula madre pluripotente inducida (iPS) o un embrión en fase de una sola célula. Dichos promotores pueden ser, por ejemplo,

promotores condicionales, promotores inducibles, promotores constitutivos o promotores específicos de tejido. Dichos promotores también pueden ser, por ejemplo, promotores bidireccionales. Los ejemplos específicos de promotores adecuados incluyen un promotor de ARN polimerasa III, tal como un promotor de U6 humano, un promotor III de U6 polimerasa de rata, o un promotor de U6 polimerasa III de ratón.

- 5 De manera alternativa, los ARNg se pueden preparar mediante otros diversos métodos. Por ejemplo, los ARNg se pueden preparar mediante transcripción *in vitro* usando, por ejemplo, ARN polimerasa de T7 (véanse, p. ej., los documentos WO 2014/089290 y WO 2014/065596). Los ARNg también pueden ser una molécula producida sintéticamente preparada mediante síntesis química.
- 10 **Secuencias de reconocimiento de ARN guía y secuencias diana de ARN guía.** La expresión "secuencia de reconocimiento de ARN guía" incluye secuencias de ácido nucleico presentes en un ADN diana al que se unirá un segmento de direccionamiento de ADN de un ARNg, siempre que existan condiciones suficientes para la unión. La expresión secuencia de reconocimiento de ARN guía como se usa en el presente documento abarca las dos cadenas 15 del ADN bicatenario diana (es decir, la secuencia en la cadena complementaria con la que hibrida el ARN guía y la secuencia correspondiente en la cadena no complementaria adyacente al motivo adyacente al protoespaciador (PAM)). El término "secuencia diana de ARN guía" como se usa en el presente documento se refiere específicamente a la secuencia en la cadena no complementaria adyacente al PAM (es decir, cadena arriba o 5' del PAM). Es decir, la secuencia diana del ARN guía se refiere a la secuencia en la cadena no complementaria correspondiente a la secuencia con la que hibrida el ARN guía en la cadena complementaria. Una secuencia diana de ARN guía es equivalente al segmento de direccionamiento al ADN de un ARN guía, pero con timinas en lugar de uracilos. Como ejemplo, una secuencia diana de ARN guía para una enzima Cas9 se referiría a la secuencia en la cadena no complementaria adyacente al PAM 5'-NGG-3'. Las secuencias de reconocimiento de ARN guía incluyen secuencias con las que se diseña un ARN guía para que tenga complementariedad, donde la hibridación entre la cadena 20 complementaria de una secuencia de reconocimiento de ARN guía y un segmento de direccionamiento al ADN de un ARN guía promueve la formación de un complejo CRISPR. No se requiere necesariamente una complementariedad total, siempre que haya suficiente complementariedad para provocar la hibridación y promover la formación de un complejo CRISPR. Las secuencias de reconocimiento de ARN guía o las secuencias diana de ARN guía también 25 incluyen sitios de escisión para proteínas Cas, tal como se describe con más detalle a continuación. Una secuencia de reconocimiento de ARN guía o una secuencia diana de ARN guía puede comprender cualquier polinucleótido, que 30 se puede ubicar, por ejemplo, en el núcleo o citoplasma de una célula o dentro de un orgánulo de una célula, tal como una mitocondria o un cloroplasto.
- 35 La secuencia de reconocimiento del ARN guía dentro de un ADN diana puede establecerse como diana (es decir, unirse a, o hibridar con, o ser complementaria a) una proteína Cas o un ARNg. Las condiciones de unión al ADN/ARN adecuadas incluyen condiciones fisiológicas normalmente presentes en una célula. Se conocen otras condiciones de unión al ADN/ARN adecuadas (por ejemplo, condiciones en un sistema libre de células) (véase, p. ej., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001). La cadena del ADN diana que 40 es complementaria e hibrida con la proteína Cas o ARNg puede denominarse "cadena complementaria", y la cadena del ADN diana que es complementaria a la "cadena complementaria" (y por lo tanto no es complementaria a la proteína Cas o al ARNg) puede denominarse "cadena no complementaria" o "cadena molde".
- 45 La proteína Cas puede escindir el ácido nucleico en un sitio dentro o fuera de la secuencia de ácido nucleico presente en el ADN diana al que se unirá el segmento de direccionamiento al ADN de un ARNg. El "sitio de escisión" puede incluir la posición de un ácido nucleico en el que una proteína Cas produce una rotura monocatenaria o una rotura bicatenaria. Por ejemplo, la formación de un complejo CRISPR (que comprende un ARNg hibridado con la cadena complementaria de una secuencia de reconocimiento de ARN guía y que forma un complejo con una proteína Cas) puede dar como resultado la escisión de una o ambas cadenas en o cerca de (p. ej., dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 50 10, 20, 50 o más pares de bases de) la secuencia de ácido nucleico presente en un ADN diana a la que se unirá un segmento de direccionamiento al ADN de un ARNg. Si el sitio de escisión está fuera de la secuencia de ácido nucleico a la que se unirá el segmento de direccionamiento al ADN del ARNg, se considera que el sitio de escisión sigue estando dentro de la "secuencia de reconocimiento de ARN guía" o secuencia diana de ARN guía. El sitio de escisión puede estar en una sola cadena o en ambas cadenas de un ácido nucleico. Los sitios de escisión pueden estar en la misma posición en ambas cadenas del ácido nucleico (produciendo extremos romos) o pueden estar en diferentes 55 sitios en cada cadena (produciendo extremos escalonados (es decir, salientes)). Se pueden producir extremos escalonados, por ejemplo, mediante el uso de dos proteínas Cas, cada uno de los cuales produce una rotura monocatenaria en un sitio de escisión diferente en una cadena diferente, produciendo así una rotura bicatenaria. Por ejemplo, una primera nickasa puede crear una rotura monocatenaria en la primera cadena de ADN bicatenario (ADNb), y una segunda nickasa puede crear una rotura monocatenaria en la segunda cadena de ADNb de manera 60 que se crean secuencias salientes. En algunos casos, la secuencia de reconocimiento de ARN guía o la secuencia diana de ARN guía de la nickasa en la primera cadena está separada de la secuencia de reconocimiento de ARN guía o la secuencia diana de ARN guía de la nickasa en la segunda cadena por al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 pares de bases.
- 65 La unión y/o escisión específica de sitio del ADN diana por proteínas Cas puede producirse en ubicaciones determinadas tanto por (i) la complementariedad del emparejamiento de bases entre el ARNg y el ADN diana como

- por (ii) un motivo corto, denominado motivo adyacente al protoespaciador (PAM), en el ADN diana. El PAM puede flanquear la secuencia diana del ARN guía en la cadena no complementaria opuesta a la cadena con la que hibrida el ARN guía. Opcionalmente, la secuencia diana del ARN guía puede estar flanqueada en el extremo 3' por el PAM. De manera alternativa, la secuencia diana del ARN guía puede estar flanqueada en el extremo 5' por el PAM. Por ejemplo, el sitio de escisión de las proteínas Cas puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 o de 5 aproximadamente 2 a aproximadamente 5 pares de bases (por ejemplo, 3 pares de bases) cadena arriba o cadena abajo de la secuencia de PAM. En algunos casos (por ejemplo, cuando se utiliza Cas9 de *S. pyogenes* o una Cas9 estrechamente relacionada), la secuencia de PAM de la cadena no complementaria puede ser 5'-NiGG-3', donde N₁ es cualquier nucleótido de ADN y está inmediatamente en 3' de la secuencia de reconocimiento del ARN guía de la cadena no complementaria del ADN diana (es decir, inmediatamente en 3' de la secuencia diana del ARN guía). De esta manera, la secuencia de PAM de la cadena complementaria sería 5'-CCN₂-3', donde N₂ es cualquier nucleótido de ADN y está inmediatamente en 5' de la secuencia de reconocimiento del ARN guía de la cadena complementaria del ADN diana. En algunos de estos casos, N₁ y N₂ puede ser complementarios y el par de bases N₁-N₂ puede ser cualquier par de bases (por ejemplo, N=C y N₂=G; N=G y N₂=C; N₁=A y N₂=T; o N₁=T y N₂=A). En el caso de Cas9 de *S. aureus*, el PAM puede ser NNGRRT o NNGRR, donde N puede ser A, G, C o T, y R puede ser G o A. En el caso de Cas9 de *C. jejuni*, el PAM puede ser, por ejemplo, NNNNACAC o NNNNRYAC, donde N puede ser A, G, C o T y R puede ser G o A. En algunos casos (por ejemplo, para FnCpf1), la secuencia de PAM puede estar cadena arriba del extremo 5' y tener la secuencia 5'-TTN-3'.
- 10 20 A continuación se describen ejemplos de secuencias diana de ARN guía o secuencias diana de ARN guía además de una secuencia de PAM. Por ejemplo, la secuencia diana de ARN guía puede ser una secuencia de ADN de 20 nucleótidos inmediatamente anterior a un motivo NGG reconocido por una proteína Cas9. Son ejemplos de dichas secuencias diana de ARN guía más una secuencia de PAM GN₁₉NGG (SEQ ID NO: 11) o N₂₀NGG (SEQ ID NO: 12). Véase, p. ej., el documento WO 2014/165825. La guanina en el extremo 5' puede facilitar la transcripción mediante la ARN polimerasa en las células. Otros ejemplos de secuencias diana de ARN guía más una secuencia de PAM pueden 25 incluir dos nucleótidos de guanina en el extremo 5' (por ejemplo, GGN)₂₀NGG; SEQ ID NO: 13) para facilitar la transcripción eficaz por la polimerasa de T7 *in vitro*. Véase, p. ej., el documento WO 2014/065596. Otras secuencias diana de ARN guía más una secuencia PAM pueden tener entre 4 y 22 nucleótidos de longitud de SEQ ID NO: 11-13, 30 incluyendo la G o GG 5' y la GG o NGG 3'. Otras secuencias diana adicionales de ARN guía pueden tener entre 14 y 20 nucleótidos de longitud de SEQ ID NOS: 11-13.

35 La secuencia de reconocimiento de ARN guía o la secuencia diana de ARN guía puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico endógena o exógena a una célula. La secuencia de reconocimiento de ARN guía o la secuencia diana de ARN guía puede ser una secuencia que codifica un producto génico (por ejemplo, una proteína) o una secuencia no codificante (por ejemplo, una secuencia reguladora) o puede incluir ambas.

(3) Ácidos nucleicos donantes exógenos dirigidos al gen TTR humano

- 40 Los métodos y composiciones divulgados en el presente documento pueden utilizar ácidos nucleicos donantes exógenos para modificar el locus *TTR* humanizado tras la escisión del locus *TTR* humanizado con un agente nucleasa. En dichos métodos, la proteína del agente nucleasa escinde el locus *TTR* humanizado para crear una rotura monocatenaria (mella) o una rotura bicatenaria, y el ácido nucleico donante exógeno recombinata el locus *TTR* humanizado mediante ligadura mediada por unión de extremos no homólogos (NHEJ) o mediante un suceso de reparación dirigida por homología. Opcionalmente, la reparación con el ácido nucleico donante exógeno elimina o altera la secuencia diana de la nucleasa de modo que el agente nucleasa no puede volver a establecer como diana los alelos que han sido establecidos como diana.

50 Los ácidos nucleicos donantes exógenos pueden comprender ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden tener forma lineal o circular. Por ejemplo, un ácido nucleico donante exógeno puede ser un oligodesoxinucleótido monocatenario (ODNmC). Véase, p. ej., Yoshimi et al. (2016) Nat. Commun. 7:10431. Un ácido nucleico donante exógeno ilustrativo tiene una longitud de entre aproximadamente 50 nucleótidos y aproximadamente 5 kb, tiene entre aproximadamente 50 nucleótidos y aproximadamente 3 kb de longitud o tiene entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1.000 nucleótidos de longitud. Otros ácidos nucleicos donantes exógenos ilustrativos tienen una longitud de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 200 nucleótidos. 55 Por ejemplo, un ácido nucleico donante exógeno puede tener entre aproximadamente 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190 o 190-200 nucleótidos de longitud. De manera alternativa, un ácido nucleico donante exógeno puede tener entre aproximadamente 50-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 800-900 o 900-1000 nucleótidos de longitud. De manera alternativa, un ácido nucleico donante exógeno puede tener de entre aproximadamente 1-1,5, 1,5-2, 2-2,5, 2,5-3, 3-60 3,5, 3,5-4, 4-4,5 o 4,5-5 kb de longitud. De manera alternativa, un ácido nucleico donante exógeno puede ser, por ejemplo, de no más de 5 kb, 4,5 kb, 4 kb, 3,5 kb, 3 kb, 2,5 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb, 900 nucleótidos, 800 nucleótidos, 700 nucleótidos, 600 nucleótidos, 500 nucleótidos, 400 nucleótidos, 300 nucleótidos, 200 nucleótidos, 100 nucleótidos o 50 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos donantes exógenos (por ejemplo, vectores de direccionamiento) también pueden ser más largos.

65 En un ejemplo, un ácido nucleico donante exógeno es un ODNmc que tiene entre aproximadamente 80 nucleótidos y

- aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, un ácido nucleico donante exógeno es un ODNmc que tiene entre aproximadamente 80 nucleótidos y aproximadamente 3 kb de longitud. Un ODNmc de este tipo puede tener brazos de homología, por ejemplo, que tienen cada uno entre aproximadamente 40 nucleótidos y aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. Un ODNmc de este tipo también puede tener brazos de homología, por ejemplo, que tienen cada uno entre aproximadamente 30 nucleótidos y 100 nucleótidos de longitud. Los brazos de homología pueden ser simétricos (por ejemplo, los dos de 40 nucleótidos o los dos de 60 nucleótidos de longitud) o pueden ser asimétricos (por ejemplo, un brazo de homología de 36 nucleótidos de longitud y un brazo de homología de 91 nucleótidos de longitud).
- 5 10 Los ácidos nucleicos donantes exógenos pueden incluir modificaciones o secuencias que proporcionen características deseables adicionales (p. ej., estabilidad modificada o regulada; seguimiento o detección con un marcador fluorescente; un sitio de unión para una proteína o complejo de proteínas; etc.). Los ácidos nucleicos donantes exógenos pueden comprender uno o más marcadores fluorescentes, etiquetas de purificación, etiquetas de epítopos o una combinación de los mismos. Por ejemplo, un ácido nucleico donante exógeno puede comprender uno o más marcadores fluorescentes (por ejemplo, proteínas fluorescentes u otros fluoróforos o colorantes), tal como al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 marcadores fluorescentes. Los marcadores fluorescentes ilustrativos incluyen fluoróforos tales como fluoresceína (por ejemplo, 6-carboxifluoresceína (6-FAM)), Rojo Texas, HEX, Cy3, Cy5, Cy5.5, Pacific Blue, 5-(y-6)-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) y Cy7. En el mercado está disponible una amplia gama de tintes fluorescentes para marcar oligonucleótidos (por ejemplo, de Integrated DNA Technologies).
- 15 20 25 Tales marcadores fluorescentes (por ejemplo, marcadores fluorescentes internos) se pueden utilizar, por ejemplo, para detectar un ácido nucleico donante exógeno que se ha integrado directamente en un ácido nucleico diana escindido que tiene extremos salientes compatibles con los extremos del ácido nucleico donante exógeno. El marcador o etiqueta puede estar en el extremo 5', el extremo 3' o internamente dentro del ácido nucleico donante exógeno. Por ejemplo, se puede conjugar un ácido nucleico donante exógeno en el extremo 5' con el fluoróforo IR700 de Integrated DNA Technologies (5'IRDYE®700).

Los ácidos nucleicos donantes exógenos también pueden comprender insertos de ácido nucleico que incluyen segmentos de ADN para integrarse en el locus *TTR* humanizado. La integración de un inserto de ácido nucleico en un locus *TTR* humanizado puede dar como resultado, además de una secuencia de ácido nucleico de interés para el locus *TTR* humanizado, la eliminación de una secuencia de ácido nucleico de interés en el locus *TTR* humanizado, o el reemplazo de una secuencia de ácido nucleico de interés en el locus *TTR* humanizado (es decir, eliminación e inserción). Algunos ácidos nucleicos donantes exógenos están diseñados para la inserción de un inserto de ácido nucleico en el locus *TTR* humanizado sin ninguna eliminación correspondiente en el locus *TTR* humanizado. Otros ácidos nucleicos donantes exógenos están diseñados para eliminar una secuencia de ácido nucleico de interés en el locus *TTR* humanizado sin ninguna inserción correspondiente de un inserto de ácido nucleico. Otros ácidos nucleicos donantes exógenos adicionales están diseñados para eliminar una secuencia de ácido nucleico de interés en el locus *TTR* humanizado y reemplazarla con un inserto de ácido nucleico.

40 45 50 El inserto de ácido nucleico o el ácido nucleico correspondiente en el locus *TTR* humanizado que se elimina y/o reemplaza puede tener diversas longitudes. Un inserto de ácido nucleico ilustrativo o ácido nucleico correspondiente en el locus *TTR* humanizado que se elimina y/o reemplaza tiene entre aproximadamente 1 nucleótido y aproximadamente 5 kb de longitud o entre aproximadamente 1 nucleótido y aproximadamente 1.000 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, un inserto de ácido nucleico o un ácido nucleico correspondiente en el locus *TTR* humanizado que se elimina y/o reemplaza puede estar entre aproximadamente 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190 o 190-200 nucleótidos de longitud. Del mismo modo, un inserto de ácido nucleico o un ácido nucleico correspondiente en el locus *TTR* humanizado que se elimina y/o reemplaza puede tener entre 1-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 800-900 o 900-1000 nucleótidos de longitud. Del mismo modo, un inserto de ácido nucleico o un ácido nucleico correspondiente en el locus *TTR* humanizado que se elimina y/o reemplaza puede tener entre aproximadamente 1-1,5, 1,5-2, 2-2,5, 2,5-3, 3-3,5, 3,5-4, 4-4,5 o 4,5-5 kb de longitud o más.

55 El inserto de ácido nucleico puede comprender una secuencia que sea homóloga u ortóloga a toda o parte de la secuencia diana para el reemplazo. Por ejemplo, el inserto de ácido nucleico puede comprender una secuencia que comprende una o más mutaciones puntuales (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más) en comparación con una secuencia destinada a ser reemplazada en el locus *TTR* humanizado. Opcionalmente, tales mutaciones puntuales pueden dar como resultado una sustitución de aminoácidos conservativa (por ejemplo, sustitución de ácido aspártico [Asp, D] con ácido glutámico [Glu, E]) en el polipéptido codificado.

Ácidos nucleicos donantes para inserción mediada por unión de extremos no homólogos.

60 65 Algunos ácidos nucleicos donantes exógenos tienen regiones monocatenarias cortas en el extremo 5' y/o en el extremo 3' que son complementarias a uno o más salientes creados por escisión mediada por nucleasa en el locus *TTR* humanizado. Estos salientes también pueden denominarse brazos de homología 5' y 3'. Por ejemplo, algunos ácidos nucleicos donantes exógenos tienen regiones monocatenarias cortas en el extremo 5' y/o en el extremo 3' que son complementarias a uno o más salientes creados por escisión mediada por nucleasa en secuencias diana 5' y/o 3' en el locus *TTR* humanizado. Algunos de tales ácidos nucleicos donantes exógenos tienen una región complementaria

solo en el extremo 5' o solo en el extremo 3'. Por ejemplo, algunos de estos ácidos nucleicos donantes exógenos tienen una región complementaria solo en el extremo 5' complementario a un saliente creado en una secuencia diana 5' en el locus *TTR* humanizado o solo en el extremo 3' complementario a un saliente creado en una secuencia diana 3' en el locus *TTR* humanizado. Otros de estos ácidos nucleicos donantes exógenos tienen regiones complementarias

5 tanto en el extremo 5' como en el extremo 3'. Por ejemplo, otros de estos ácidos nucleicos donantes exógenos tienen regiones complementarias tanto en el extremo 5' como en el extremo 3', p. ej., complementarias al primer y segundo saliente, respectivamente, generadas por escisión mediada por nucleasa en el locus *TTR* humanizado. Por ejemplo, si el ácido nucleico donante exógeno es bicatenario, las regiones complementarias monocatenarias pueden extenderse desde el extremo 5' de la cadena superior del ácido nucleico donante y el extremo 5' de la cadena inferior 10 del ácido nucleico donante, creando salientes 5' en cada extremo. De manera alternativa, la región complementaria monocatenaria puede extenderse desde el extremo 3' de la cadena superior del ácido nucleico donante y desde el extremo 3' de la cadena inferior del molde, creando salientes 3'.

15 Las regiones complementarias pueden tener cualquier longitud suficiente para promover la ligadura entre el ácido nucleico donante exógeno y el ácido nucleico diana. Las regiones complementarias ilustrativas tienen entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 150 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, una región complementaria puede ser al menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud. De manera alternativa, la región complementaria puede ser de 20 aproximadamente 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140 o 140-150 nucleótidos de longitud, o más.

25 Estas regiones complementarias pueden ser complementarias a los salientes creados por dos pares de nickasas. Se
 pueden crear dos roturas bicanteras con extremos escalonados utilizando una primera y segunda nickasas que
 escinden cadenas opuestas de ADN para crear una primera rotura bicanteria, y una tercera y cuarta nickasas que
 escinden cadenas opuestas de ADN para crear una segunda rotura bicanteria. Por ejemplo, se puede utilizar una
 proteína Cas para realizar una mella en la primera, segunda, tercera y cuarta secuencias diana de ARN guía
 correspondientes al primer, segundo, tercero y cuarto ARN guía. Las secuencias diana de ARN guía primera y segunda
 se pueden posicionar para crear un primer sitio de escisión de modo que las mellitas creadas por la primera y segunda
 nickasas en la primera y segunda cadenas de ADN crean una rotura bicanteria (es decir, el primer sitio de escisión
 comprende las mellitas dentro de la primera y segunda secuencias diana de ARN guía). Del mismo modo, las
 secuencias diana de ARN guía tercera y cuarta se pueden posicionar para crear un segundo sitio de escisión de modo
 que las mellitas creadas por la tercera y cuarta nickasas en la primera y segunda cadenas de ADN crean una rotura
 bicanteria (es decir, el segundo sitio de escisión comprende las mellitas dentro de la tercera y cuarta secuencias diana
 de ARN guía). Preferentemente, las mellitas dentro de la primera y segunda secuencias diana de ARN guía y/o la
 tercera y cuarta secuencias diana de ARN guía pueden ser mellitas desplazadas que crean salientes. La ventana de
 compensación puede ser, por ejemplo, de al menos aproximadamente 5 pb, 10 pb, 20 pb, 30 pb, 40 pb, 50 pb, 60 pb,
 70 pb, 80 pb, 90 pb, 100 pb o más. Véase Ran et al. (2013) Cell 154:1380-1389; Mali et al. (2013) Nat. Biotech. 31:833-
 838; y Shen et al. (2014) Nat. Methods 11:399-404. En estos casos, se puede diseñar un ácido nucleico donante
 40 exógeno bicanterio con regiones complementarias monocatenarias que son complementarias a los salientes creados
 por las mellitas dentro de la primera y segunda secuencias diana de ARN guía y por las mellitas dentro de la tercera y
 cuarta secuencias diana de ARN guía. Un ácido nucleico donante exógeno de este tipo puede insertarse entonces
 mediante ligadura mediada por unión de extremos no homólogos.

45 **Ácidos nucleicos donantes para inserción mediante reparación dirigida por homología.** Algunos ácidos nucleicos donantes exógenos comprenden brazos de homología. Si el ácido nucleico donante exógeno también comprende un inserto de ácido nucleico, los brazos de homología pueden flanquear el inserto de ácido nucleico. Para facilitar la referencia, los brazos de homología se denominan en el presente documento brazos de homología 5' y 3' (es decir, cadena arriba y cadena abajo). Esta terminología se refiere a la posición relativa de los brazos de homología con respecto al inserto de ácido nucleico dentro del ácido nucleico donante exógeno. Los brazos de homología 5' y 3' corresponden a regiones dentro del locus *TTR* humanizado, que se denominan en el presente documento "secuencia diana 5'" y "secuencia diana 3'", respectivamente.

50

55 Un brazo de homología y una secuencia diana "corresponden" o son "correspondientes" entre sí cuando las dos regiones comparten un nivel suficiente de identidad de secuencia entre sí para actuar como sustratos para una reacción de recombinación homóloga. El término "homología" incluye secuencias de ADN que son idénticas o comparten identidad de secuencia con una secuencia correspondiente. La identidad de secuencia entre una secuencia diana dada y el brazo de homología correspondiente que se encuentra en el ácido nucleico donante exógeno puede ser cualquier grado de identidad de secuencia que permita que se produzca la recombinación homóloga. Por ejemplo, 60 la cantidad de identidad de secuencia compartida por el brazo de homología del ácido nucleico donante exógeno (o un fragmento del mismo) y la secuencia diana (o un fragmento de la misma) puede ser al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, de modo que las secuencias experimenten una recombinación homóloga. Por otra parte, una región correspondiente de homología entre el brazo de homología y la secuencia diana correspondiente puede tener cualquier longitud que sea suficiente para promover la recombinación homóloga. Los brazos de homología ilustrativos tienen entre aproximadamente 25 nucleótidos y aproximadamente 2,5

- kb de longitud, tienen entre aproximadamente 25 nucleótidos y aproximadamente 1,5 kb de longitud, o tienen entre aproximadamente 25 y aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, un brazo de homología determinado (o cada uno de los brazos de homología) y/o la secuencia diana correspondiente pueden comprender regiones de homología correspondientes que tienen entre aproximadamente 25-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450 o 450-500 nucleótidos de longitud, de modo que los brazos de homología tengan homología suficiente para sufrir recombinación homóloga con las secuencias diana correspondientes dentro del ácido nucleico diana. De manera alternativa, un brazo de homología determinado (o cada brazo de homología) y/o la secuencia diana correspondiente pueden comprender regiones de homología correspondientes que están entre aproximadamente 0,5 kb y aproximadamente 1 kb, aproximadamente 1 kb y aproximadamente 1,5 kb, aproximadamente 1,5 kb y aproximadamente 2 kb, o aproximadamente 2 kb y aproximadamente 2,5 kb de longitud. Por ejemplo, los brazos de homología pueden tener cada uno de ellos aproximadamente 750 nucleótidos de longitud. Los brazos de homología pueden ser simétricos (siendo ambos aproximadamente de la misma longitud) o pueden ser asimétricos (uno más largo que el otro).
- 15 Cuando se utiliza un agente nucleasa en combinación con un ácido nucleico donante exógeno, las secuencias diana 5' y 3' están ubicadas preferentemente en suficiente proximidad al sitio de escisión de nucleasa (por ejemplo, dentro de una distancia suficiente a la secuencia diana de la nucleasa) para promover la aparición de un suceso de recombinación homóloga entre las secuencias diana y los brazos de homología sobre una rotura monocatenaria (mella) o una rotura bicatenaria en el sitio de escisión de nucleasa. La expresión "sitio de escisión de nucleasa" incluye una secuencia de ADN en la que un agente nucleasa crea una mella o una rotura bicatenaria (por ejemplo, una proteína Cas9 complejada con un ARN guía). Las secuencias diana dentro del locus diana que corresponden a los brazos de homología 5' y 3' del ácido nucleico donante exógeno están "ubicadas en suficiente proximidad" a un sitio de escisión de nucleasa si la distancia es tal que promueve la aparición de un suceso de recombinación homóloga entre las secuencias diana 5' y 3' y los brazos de homología tras una rotura monocatenaria o una rotura bicatenaria en el sitio de escisión de nucleasa. Así pues, las secuencias diana correspondientes a los brazos de homología 5' y/o 3' del ácido nucleico donante exógeno pueden estar, por ejemplo, dentro de una distancia de al menos 1 nucleótido de un sitio de escisión de nucleasa dado o dentro de una distancia de al menos 10 nucleótidos a aproximadamente 1.000 nucleótidos de un sitio de escisión de nucleasa dado. A modo de ejemplo, el sitio de escisión de nucleasa puede estar inmediatamente adyacente a al menos una o ambas secuencias diana.
- 20 30 La relación espacial de las secuencias diana que corresponden a los brazos de homología del ácido nucleico donante exógeno y el sitio de escisión de nucleasa puede variar. Por ejemplo, las secuencias diana pueden estar ubicadas en 5' con respecto a un sitio de escisión de nucleasa, las secuencias diana pueden estar ubicadas en 3' con respecto al sitio de escisión de nucleasa o las secuencias diana pueden flanquear el sitio de escisión de nucleasa.
- 25 35 **(4) Otros reactivos de direccionamiento a TTR humana**

- La actividad de cualquier otro reactivo dirigido a TTR humana conocido o supuesto también se puede evaluar utilizando los animales no humanos divulgados en el presente documento. De forma similar, cualquier otra molécula puede examinarse para detectar actividad dirigida a TTR humana utilizando los animales no humanos divulgados en el presente documento. Los métodos para evaluar la actividad de un reactivo dirigido a TTR humana proporcionado por la invención se establecen en la reivindicación 10.
- 40 Los ejemplos de otros reactivos dirigidos a TTR humana incluyen oligonucleótidos antisentido (p. ej., ARNip o ARNhC) que actúan a través de ARN de interferencia (ARNi). Los oligonucleótidos antisentido (OAS) o ARN antisentido son cadenas sintéticas cortas de nucleótidos diseñadas para prevenir la expresión de una proteína diana mediante la unión selectiva al ARN que codifica la proteína diana evitando de este modo la traducción. Estos compuestos se unen al ARN con alta afinidad y selectividad mediante un emparejamiento de bases Watson-Crick bien caracterizado (hibridación). La interferencia de ARN (ARNi) es un mecanismo celular endógeno para controlar la expresión génica en el que pequeños ARN de interferencia (ARNip) que están unidos al complejo silenciador inducido por ARN (RISC) median la escisión del ARN mensajero diana (ARNm). Se conocen ejemplos de oligonucleótidos antisentido dirigidos a TTR humana. Véase, p. ej., Ackermann et al. (2012) Amyloid Suppl 1:43-44 y Coelho et al. (2013) N. Engl. J. Med. 369(9):819-829.
- 45 55 Otros reactivos dirigidos a TTR humana incluyen anticuerpos o proteínas de unión a antígenos diseñadas para unirse específicamente a un epítopo de TTR humana.

Otros reactivos dirigidos a TTR humana incluyen reactivos de moléculas pequeñas. Un ejemplo de dicho reactivo de molécula pequeña es tafamidis, que funciona mediante la estabilización cinética de la forma tetramérica correctamente plegada de la proteína transtirretina (TTR). Véase, p. ej., Hammarstrom et al. (2003) Science 299:713-716.

D. Administración de reactivos dirigidos a TTR humana a células o animales no humanos

- 60 Los métodos divulgados, pero no reivindicados, en el presente documento puede comprender introducir en una célula o animal no humano diversas moléculas (por ejemplo, reactivos dirigidos a TTR humana tales como moléculas o complejos terapéuticos), incluidos ácidos nucleicos, proteínas, complejos de ácido nucleico-proteína o complejos de

- proteínas. "Introducir" incluye presentar a la célula o al animal no humano la molécula (por ejemplo, ácido nucleico o proteína) de tal manera que tenga acceso al interior de la célula o al interior de las células dentro del animal no humano. La introducción se puede lograr por cualquier medio, y dos o más de los componentes (por ejemplo, dos de los componentes o todos los componentes) se pueden introducir en la célula o animal no humano de manera simultánea o secuencial en cualquier combinación. Por ejemplo, se puede introducir una proteína Cas en una célula o en un animal no humano antes de la introducción de un ARN guía, o se puede introducir después de la introducción del ARN guía. Como otro ejemplo, se puede introducir un ácido nucleico donante exógeno antes de la introducción de una proteína Cas y un ARN guía, o se puede introducir después de la introducción de la proteína Cas y el ARN guía (p. ej., el ácido nucleico donante exógeno se puede administrar aproximadamente 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 36, 48 o 72 horas antes o después de la introducción de la proteína Cas y el ARN guía). Véase, p. ej., los documentos US 2015/0240263 y US 2015/0110762. Adicionalmente, dos o más de los componentes pueden introducirse en la célula o en el animal no humano mediante el mismo método de suministro o mediante métodos de suministro diferentes. De forma similar, dos o más de los componentes pueden introducirse en un animal no humano mediante la misma vía de administración o diferentes vías de administración.
- En algunos métodos, los componentes de un sistema CRISPR/Cas se introducen en una célula o animal no humano. Se puede introducir un ARN guía en una célula o animal no humano en forma de ARN (p. ej., ARN transcrit *in vitro*) o en forma de ADN que codifica el ARN guía. Cuando se introduce en forma de ADN, el ADN que codifica un ARN guía puede unirse operativamente a un promotor activo en una célula del animal no humano. Por ejemplo, se puede administrar un ARN guía a través de AAV y se puede expresar *in vivo* bajo un promotor de U6. Dichos ADN pueden estar en una o más construcciones de expresión. Por ejemplo, dichas construcciones de expresión pueden ser componentes de una única molécula de ácido nucleico. De manera alternativa, se pueden separar en cualquier combinación entre dos o más moléculas de ácido nucleico (es decir, los ADN que codifican uno o más ARN de CRISPR y los ADN que codifican uno o más ARNtracr pueden ser componentes de una molécula de ácido nucleico separada).
- Del mismo modo, las proteínas Cas se pueden proporcionar en cualquier forma. Por ejemplo, una proteína Cas se puede proporcionar en forma de una proteína, tal como una proteína Cas complejada con un ARNg. De manera alternativa, una proteína Cas se puede proporcionar en forma de un ácido nucleico que codifica la proteína Cas, tal como un ARN (p. ej., ARN mensajero (ARNm)) o ADN. Opcionalmente, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede tener codones optimizados para una traducción eficaz en proteína en una célula u organismo particular. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede modificarse para sustituir codones que tengan una mayor frecuencia de uso en una célula de mamífero, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata o cualquier otra célula hospedadora de interés, en comparación con la secuencia polinucleotídica de origen natural. Cuando un ácido nucleico que codifica la proteína Cas se introduce en un animal no humano, la proteína Cas puede expresarse de forma transitoria, condicional o constitutiva en una célula del animal no humano.
- Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas Cas o ARN guía pueden estar unidos operativamente a un promotor en una construcción de expresión. Las construcciones de expresión incluyen cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen u otra secuencia de un ácido nucleico de interés (p. ej., un gen Cas) y que puede transferir dicha secuencia de un ácido nucleico de interés a una célula diana. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la proteína Cas puede estar en un vector que comprende un ADN que codifica uno o más ARNg. De manera alternativa, puede estar en un vector o plásmido que está separado del vector que comprende el ADN que codifica uno o más ARNg. Los promotores adecuados que pueden usarse en una construcción de expresión incluyen promotores activos, por ejemplo, en una o más de una célula eucariota, una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula de mamífero no humano, una célula de roedor, una célula de ratón, una célula de rata, una célula de hámster, una célula de conejo, una célula pluripotente, una célula madre embrionaria (ES), una célula madre adulta, una célula progenitora de desarrollo restringido, una célula madre pluripotente inducida (iPS) o un embrión en fase de una sola célula. Dichos promotores pueden ser, por ejemplo, promotores condicionales, promotores inducibles, promotores constitutivos o promotores específicos de tejido. Opcionalmente, el promotor puede ser un promotor bidireccional que dirige la expresión tanto de una proteína Cas en una dirección como de un ARN guía en la otra dirección. Dichos promotores bidireccionales pueden consistir en (1) un promotor de Pol III completo, convencional, unidireccional que contiene 3 elementos de control externo: un elemento de secuencia distal (DSE), un elemento de secuencia proximal (PSE) y una caja TATA; y (2) un segundo promotor de Pol III básico que incluye un PSE y una caja TATA fusionados al extremo 5' del DSE en orientación inversa. Por ejemplo, en el promotor de H1, el DSE es adyacente al PSE y a la caja TATA, y el promotor puede volverse bidireccional creando un promotor híbrido en el que la transcripción en la dirección inversa se controla añadiendo un PSE y caja TATA derivada del promotor de U6. Véase, p. ej., el documento US 2016/0074535. El uso de un promotor bidireccional para expresar genes que codifican una proteína Cas y un ARN guía permite simultáneamente la generación de cassetes de expresión compactos para facilitar el suministro.
- Las moléculas (por ejemplo, proteínas Cas o ARN guía) introducidas en la célula o animal no humano se pueden proporcionar en composiciones que comprenden un vehículo que aumenta la estabilidad de las moléculas introducidas (por ejemplo, prolongando el período en condiciones dadas de almacenamiento (por ejemplo, -20 °C, 4 °C o temperatura ambiente) para las cuales los productos de degradación permanecen por debajo de un umbral, tal como por debajo del 0,5 % en peso del ácido nucleico o proteína de partida; o que aumenta la estabilidad *in vivo*). Los ejemplos no limitantes de tales vehículos incluyen microesferas de polí(ácido láctico) (PLA), microesferas de polí(ácido

D,L-láctico-coglicólico) (PLGA), liposomas, micelas, micelas inversas, cocleatos lipídicos y microtúbulos lipídicos.

En el presente documento se divultan diversos métodos y composiciones para permitir la introducción de un ácido nucleico o proteína en una célula o animal no humano. Se conocen métodos para introducir ácidos nucleicos en diversos tipos de células e incluyen, por ejemplo, métodos de transfección estable, métodos de transfección transitoria y métodos mediados por virus.

Los protocolos de transfección así como los protocolos para introducir secuencias de ácido nucleico en las células pueden variar. Los métodos de transfección no limitativos incluyen métodos de transfección basados en química que utilizan liposomas; nanopartículas; fosfato cálcico (Graham et al. (1973) *Virology* 52 (2): 456-67, Bacchetti et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (4): 1590-4 y Kriegler, M (1991). *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. Nueva York: W. H. Freeman and Company, págs. 96-97); dendrímeros; o polímeros catiónicos tales como DEAE dextrano o polietilenimina. Los métodos no químicos incluyen electroporación, sonoporación y transfección óptica. La transfección basada en partículas incluye el uso de una pistola genética o transfección asistida por imán (Bertram (2006) *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7, 277-28). También se pueden usar métodos virales para la transfección.

La introducción de ácidos nucleicos o proteínas en una célula también puede estar mediada por electroporación, por inyección intracitoplasmática, por infección vírica, por adenovirus, por virus adenoasociado, por lentivirus, por retrovirus, por transfección, por transfección mediada por lípidos o por nucleofección. La nucleofección es una tecnología de electroporación mejorada que permite que los sustratos de ácidos nucleicos se suministren no solo al citoplasma sino también a través de la membrana nuclear y al núcleo. Adicionalmente, el uso de nucleofección en los métodos divulgados en el presente documento normalmente requiere muchas menos células que la electroporación regular (por ejemplo, sólo aproximadamente 2 millones en comparación con 7 millones mediante electroporación regular). En un ejemplo, la nucleofección se realiza utilizando el sistema LONZA® NUCLEOFECTOR™.

La introducción de ácidos nucleicos o proteínas en una célula (por ejemplo, un cigoto) también se puede lograr mediante microinyección. En cigotos (es decir, embriones en fase unicelular), la microinyección puede realizarse en el pronúcleo materno y/o paterno o en el citoplasma. Si la microinyección se realiza solo en el pronúcleo, es preferible el pronúcleo paterno por su mayor tamaño. La microinyección de un ARNm se realiza preferentemente en el citoplasma (por ejemplo, para suministrar el ARNm directamente en la maquinaria de traducción), mientras que es preferible la microinyección de una proteína Cas o un polinucleótido que codifica una proteína Cas o que codifica un ARN en el núcleo/pronúcleo. De manera alternativa, la microinyección se puede realizar mediante inyección tanto en el núcleo/pronúcleo como en el citoplasma: primero se puede introducir una aguja en el núcleo/pronúcleo y se puede inyectar una primera cantidad, y mientras se retira la aguja del embrión en fase unicelular se puede inyectar una segunda cantidad en el citoplasma. Si se inyecta una proteína Cas en el citoplasma, la proteína Cas comprende preferentemente una señal de localización nuclear para asegurar el suministro en el núcleo/pronúcleo. Los métodos para llevar a cabo la microinyección son bien conocidos. Véase, p. ej., Nagy et al. (Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R., 2003, *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); véase también Meyer et al. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:15022-15026 y Meyer et al. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:9354-9359.

Otros métodos para introducir ácido nucleico o proteínas en una célula o animal no humano pueden incluir, por ejemplo, suministro de vectores, suministro mediado por partículas, suministro mediado por exosomas, suministro mediado por nanopartículas lipídicas, suministro mediado por péptidos que penetran en las células o suministro mediado por dispositivo implantable. Como ejemplos específicos, se puede introducir un ácido nucleico o una proteína en una célula o un animal no humano en un vehículo tal como una microesfera de polí(ácido láctico) (PLA), una microesfera de polí(ácido D,L-láctico-coglicólico) (PLGA), un liposoma, una micela, una micela inversa, un cocleato lipídico o un microtúbulo lipídico. Algunos ejemplos específicos de suministro a un animal no humano incluyen suministro hidrodinámico, suministro mediado por virus (p. ej., suministro mediado por virus adenoasociados (AAV) y suministro mediado por nanopartículas lipídicas.

La introducción de ácidos nucleicos y proteínas en células o animales no humanos se puede lograr mediante suministro hidrodinámico (HDD). El suministro hidrodinámico ha surgido como un método para el suministro de ADN intracelular *in vivo*. Para el suministro de genes a las células parenquimatosas, solo es necesario inyectar secuencias de ADN esenciales a través de un vaso sanguíneo seleccionado, eliminando los problemas de seguridad asociados con los vectores víricos y sintéticos actuales. Cuando se inyecta en el torrente sanguíneo, el ADN es capaz de llegar a las células de los diferentes tejidos accesibles a la sangre. El suministro hidrodinámico emplea la fuerza generada por la inyección rápida de un gran volumen de solución en la sangre incompresible en la circulación para superar las barreras físicas del endotelio y las membranas celulares que impiden que compuestos grandes e impermeables a la membrana entren en las células parenquimatosas. Además del suministro de ADN, este método es útil para el suministro intracelular eficaz de ARN, proteínas y otros compuestos pequeños *in vivo*. Véase, p. ej., Bonamassa et al. (2011) *Pharm. Res.* 28(4):694-701.

La introducción de ácidos nucleicos también se puede lograr mediante suministro mediado por virus, tal como el suministro mediado por AAV o el suministro mediado por lentivirus. Otros virus/vectores víricos ilustrativos incluyen retrovirus, adenovirus, virus vaccinia, poxvirus y virus del herpes simple. Los virus pueden infectar células en división,

- células que no están en división o tanto células en división como células que no están en división. Los virus pueden integrarse en el genoma del hospedador o, como alternativa, no integrarse en el genoma del hospedador. Estos virus también pueden diseñarse por ingeniería genética para que tengan una inmunidad reducida. Los virus pueden ser competentes en replicación o pueden tener replicación defectuosa (por ejemplo, defectos en uno o más genes necesarios para rondas adicionales de replicación y/o empaquetamiento del virión). Los virus pueden causar expresión transitoria, expresión duradera (p. ej., al menos 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses o 3 meses) o expresión permanente (p. ej., de Cas9 y/o ARNg). Los títulos de virus ilustrativos (por ejemplo, títulos de AAV) incluyen 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , y 10^{16} genomas vectoriales/ml.
- 5 10 El genoma de AAV de ADNmc consiste en dos marcos de lectura abiertos, Rep y Cap, flanqueados por dos repeticiones terminales invertidas que permiten la síntesis de la cadena de ADN complementaria. Cuando se construye un plásmido de transferencia de AAV, el transgén se coloca entre las dos ITR y se pueden suministrar Rep y Cap en *trans*. Además de Rep y Cap, AAV puede requerir un plásmido auxiliar que contenga genes de adenovirus. Estos genes (E4, E2a y VA) median la replicación de AAV. Por ejemplo, el plásmido de transferencia, Rep/Cap y el plásmido auxiliar pueden introducirse por transfección en células HEK293 que contienen el gen de adenovirus E1+ para producir partículas de AAV infecciosas. De manera alternativa, el Rep, el Cap y los genes auxiliares de adenovirus se pueden combinar en un solo plásmido. Se pueden utilizar células y métodos de empaquetamiento similares para otros virus, tales como retrovirus.
- 15 20 Se han identificado múltiples serotipos de AAV. Estos serotipos difieren en los tipos de células que infectan (es decir, su tropismo), permitiendo la transducción preferente de tipos celulares específicos. Los serotipos para el tejido del SNC incluyen AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV8 y AAV9. Los serotipos para el tejido cardíaco incluyen AAV1, AAV8 y AAV9. Los serotipos para el tejido renal incluyen AAV2. Los serotipos para el tejido pulmonar incluyen AAV4, AAV5, AAV6 y AAV9. Los serotipos para el tejido del páncreas incluyen AAV8. Los serotipos de células fotorreceptoras incluyen AAV2, AAV5 y AAV8. Los serotipos para el tejido del epitelio pigmentario de la retina incluyen AAV1, AAV2, AAV4, AAV5 y AAV8. Los serotipos para el tejido del músculo esquelético incluyen AAV1, AAV6, AAV7, AAV8 y AAV9. Los serotipos para el tejido hepático incluyen AAV7, AAV8 y AAV9 y, particularmente, AAV8.
- 25 30 El tropismo se puede refinar aún más mediante pseudotipificación, que es la mezcla de una cápside y un genoma de diferentes serotipos virales. Por ejemplo, AAV2/5 indica un virus que contiene el genoma del serotipo 2 empaquetado en la cápside del serotipo 5. El uso de virus pseudotipados puede mejorar la eficacia de la transducción, además de alterar el tropismo. También se pueden utilizar cápsides híbridas derivadas de diferentes serotipos para alterar el tropismo viral. Por ejemplo, AAV-DJ contiene una cápside híbrida de ocho serotipos y presenta una alta infectividad en una amplia gama de tipos de células *in vivo*. AAV-DJ8 es otro ejemplo que muestra las propiedades de AAV-DJ pero con una mayor captación por el cerebro. Los serotipos de AAV también pueden modificarse mediante mutaciones. Los ejemplos de modificaciones mutacionales de AAV2 incluyen Y444F, Y500F, Y730F y S662V. Los ejemplos de modificaciones mutacionales de AAV3 incluyen Y705F, Y731F y T492V. Los ejemplos de modificaciones mutacionales de AAV6 incluyen S663V y T492V. Otras variantes de AAV pseudotipadas/modificadas incluyen AAV2/1, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/8, AAV2/9, AAV2.5, AAV8.2 y AAV/SASTG.
- 35 40 45 Para acelerar la expresión transgénica, se pueden utilizar variantes de AAV autocomplementarias (scAAV). Debido a que el AAV depende de la maquinaria de replicación del ADN de la célula para sintetizar la cadena complementaria del genoma de ADN monocatenario del AAV, la expresión del transgén puede retrasarse. Para abordar este retraso, se puede utilizar scAAV que contiene secuencias complementarias que son capaces de hibridarse espontáneamente tras la infección, eliminando la necesidad de síntesis de ADN de la célula hospedadora. Sin embargo, también se pueden utilizar vectores AAV monocatenarios (ssAAV).
- 50 55 Para aumentar la capacidad de empaquetamiento, los transgenes más largos pueden dividirse entre dos plásmidos de transferencia de AAV, el primero con un donante de empalme 3' y el segundo con un aceptor de empalme 5'. Tras la coinfección de una célula, estos virus forman concatámeros, se unen y se puede expresar el transgén de longitud completa. Aunque esto permite una expresión transgénica más prolongada, la expresión es menos eficiente. Métodos similares para aumentar la capacidad utilizan recombinación homóloga. Por ejemplo, un transgén se puede dividir entre dos plásmidos de transferencia pero con una superposición sustancial de secuencias de modo que la coexpresión induce recombinación homóloga y expresión del transgén de longitud completa.
- 60 65 La introducción de ácidos nucleicos y proteínas también se puede lograr mediante el suministro mediado por nanopartículas lipídicas (LNP). Por ejemplo, el suministro mediado por LNP se puede utilizar para suministrar una combinación de ARNm de Cas y ARN guía o una combinación de proteína Cas y ARN guía. El suministro a través de estos métodos da como resultado una expresión transitoria de Cas y los lípidos biodegradables mejoran la eliminación, mejoran la tolerabilidad y disminuyen la inmunogenicidad. Las formulaciones de lípidos pueden proteger las moléculas biológicas de la degradación y al mismo tiempo mejorar su captación celular. Las nanopartículas lipídicas son partículas que comprenden una pluralidad de moléculas lipídicas asociadas físicamente entre sí mediante fuerzas intermoleculares. Estas incluyen microesferas (incluidas vesículas unilaminares y multilaminares, por ejemplo, liposomas), una fase dispersa en una emulsión, micelas o una fase interna en una suspensión. Estas nanopartículas lipídicas se pueden utilizar para encapsular uno o más ácidos nucleicos o proteínas para su suministro. Las formulaciones que contienen lípidos catiónicos son útiles para suministrar polianiones tales como ácidos nucleicos.

Otros lípidos que pueden incluirse son lípidos neutros (es decir, lípidos sin carga o zwitteriónicos), lípidos aniónicos, lípidos auxiliares que mejoran la transfección y lípidos sigilosos que aumentan el tiempo durante el cual las nanopartículas pueden existir *in vivo*. Pueden encontrarse ejemplos de lípidos catiónicos adecuados, lípidos neutros, lípidos aniónicos, lípidos auxiliares y lípidos sigilosos en el documento WO 2016/010840 A1. Una nanopartícula lipídica 5 ilustrativa puede comprender un lípido catiónico y uno o más componentes diferentes. En un ejemplo, el otro componente puede comprender un lípido auxiliar tal como colesterol. En otro ejemplo, los otros componentes pueden comprender un lípido auxiliar tal como colesterol y un lípido neutro tal como DSPC. En otro ejemplo, los otros componentes pueden comprender un lípido auxiliar tal como colesterol, un lípido neutro opcional tal como DSPC y un lípido sigiloso tal como S010, S024, S027, S031 o S033.

10 El LNP puede contener uno, más o todos los siguientes: (i) un lípido para encapsulación y escape endosómico; (ii) un lípido neutro para la estabilización; (iii) un lípido auxiliar para la estabilización; y (iv) un lípido sigiloso. Véase, p. ej., Finn et al. (2018) Cell Reports 22:1-9 y el documento WO 2017/173054 A1. En ciertos LNP, la carga puede incluir un ARN guía o un ácido nucleico que codifica un ARN guía. En ciertos LNP, la carga puede incluir un ARNm que codifica 15 una nucleasa Cas, tal como Cas9, y un ARN guía o un ácido nucleico que codifica un ARN guía.

El lípido para la encapsulación y el escape endosómico puede ser un lípido catiónico. El lípido también puede ser un lípido biodegradable, tal como un lípido ionizable biodegradable. Un ejemplo de un lípido adecuado es el lípido A o LP01, que es octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-20 (dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo, también denominado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo. Véase, p. ej., Finn et al. (2018) Cell Reports 22:1-9 y el documento WO 2017/173054 A1. Otro ejemplo de un lípido adecuado es el lípido B, que es ((5-((dimetilamino)metil)-1,3-fenilen)bis(oxi))bis(octano-8,1-diil)bis(decanoato), también denominado ((5-((dimetilamino)metil)-1,3-fenilen)bis(oxi))bis(octano-8,1-diil)bis(decanoato). Otro ejemplo de un lípido adecuado es el lípido C, que es 2-((4-((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)hexadecanoil)oxi)propano-1,3-diil(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-bis(octadeca-9,12-dienoato). Otro ejemplo de un lípido adecuado es el lípido D, que es 3-octilundecanoato de 3-((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)-13-(octanoiloxi)tridecilo. Otros lípidos adecuados incluyen 4-((dimetilamino)butanoato de heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (también conocido como Dlin-MC3-DMA (MC3))).

30 Algunos de estos lípidos adecuados para su uso en los LNP descritos en el presente documento son biodegradables *in vivo*. Por ejemplo, las LNP que comprenden dicho lípido incluyen aquellas en las que al menos el 75 % del lípido se elimina del plasma en 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7 o 10 días. Como otro ejemplo, al menos el 50 % de la LNP se elimina del plasma en 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7 o 10 días.

35 Dichos lípidos pueden ser ionizables dependiendo del pH del medio en el que se encuentran. Por ejemplo, en un medio ligeramente ácido, los lípidos pueden estar protonados y por tanto tener una carga positiva. Por el contrario, en un medio ligeramente básico, tal como, por ejemplo, sangre donde el pH es aproximadamente 7,35, es posible que los lípidos no estén protonados y, por tanto, no tengan carga. En algunas realizaciones, los lípidos pueden protonarse a un pH de al menos aproximadamente 9, 9,5 o 10. La capacidad de dicho lípido para soportar una carga está 40 relacionada con su pKa intrínseco. Por ejemplo, el lípido puede, independientemente, tener un pKa en el intervalo de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2.

45 Los lípidos neutros funcionan para estabilizar y mejorar el procesamiento de las LNP. Los ejemplos de lípidos neutros adecuados incluyen una diversidad de lípidos neutros, no cargados o zwitteriónicos. Los ejemplos de fosfolípidos neutros adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, 5-heptadecilbenceno-1,3-diol (resorcinol), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfocolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), fosfatidilcolina (PLPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), dilauriloilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 1-miristoil-2-palmitoil fosfatidilcolina (MPPC), 1-pahnitoil-2-miristoil fosfatidilcolina (PMPC), 1-palmitoil-2-estearyl fosfatidilcolina (PSPC), 1,2-diaracidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DBPC), 1-estearoil-2-palmitoil fosfatidilcolina (SPPC), 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC), palmitoiloleoil fosfatidilcolina (POPC), lisofosfatidilcolina, dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), dilinoleoilfosfatidilcolina diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), palmitoiloleoil fosfatidiletanolamina (POPE), lisofosfatidiletanolamina y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el fosfolípido neutro se puede seleccionar del grupo que consiste en diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) y dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE).

55 Los lípidos auxiliares incluyen lípidos que mejoran la transfección. El mecanismo por el cual el lípido auxiliar mejora la transfección puede incluir mejorar la estabilidad de las partículas. En ciertos casos, el lípido auxiliar puede mejorar la fusogenicidad de la membrana. Los lípidos auxiliares incluyen esteroides, esteroles y alquilresorcinales. Los ejemplos de lípidos auxiliares adecuados incluyen colesterol, 5-heptadeciresorcinol y hemisuccinato de colesterol. En un ejemplo, el lípido auxiliar puede ser colesterol o hemisuccinato de colesterol.

60 Los lípidos sigilosos incluyen lípidos que alteran el tiempo durante el que pueden existir las nanopartículas *in vivo*. Los lípidos sigilosos pueden ayudar en el proceso de formulación, por ejemplo, al reducir la agregación de partículas y controlar el tamaño de las partículas. Los lípidos sigilosos pueden modular las propiedades farmacocinéticas del LNP. Los lípidos sigilosos adecuados incluyen lípidos que tienen un grupo principal hidrófilo unido a una fracción lipídica.

- El grupo principal hidrófilo de lípido sigiloso puede comprender, por ejemplo, una fracción polimérica seleccionada de polímeros basados en PEG (a veces denominado polí(óxido de etileno)), poli(oxazolina), poli(alcohol vinílico), poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poliaminoácidos y poli N-(2-hidroxipropil)metacrilamida. El término PEG significa cualquier polietilenglicol u otro polímero de polialquilenéter. En ciertas formulaciones de LNP, el PEG es un PEG-2K, también denominado PEG 2000, que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 daltons. Véase, p. ej., el documento WO 2017/173054 A1.
- 5 La fracción lipídica del lípido sigiloso puede derivar, por ejemplo, de diacilglicerol o diacilglicamida, incluyendo los que comprenden un grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida que tiene una longitud de cadena alquilo que comprende independientemente de aproximadamente C4 a aproximadamente C40 átomos de carbono saturados o insaturados, en donde la cadena puede comprender uno o más grupos funcionales tales como, por ejemplo, una amida o un éster. El grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida puede comprender además uno o más grupos alquilo sustituidos.
- 10 15 Como ejemplo, el lípido sigiloso puede seleccionarse entre PEG-dilaurooilglicerol, PEG-dimiristoilglicerol (PEG-DMG), PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-diestearoilglicerol (PEG-DSPE), PEG-dilaurylglicamida, PEG-dimiristylglicamida, PEG-dipalmitoilglucamida y PEG-diestearoilglucamida, PEG-colesterol (1-[8'-(Colest-5-en-3[β]-oxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoiil-[omega]-metil-polí(etilenglicol), PEG-DMB (3,4-ditetradecoxilbencil-[omega]-metil-polí(etilenglicol)éter), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DMG), 20 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DSPE), 1,2-diestearoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol (PEG2k-DSG), polí(etilenglicol)-2000-dimetacrilato (PEG2k-DMA) y 1,2-diestearoilxipropil-3-amino-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG2k-DSA). En un ejemplo particular, el lípido sigiloso puede ser PEG2k-DMG.
- 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450

aproximadamente 1:5, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:1, de aproximadamente 10:1 o de aproximadamente 1:10. De manera alternativa, la formulación de LNP puede incluir una relación de ácido nucleico donante exógeno a ácido nucleico de ARNg de aproximadamente 1:10, 25:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:10 o 1:25.

- 5 Un ejemplo específico de una LNP adecuada tiene una relación de nitrógeno a fosfato (N/P) de 4,5 y contiene lípidos catiónicos biodegradables, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar 45:44:9:2. El lípido catiónico biodegradable puede ser octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo, también denominado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo. Véase, p. ej., Finn et al. (2018) *Cell Reports* 22:1-9. El ARNm de Cas9 puede estar en una relación de 1:1 en peso con respecto al ARN guía. Otro ejemplo específico de una LNP adecuada contiene Dlin-MC3-DMA (MC3), colesterol, DSPC y PEG-DMG en una relación molar 50:38,5:10:1,5.
- 10 Otro ejemplo específico de una LNP adecuada tiene una relación de nitrógeno a fosfato (N/P) de 6 y contiene lípidos catiónicos biodegradables, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar 50:38:9:3. El lípido catiónico biodegradable puede ser octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo, también denominado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo. El ARNm de Cas9 puede estar en una relación de 1:2 en peso con respecto al ARN guía.
- 15 20 El modo de administración se puede seleccionar para disminuir la inmunogenicidad. Por ejemplo, una proteína Cas y un ARNg pueden suministrarse mediante diferentes modos (por ejemplo, administración bimodal). Estos diferentes modos pueden conferir diferentes propiedades farmacodinámicas o farmacocinéticas a la molécula suministrada al sujeto (por ejemplo, Cas o ácido nucleico que la codifica, ARNg o ácido nucleico que lo codifica o molde de reparación/ácido nucleico donante exógeno). Por ejemplo, los diferentes modos pueden dar lugar a una distribución diferente en el tejido, diferente semivida o diferente distribución temporal. Algunos modos de suministro (por ejemplo, el suministro de un vector de ácido nucleico que persiste en una célula mediante replicación autónoma o integración genómica) dan como resultado una expresión y presencia más persistente de la molécula, mientras que otros modos de suministro son transitorios y menos persistentes (p. ej., suministro de un ARN o una proteína). El suministro de proteínas Cas de forma más transitoria, por ejemplo como ARNm o proteína, puede garantizar que el complejo Cas/ARNg solo está presente y activo durante un corto período de tiempo y puede reducir la inmunogenicidad causada por los péptidos de la enzima Cas de origen bacteriano que se presentan en la superficie de la célula mediante moléculas del MHC. Este suministro transitorio también puede reducir la posibilidad de modificaciones fuera de la diana.
- 25 30 35 40 45 50 55 60 65 La administración *in vivo* puede ser por cualquier vía adecuada, incluyendo, por ejemplo, parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. Los modos sistémicos de administración incluyen, por ejemplo, las vías oral y parenteral. Los ejemplos de vías parenterales incluyen las vías intravenosa, intraarterial, intraósea, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intranasal e intraperitoneal. Un ejemplo específico es la infusión intravenosa. La instilación nasal y la inyección intravítreas son otros ejemplos específicos. Los modos locales de administración incluyen, por ejemplo, las vías intratecal, intracerebroventricular, intraparenquimatosa (p. ej., suministro intraparenquimatoso localizado en el cuerpo estriado (p. ej., en el núcleo caudado o en el putamen), corteza cerebral, giro precentral, hipocampo (por ejemplo, en el giro dentado o región CA3), corteza temporal, amígdala, corteza frontal, tálamo, cerebelo, médula, hipotálamo, tectum, tegamento o sustancia negra), intraocular, intraorbital, subconjuntiva, intravítreas, subretiniana y transescleral. Cantidades significativamente más pequeñas de los componentes (en comparación con enfoques sistémicos) pueden ejercer un efecto cuando se administran localmente (por ejemplo por vía intraparenquimatoso o intravítreo) en comparación con cuando se administran sistémicamente (por ejemplo, por vía intravenosa). Los modos de administración locales también pueden reducir o eliminar la incidencia de efectos secundarios potencialmente tóxicos que pueden ocurrir cuando se administran sistémicamente cantidades terapéuticamente eficaces de un componente. La administración *in vivo* puede ser por cualquier vía adecuada, incluyendo, por ejemplo, parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. Un ejemplo específico es la infusión intravenosa. Las composiciones que comprenden los ARN guía y/o las proteínas Cas (o ácidos nucleicos que codifican los ARN guía y/o las proteínas Cas) se pueden formular usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares farmacéuticamente aceptables. La formulación puede depender de la vía de administración elegida. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que el vehículo, diluyente, excipiente o auxiliar es compatible con los demás ingredientes de la formulación y no sustancialmente perjudicial para el receptor. La frecuencia de administración y el número de dosis pueden depender de la semivida de los ácidos nucleicos donantes exógenos, ARN guía o proteínas Cas (o ácidos nucleicos que codifican los ARN guía o proteínas Cas) y la vía de administración, entre otros factores. La introducción de ácidos nucleicos o proteínas en la célula o en animal no humano se puede realizar una o varias veces durante un período de tiempo. Por ejemplo, la introducción se puede realizar al menos dos veces durante un período de tiempo, al menos tres veces durante un período de tiempo, al menos cuatro veces durante un período de tiempo, al menos cinco veces durante un período de tiempo, al menos seis veces durante un período de tiempo, al menos siete veces durante un período de tiempo, al menos ocho veces durante

un período de tiempo, al menos nueve veces durante un período de tiempo, al menos diez veces durante un período de tiempo, al menos once veces, al menos doce veces durante un período de tiempo, al menos trece veces durante un período de tiempo, al menos catorce veces durante un período de tiempo, al menos quince veces durante un período de tiempo, al menos diecisésis veces durante un período de tiempo, al menos diecisiete veces durante un período de tiempo, al menos dieciocho veces durante un período de tiempo, al menos diecinueve veces durante un período de tiempo o al menos veinte veces durante un período de tiempo.

E. Medición del suministro, actividad o eficacia de los reactivos dirigidos a TTR humana *in vivo* o *ex-vivo*

10 La invención proporciona métodos para evaluar la actividad de un reactivo dirigido a TTR humana *in vivo* como se define en la reivindicación 10.

Los métodos divulgados, pero no reivindicados, en el presente documento pueden comprender además detectar o medir la actividad de reactivos dirigidos a TTR humana. Por ejemplo, si el reactivo dirigido a TTR humana es un reactivo de edición del genoma (por ejemplo, CRISPR/Cas diseñado para dirigirse al locus *TTR* humano), la medición puede comprender la evaluación del locus *TTR* humanizado con respecto a las modificaciones.

20 Se pueden usar diversos métodos para identificar células que tienen una modificación genética dirigida. La etapa de cribado puede comprender un ensayo cuantitativo para evaluar la modificación del alelo (MOA) de un cromosoma progenitor. Por ejemplo, el ensayo cuantitativo puede llevarse a cabo por una PCR cuantitativa, tal como una PCR a tiempo real (qPCR). La PCR a tiempo real puede utilizar un primer conjunto cebador que reconoce el locus diana y un segundo conjunto cebador que reconoce un locus de referencia no dirigido. El conjunto cebador puede comprender una sonda fluorescente que reconoce la secuencia amplificada. Otros ejemplos de ensayos cuantitativos adecuados incluyen hibridación *in situ* mediada por fluorescencia (FISH), hibridación genómica comparativa, amplificación isotérmica del ADN, hibridación cuantitativa con una o más sondas inmovilizadas, sondas INVADER®, balizas moleculares TAQMAN® o la tecnología de sondas ECLIPSE™ (véase, p. ej., el documento US 2005/0144655).

30 También se puede utilizar para el cribado la secuenciación de última generación (NGS). La secuenciación de última generación también puede denominarse "NGS" o "secuenciación masiva en paralelo" o "secuenciación de alto rendimiento". La NGS se puede utilizar como herramienta de cribado además de los ensayos MOA para definir la naturaleza exacta de la modificación genética dirigida y si es uniforme entre los tipos de células, tejidos u órganos.

35 La evaluación de la modificación del locus *TTR* humanizado en un animal no humano puede estar en cualquier tipo de célula de cualquier tejido u órgano. Por ejemplo, la evaluación puede realizarse en múltiples tipos de células del mismo tejido u órgano o en células de múltiples ubicaciones dentro del tejido u órgano. Esto puede proporcionar información sobre qué tipos de células dentro de un tejido u órgano diana están estableciéndose como diana o qué secciones de un tejido u órgano están siendo alcanzadas por el reactivo dirigido a TTR humana. Como otro ejemplo, la evaluación puede realizarse en múltiples tipos de tejido o en múltiples órganos. En métodos en los que se está estableciendo como diana un tejido, órgano o tipo de célula particular, esto puede proporcionar información sobre la eficacia con la que se establece como diana ese tejido u órgano y si existen efectos fuera de la diana en otros tejidos u órganos.

40 Si el reactivo está diseñado para inactivar el locus *TTR* humanizado, afectar a la expresión del locus *TTR* humanizado, impedir la traducción del ARNm de *TTR* humanizado o eliminar la proteína *TTR* humanizada, la medición puede comprender la evaluación del ARNm de *TTR* humanizado o la expresión de la proteína. Esta medición puede realizarse dentro del hígado o en tipos de células o regiones particulares dentro del hígado, o puede implicar la medición de los niveles séricos de proteína *TTR* humanizada secretada.

50 La producción y secreción de la proteína *TTR* humanizada se puede evaluar por cualquier medio conocido. Por ejemplo, la expresión se puede evaluar midiendo los niveles del ARNm codificado en el hígado del animal no humano o los niveles de la proteína codificada en el hígado del animal no humano usando ensayos conocidos. La secreción de la proteína *TTR* humanizada se puede evaluar midiendo los niveles en plasma o niveles en suero de la proteína *TTR* humanizada codificada en el animal no humano usando ensayos conocidos.

55 IV. Métodos para producir roedores que comprenden un locus TTR humanizado

La invención proporciona un método para producir el roedor reivindicado como se define en la reivindicación 21.

60 Se divulan diversos métodos, pero no se reivindican, para producir un animal no humano que comprende un locus *TTR* humanizado como se divulga en otra parte del presente documento. Cualquier método o protocolo conveniente para producir un organismo modificado genéticamente es adecuado para producir dicho animal no humano modificado genéticamente. Véase, p. ej., Cho et al. (2009) Current Protocols in Cell Biology 42:19.11.1-19.11.22 y Gama Sosa et al. (2010) Brain Struct. Funct. 214(2-3):91-109. Estos animales no humanos modificados genéticamente pueden generarse, por ejemplo, a través de la activación genética en un locus *Ttr* diana.

65 Por ejemplo, un método divulgado, pero no reivindicado, para producir un animal no humano que comprende un locus

- 5 *TTR* humanizado puede comprender: (1) modificar el genoma de una célula pluripotente para que comprenda el locus *TTR* humanizado; (2) identificar o seleccionar la célula pluripotente modificada genéticamente que comprende el locus *TTR* humanizado; (3) introducir la célula pluripotente modificada genéticamente en un embrión hospedador animal no humano; y (4) implantar y gestar el embrión hospedador en una madre subrogada. Opcionalmente, el embrión hospedador que comprende una célula pluripotente modificada (por ejemplo, una célula ES no humana) puede incubarse hasta la fase de blastocisto antes de implantarse y gestarse en la madre subrogada para producir un animal no humano F0. La madre subrogada entonces puede producir un animal no humano de generación F0 que comprende el locus *TTR* humanizado.
- 10 Los métodos pueden comprender además identificar una célula o animal que tiene un locus genómico diana modificado (es decir, un locus *TTR* humanizado). Se pueden usar diversos métodos para identificar células y animales que tienen una modificación genética dirigida.
- 15 La etapa de cribado puede comprender, por ejemplo, un ensayo cuantitativo para evaluar la modificación del alelo (MOA) de un cromosoma progenitor. Por ejemplo, el ensayo cuantitativo puede llevarse a cabo por una PCR cuantitativa, tal como una PCR a tiempo real (qPCR). La PCR a tiempo real puede utilizar un primer conjunto cebador que reconoce el locus diana y un segundo conjunto cebador que reconoce un locus de referencia no dirigido. El conjunto cebador puede comprender una sonda fluorescente que reconoce la secuencia amplificada.
- 20 Otros ejemplos de ensayos cuantitativos adecuados incluyen hibridación *in situ* mediada por fluorescencia (FISH), hibridación genómica comparativa, amplificación isotérmica del ADN, hibridación cuantitativa con una o más sondas inmovilizadas, sondas INVADER®, balizas moleculares TAQMAN® o la tecnología de sondas ECLIPSE™ (véase, p. ej., el documento US 2005/0144655).
- 25 Un ejemplo de una célula pluripotente adecuada es una célula madre embrionaria (ES) (por ejemplo, una célula ES de ratón o una célula ES de rata). La célula pluripotente modificada se puede generar, por ejemplo, mediante recombinación (a) introduciendo en la célula uno o más vectores de direccionamiento que comprenden un ácido nucleico de inserto flanqueado por brazos de homología 5' y 3' correspondientes a sitios diana 5' y 3', en donde el ácido nucleico de inserto comprende un locus *TTR* humanizado; y (b) identificar al menos una célula que comprende en su genoma el ácido nucleico insertado integrado en el locus *Ttr* endógeno. De manera alternativa, la célula pluripotente modificada puede generarse (a) introduciendo en la célula: (i) un agente nucleasa, en donde el agente nucleasa induce una mella o rotura biciatenaria en una secuencia diana dentro del locus *Ttr* endógeno; y (ii) uno o más vectores de direccionamiento que comprenden un ácido nucleico de inserto flanqueado por brazos de homología 5' y 3' correspondientes a sitios diana 5' y 3' ubicados en suficiente proximidad a la secuencia diana, en donde el ácido nucleico de inserto comprende el locus *TTR* humanizado; y (c) identificar al menos una célula que comprende una modificación (por ejemplo, integración del ácido nucleico de inserto) en el locus *Ttr* endógeno. Puede usarse cualquier agente nucleasa que induzca una mella o rotura biciatenaria en una secuencia diana deseada. Los ejemplos de nucleasas adecuadas incluyen una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN), una nucleasa de dedos de zinc (ZFN), una meganucleasa, y sistemas de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente e intercaladas (CRISPR)/asociados a CRISPR (Cas) o componentes de dichos sistemas (por ejemplo, CRISPR/Cas9). Véase, p. ej., los documentos US 2013/0309670 y US 2015/0159175.
- 45 Un método para preparar un animal no humano que comprende un locus *TTR* humanizado puede comprender: (a) introducir en una célula madre embrionaria (ES) de un animal no humano: (i) un agente nucleasa que se dirige a una secuencia diana en el locus *Ttr* endógeno; y (ii) un vector de direccionamiento que comprende un inserto de ácido nucleico que comprende la secuencia de *TTR* humana flanqueada por un brazo de homología 5' correspondiente a una secuencia diana 5' en el locus *Ttr* endógeno y un brazo de homología 3' correspondiente a una secuencia diana 3' en el locus *Ttr* endógeno, en donde el vector de direccionamiento se recombinan con el locus *Ttr* endógeno para producir una célula ES no humana modificada genéticamente que comprende en su genoma el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente que comprende la secuencia de *TTR* humano; (b) introducir la célula ES no humana modificada genéticamente en un embrión hospedador de animal no humano; y (c) gestar el embrión hospedador de animal no humano en una madre subrogada, en donde la madre subrogada produce una descendencia F0 de un animal no humano modificado genéticamente que comprende en su genoma el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente que comprende la secuencia de *TTR* humano.
- 55 60 65 55 60 65 En algunos de estos métodos, el agente nucleasa puede comprender una proteína Cas (por ejemplo, una proteína Cas9) y un ARN guía que se dirige a una secuencia diana en el locus *Ttr* endógeno, pero también se pueden usar otros agentes nucleasa adecuados. Los sistemas CRISPR/Cas y CRISPR/Cas9 se describen con más detalle en otra parte del presente documento. Opcionalmente, se pueden usar dos o más (por ejemplo, tres o cuatro) agentes nucleasas (por ejemplo, ARN guía). La secuencia o secuencias diana pueden ser cualquier secuencia diana adecuada dentro del locus *Ttr* endógeno. Por ejemplo, la secuencia o secuencias diana pueden estar dentro de una distancia de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000 o aproximadamente 5000 nucleótidos del codón de inicio y/o el codón de terminación (por ejemplo, una secuencia diana cerca del codón de inicio y una secuencia diana cerca del codón de terminación).

- En algunos de estos métodos, el vector de direccionamiento es un vector de direccionamiento grande de al menos 10 kb de longitud o en el que la suma total de los brazos de homología 5' y 3' tiene al menos 10 kb de longitud, pero también se pueden utilizar y son bien conocidos otros tipos de ácidos nucleicos donantes exógenos. Los brazos de homología 5' y 3' pueden corresponderse con secuencias diana 5' y 3', respectivamente, que flanquean la región que se reemplaza por el ácido nucleico de inserto de *TTR* humano o que flanquean la región en la que se va a insertar el ácido nucleico de inserto de *TTR* humano. El ácido nucleico donante exógeno o el vector de direccionamiento puede recombinarse con el locus diana mediante reparación dirigida por homología o puede insertarse mediante inserción mediada por NHEJ para generar el locus *TTR* humanizado.
- 5 10 La célula donante puede introducirse en un embrión hospedador en cualquier fase, tal como la fase de blastocisto o la fase de premórula (es decir, la fase de 4 células o la fase de 8 células). Se generan descendientes que pueden transmitir la modificación genética a través de la línea germinal. Véase, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 7.294.754.
- 15 20 De manera alternativa, un método para producir los animales no humanos descritos en otra parte del presente documento puede comprender: (1) modificar el genoma de un embrión en fase unicelular para comprender el locus *TTR* humanizado usando los métodos descritos anteriormente para modificar células pluripotentes; (2) seleccionar el embrión modificado genéticamente; y (3) implantar y gestar el embrión modificado genéticamente en una madre subrogada. Se generan descendientes que pueden transmitir la modificación genética a través de la línea germinal.
- 25 30 35 40 45 50 También se pueden usar técnicas de transferencia nuclear para generar los animales mamíferos no humanos. En síntesis, los métodos para la transferencia nuclear pueden incluir las etapas de: (1) enuclear un ovocito o proporcionar un ovocito enucleado; (2) aislar o proporcionar una célula donante o núcleo para ser combinada con el ovocito enucleado; (3) insertar la célula o núcleo en el ovocito enucleado para formar una célula reconstituida; (4) implantar la célula reconstituida en el útero de un animal para formar un embrión; y (5) dejar que el embrión se desarrolle. En dichos métodos, los ovocitos generalmente se obtienen de animales fallecidos, aunque pueden aislarse también de oviductos y/u ovarios de animales vivos. Los ovocitos pueden madurar en una diversidad de medios bien conocidos antes de la enucleación. La enucleación del ovocito se puede realizar de varias maneras bien conocidas. La inserción de la célula donante o núcleo dentro del ovocito enucleado para formar una célula reconstituida puede ser por microinyección de una célula donante bajo la zona pelúcida antes de la fusión. La fusión puede inducirse por aplicación de un pulso eléctrico DC a través de un plano de contacto/fusión (electrofusión), por exposición de las células a sustancias químicas promotoras de la fusión, tales como polietilenglicol, o por medio de un virus inactivado, tal como el virus Sendai. Una célula reconstituida puede activarse por medios eléctricos y/o no eléctricos antes, durante y/o después de la fusión del donante nuclear y el ovocito receptor. Los métodos de activación incluyen pulsos eléctricos, choque químicamente inducido, penetración por esperma, incremento de los niveles de cationes divalentes en el ovocito, y reducción de la fosforilación de las proteínas celulares (como por medio de los inhibidores de quinasa) en el ovocito. Las células reconstituidas activadas, o embriones, pueden cultivarse en medios bien conocidos y luego transferirse a la matriz de un animal. Véase, p. ej., los documentos US 2008/0092249, WO 1999/005266, US 2004/0177390, WO 2008/017234 y la patente de EE. UU. n.º 7.612.250.
- 40 Los diversos métodos divulgados en el presente documento permiten la generación de un animal F0 no humano modificado genéticamente en donde las células del animal F0 modificado genéticamente comprenden el locus *TTR* humanizado. Dependiendo del método utilizado para generar el animal F0, el número de células dentro del animal F0 que tienen el locus *TTR* humanizado variará. La introducción de las células ES donantes en un embrión en fase de premórula de un organismo correspondiente (por ejemplo, un embrión de ratón en fase de 8 células) mediante, por ejemplo, el método VELOCIMOUSE® permite que un mayor porcentaje de la población celular del animal F0 comprenda células que tienen la secuencia de nucleótidos de interés que comprende la modificación genética dirigida. Por ejemplo, al menos un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 85 %, 86 %, 87 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de la contribución celular del animal F0 no humano puede comprender una población celular que tiene la modificación dirigida.
- 45 Las células del animal F0 modificado genéticamente pueden ser heterocigotas para el locus *TTR* humanizado o pueden ser homocigotas para el locus *TTR* humanizado.
- 55 **Breve descripción de las secuencias**
- 60 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de letras convencionales para bases nucleotídicas y el código de tres letras para aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos siguen la convención estándar de comenzar en el extremo 5' de la secuencia y avanzar (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) hasta el extremo 3'. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de nucleótidos, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena que se muestra. Las secuencias de aminoácidos siguen la convención estándar de comenzar en el extremo amino de la secuencia y avanzar (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) hasta el extremo carboxi.

Tabla 2. Descripción de Secuencias.

SEQ ID NO	Tipo	Descripción
1	Proteína	Proteína TTR humana NP_000362.1 y P02766.1
2	Proteína	Proteína químérica TTR humana/ratón esperada - Humanización V2
3	ADN	Gen <i>TTR</i> humano NG_009490.1
4	ADN	ARNm de <i>TTR</i> humano NM_000371.3
5	ADN	Gen <i>Ttr</i> de ratón NC_000084.6
6	Proteína	Proteína TTR de ratón P07309.1 y NP_038725.1
7	ADN	ARNm de <i>Ttr</i> de ratón NM_013697.5
8	ARN	Armazón genérico de ARN guía v.2
9	ARN	Armazón genérico de ARN guía v.3
10	ARN	Armazón genérico de ARN guía v.4
11	ADN	Secuencia diana genérica de ARN guía más PAM v.1
12	ADN	Secuencia diana genérica de ARN guía más PAM v.2
13	ADN	Secuencia diana genérica de ARN guía más PAM v.3
14	ADN	Humanización esperada V1 - F0, con casete SDC Pmc12 UbiNeo
15	ADN	Humanización esperada V1 - F1, Casete eliminado
16	ADN	Humanización esperada V2 - F0, con casete SDC Pmc12 UbiNeo
17	ADN	Humanización esperada V2 - F1, Casete eliminado
18	ADN	Secuencia de <i>TTR</i> humano insertada en <i>TTR</i> humanizado V1
19	ADN	Secuencia de <i>TTR</i> humano insertada en <i>TTR</i> humanizado V2
20	ADN	Locus <i>Ttr</i> de ratón - codón de inicio a codón de terminación
21	ADN	9090retU3 - Cebador F
22	ADN	9090retU2 - Cebador F
23	ADN	9090retU - Cebador F
24	ADN	9090mTGU - Cebador F
25	ADN	7576mTU - Cebador F
26	ADN	9090mTM - Cebador F
27	ADN	7576mTD - Cebador F
28	ADN	9090mTGD - Cebador F
29	ADN	9090retD - Cebador F
30	ADN	9090retD2 - Cebador F
31	ADN	9090retD3 - Cebador F
32	ADN	7576hTU - Cebador F
33	ADN	7576hTD - Cebador F
34	ADN	Neo - Cebador F
35	ADN	7655hTU - Cebador F
36	ADN	9212mTU - Cebador F
37	ADN	9212mTGD - Cebador F
38	ADN	7655mTU - Cebador F
39	ADN	7655mTD - Cebador F
40	ADN	9204mretD - Cebador F
41	ADN	9204mretU - Cebador F
42	ADN	4552mTU - Cebador F
43	ADN	9090retU3 - Cebador R
44	ADN	9090retU2 - Cebador R
45	ADN	9090retU - Cebador R
46	ADN	9090mTGU - Cebador R
47	ADN	7576mTU - Cebador R
48	ADN	9090mTM - Cebador R
49	ADN	7576mTD - Cebador R

(continuación)

SEQ ID NO	Tipo	Descripción
50	ADN	9090mTGD - Cebador R
51	ADN	9090retD - Cebador R
52	ADN	9090retD2 - Cebador R
53	ADN	9090retD3 - Cebador R
54	ADN	7576hTU - Cebador R
55	ADN	7576hTD - Cebador R
56	ADN	Neo - Cebador R
57	ADN	7655hTU - Cebador R
58	ADN	9212mTU - Cebador R
59	ADN	9212mTGD - Cebador R
60	ADN	7655mTU - Cebador R
61	ADN	7655mTD - Cebador R
62	ADN	9204mretD - Cebador R
63	ADN	9204mretU - Cebador R
64	ADN	4552mTU - Cebador R
65	ADN	9090retU3 - Sonda
66	ADN	9090retU2 - Sonda
67	ADN	9090retU - Sonda
68	ADN	9090mTGU - Sonda
69	ADN	7576mTU - Sonda
70	ADN	9090mTM - Sonda
71	ADN	7576mTD - Sonda
72	ADN	9090mTGD - Sonda
73	ADN	9090retD - Sonda
74	ADN	9090retD2 - Sonda
75	ADN	9090retD3 - Sonda
76	ADN	7576hTU - Sonda
77	ADN	7576hTD - Sonda
78	ADN	Neo - Sonda
79	ADN	7655hTU - Sonda
80	ADN	9212mTU - Sonda
81	ADN	9212mTGD - Sonda
82	ADN	7655mTU - Sonda
83	ADN	7655mTD - Sonda
84	ADN	9204mretD - Sonda
85	ADN	9204mretU - Sonda
86	ADN	4552mTU - Sonda
87	ARN	cola de ARNcr
88	ARN	ARNtracr
89	ARN	Armazón genérico de ARN guía v.1
90	ADN	CDS de TTR humanizada v1.0
91	ADN	CDS de TTR humanizada v2.0
92	ADN	CDS de TTR de ratón
93	ADN	Secuencia de ADN de Cas9
94	Proteína	Secuencia de proteína Cas9

Ejemplos

5 Ejemplo 1. Generación de ratones que comprende un locus *TTR* humanizado

Un enfoque terapéutico prometedor para las enfermedades de amiloidosis por TTR es reducir la carga de TTR en el

paciente mediante la inactivación del gen con tecnología de edición del genoma, tal como la tecnología CRISPR/Cas9. Para ayudar en el desarrollo de terapias CRISPR/Cas9, se desarrollaron ratones con modificaciones dirigidas en el gen *Ttr*.

- 5 El primer alelo *Ttr* creado fue una eliminación completa de la secuencia codificante de transtirretina de ratón y su reemplazo con la parte ortóloga del gen *TTR* humano. Se generó un vector de direccionamiento grande que comprende un brazo de homología 5' que incluye 33,7 kb de secuencia cadena arriba del codón de inicio de *Ttr* de ratón y 34,5 kb de la secuencia cadena abajo del codón de terminación de *Ttr* de ratón para reemplazar la región de aproximadamente 8,3 kb desde el codón de inicio de *Ttr* de ratón al codón de terminación de *Ttr* de ratón con la secuencia de *TTR* humano ortólogo de aproximadamente 7,1 kb desde el codón de inicio de *TTR* humano hasta el extremo del último exón de *TTR* humano (exón 4, incluida la 3' UTR humana) y un casete de selección de neomicina de autoeliminación (SDC Neo) flanqueado por sitios loxP. Véase la **Figura 3**. El casete SDC Neo incluye los siguientes componentes de 5' a 3': sitio loxP, promotor de protamina de ratón (*prm1*), Cre (secuencia de codificación de Cre optimizada para incluir intrón), poliA, promotor de ubiquitina humana, secuencia codificante de neomicina fosfotransferasa (neo_r), poliA, loxP. Para generar el alelo humanizado, se introdujeron componentes CRISPR/Cas9 dirigidos al locus *Ttr* de ratón en células madre embrionarias de ratón F1H4 junto con el vector de direccionamiento grande. Se realizaron ensayos de pérdida de alelo, ensayos de ganancia de alelo, ensayos de retención y ensayos CRISPR que utilizan los cebadores y sondas establecidos en la **Figura 5A** y en la **Tabla 3** para confirmar la humanización del alelo *Ttr* de ratón. Se describen ensayos de pérdida de alelo, ganancia de alelo y ensayos de retención, por ejemplo, en los documentos US 2014/0178879; US 2016/0145646; WO 2016/081923; y Frendewey et al. (2010) *Methods Enzymol.* 476:295-307. Los ensayos CRISPR son ensayos TAQMAN® diseñados para cubrir la región alterada por los ARNg de CRISPR. Cuando un ARNg de CRISPR corta y crea un indel (inserción o eliminación), el ensayo TAQMAN® no logrará amplificar y, por lo tanto, notificará escisión CRISPR. Las versiones con el casete SDC Neo y después de la escisión del casete SDC Neo se muestran en la **Figura 3**. Después se generaron ratones F0 usando el método VELOCIMOUSE®. Véase, p. ej., los documentos US 7.576.259; US 7.659.442; US 7.294.754; US 2008/007800; y Poueymirou et al. (2007) *Nature Biotech.* 25(1):91-99,

30 Se generaron ratones de generación F0 (50 % C57BL/6NTac y 50 % 129S6/SvEvTac) a partir de múltiples clones de células ES humanizadas, incluyendo los clones 7576A-A5, 7576C-G7 y 7576B-F10. La secuencia del locus *Ttr* de ratón humanizado esperado en los ratones de la generación F0 se establece en la SEQ ID NO: 14 e incluye el casete SDC Neo. Después se generaron mediante reproducción ratones de las generaciones F1 y F2 (75 % C57BL/6NTac y 25 % 129S6/SvEvTac). La secuencia del locus *Ttr* de ratón humanizado esperado en los ratones de generación F1 y F2 se establece en la SEQ ID NO: 15 y no incluye el casete SDC Neo.

35 En la **Figura 1A** se muestra una comparación de las secuencias de la proteína precursora de transtirretina humana y de ratón, en la **Figura 1B** se muestra una comparación de las secuencias codificantes de transtirretina humana y de ratón y en la **Figura 2** se muestra un esquema que muestra el locus *Ttr* de ratón de tipo silvestre y el locus *Ttr* de ratón humanizado final (*TTR* humanizada versión 1 con el casete SDC Neo eliminado). La secuencia del locus *Ttr* de ratón endógeno desde el codón de inicio al codón de terminación se proporciona en la SEQ ID NO: 20. Las secuencias del locus *Ttr* de ratón humanizado esperado con el casete SDC Neo y sin el casete SDC Neo se exponen en las SEQ ID NOS: 14 y 15, respectivamente. La proteína precursora de transtirretina esperada codificada por el locus *Ttr* de ratón humanizado se establece en la SEQ ID NO: 1. Este alelo proporciona la verdadera diana humana de las terapias CRISPR/Cas9 de *TTR* humano, lo cual permite ensayar la eficacia y el modo de acción de las terapias CRISPR/Cas9 en animales vivos, así como en estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos en un entorno donde la proteína humana es la única versión de *TTR* presente.

Tabla 3. Cebadores y sondas para ensayos de pérdida de atelo, ensayos de ganancia de atelo, ensayos de retención y ensayos CRISPR.

Ensayo	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
9090retU3	CACAGACAAATCAGACGTACCGTA (SEQ ID NO: 21)	GGGACATCTCGGTTCCGTACTA (SEQ ID NO: 43)	TCACTGTAATCTGGCTTCAGAGTGGGA (SEQ ID NO: 65)
9090retU2	CCAGCTTGGCAGTTACGA (SEQ ID NO: 22)	TCCACACTACTGAACTCCACAA (SEQ ID NO: 44)	TGGGAGGAATTCTTAGTTCAATGGA (SEQ ID NO: 66)
9090retU	TTGGACGGTTGCCCTT (SEQ ID NO: 23)	CGGAACACTCGCTCTACAAA (SEQ ID NO: 45)	TCCCAAAGGTGTCGTGACACA (SEQ ID NO: 67)
9090mTGU	GATGGCTTCCCTCGACTCTTC (SEQ ID NO: 24)	GGGCCAGCTTCAAGACACA (SEQ ID NO: 46)	CTCCCTTGCCCTGGACTGG (SEQ ID NO: 68)
7576mTU	CACTGACATTCTCTCTGCTCCCT (SEQ ID NO: 25)	CCCAAGGGTGTGGAGAATCCAA (SEQ ID NO: 47)	CGGACAGCATCCAGGACTT (SEQ ID NO: 69)
9090mTM	GGGCTCACACAGATGAGAAC (SEQ ID NO: 26)	GCCAAGTGTCTCCAGTACGGAT (SEQ ID NO: 48)	AGAAGGAGTGTACAGAGTAGAACTGGACCA (SEQ ID NO: 70)
7576mTD	CACTGTTGCCAACAGGTCTT (SEQ ID NO: 27)	GTTCCTTTCTTGGGTTCAGA (SEQ ID NO: 49)	TGTTTGTGGGTGTCAGTTCTACTC (SEQ ID NO: 71)
9090mTGD	GCTCAGCCCCATACTCTTACA (SEQ ID NO: 28)	GATGCTACTGCTTGGCAAAGATC (SEQ ID NO: 50)	CACCAAGGGTGTGGTCAGCAA (SEQ ID NO: 72)
9090retD	GCCCCAGGAGCAGGAT (SEQ ID NO: 29)	CCTGAGCTGCTAACACGGTT (SEQ ID NO: 51)	CTTGCCAAAGGAGTAGCATCCC (SEQ ID NO: 73)
9090retD2	GGCAACTTGTCTGGAAAGA (SEQ ID NO: 30)	AGCTACAGACCATGCTTACTGTA (SEQ ID NO: 52)	AGGTCAAGAAAGCAGAGTGGACCA (SEQ ID NO: 74)
9090retD3	GCAGCAACCCAGCTTCACTT (SEQ ID NO: 31)	TGCCAGTTAGGAGGAATATGTTTC (SEQ ID NO: 53)	CCAGGCAATTCTACCTTCCCA (SEQ ID NO: 75)
7576mTU	ACTGAGGCTGGGACTGTAAAC (SEQ ID NO: 32)	CTGAGGAAACAGAGGTACAGATAT (SEQ ID NO: 54)	TCTGAGCATTCIACCTTGTCTGGT (SEQ ID NO: 76)
7576mTD	TGCCCTCACTCTGAGAACCA (SEQ ID NO: 33)	AGTCACACAGTTCTGCAATCAG (SEQ ID NO: 55)	AGGCCTGTCCAGACCTGAGTCG (SEQ ID NO: 77)
Neo	GGTGGAGGGCTATTGGGC (SEQ ID NO: 34)	GAACACAGGGCAATCAG (SEQ ID NO: 56)	TGGGCAACAGAGCAATGGCTG (SEQ ID NO: 78)
7655mTU	GGCCGTGCACTGTTTCAG (SEQ ID NO: 35)	TCCCTGTGGGAGGGTTCTTTC (SEQ ID NO: 57)	AAGGCTGCTGATGACACCTGGGA (SEQ ID NO: 79)
9212mTU	GGTTCCCATTTGCTTATTCGT (SEQ ID NO: 36)	CCCTCTCTGAGCCCTTA (SEQ ID NO: 58)	AGATTCAAGACACACAACTTACACGC (SEQ ID NO: 80)
9212mTGD	CCCACACTGCAGAAACTTC (SEQ ID NO: 37)	GCTGCCCTAAGCTTGGAGCT (SEQ ID NO: 59)	AGACCTGCAATTCTCTAAAGAGCTCCACCA (SEQ ID NO: 81)
7655mTU	GGTTCCCATTTGCTTATTCGT (SEQ ID NO: 38)	CCCTCTCTGAGCCCTTA (SEQ ID NO: 60)	AGATTCAAGACACACAACTTACACGC (SEQ ID NO: 82)

(continuación)

Ensayo	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
7655mTID	CCAGCTTAGCATCTGTGAACA (SEQ ID NO: 39)	GAGGGAGAGACAGCTAGTTCTAAC (SEQ ID NO: 61)	TGGTCTGCAGCTCTACCTCTGGG (SEQ ID NO: 83)
9204mretD	GGCAACTTGGCTTGGAAAGA (SEQ ID NO: 40)	AGCTACAGACCATGCTTAGTGTAA (SEQ ID NO: 62)	AGGTCAAGAAAGCAGAGTGGACCA (SEQ ID NO: 84)
9204mretU	TGTGGAGTTCAGTAGTGTGGAG (SEQ ID NO: 41)	GCCCTCTCATACAGGAATCAC (SEQ ID NO: 63)	TTGACATGTGTGGTGAGAGATTTACTG (SEQ ID NO: 85)
4552mTU	CACTGACATTCTCTGTCTCT (SEQ ID NO: 42)	GGGACAGGCATCCAGGACTT (SEQ ID NO: 64)	CCAGGGTGTGGAGAATCCAA (SEQ ID NO: 86)

Ejemplo 2. Caracterización de ratones que comprenden un locus *TTR* humanizado.

Después se caracterizaron las cohortes F0 de ratones TTR humanizados de los clones 7576A-A5 y 7576C-G7. Como se muestra en la **Figura 6**, se expresó de forma robusta el ARNm de TTR humanizada en el hígado de ratones con

5 TTR humanizada homocigotos de generación F0 de 8 semanas de edad. Se analizaron cantidades masivas iguales de ARN de cada tejido mediante RT-qPCR. Se ensayaron cinco ratones por genotipo, con cuatro réplicas técnicas por muestra. Se extrajo ARN a partir de cada tejido. Se degradó el ADN genómico para que no contara en la reacción 10 qPCR. El ARN se transcribió de forma inversa y se utilizaron ensayos específicos para *TTR* humano y *Ttr* de ratón para detectar transcritos de *TTR* humano y transcritos de *Ttr* de ratón, respectivamente. Como se esperaba, el ratón 15 con *TTR* humanizado homocigoto mostró una expresión significativa de *TTR* humano en el hígado (valores de ct por debajo de 30), mientras que los ratones WT (de tipo silvestre) mostraron valores de ct de 30 y superiores, lo que indica que no hubo expresión de *TTR* humano. Por el contrario, el ratón de tipo silvestre mostró una expresión significativa de *Ttr* de ratón en el hígado, mientras que los ratones *TTR* humanizados homocigotos mostraron valores de ct de 30 y superiores, lo que indica que no hay expresión endógena de *Ttr* de ratón.

15 Se realizó un ensayo ELISA para evaluar los niveles de proteína TTR humana y TTR de ratón en suero y líquido cefalorraquídeo de ratones con TTR humanizada homocigotos de generación F0, de 8 semanas de edad. Se utilizó un kit ELISA de TTR humana (Aviva Systems Biology; n.º de cat.: OKIA00081; dilución 1:250 para suero; dilución 1:1000 para CSF) para evaluar los niveles de TTR humana. Se utilizó un kit ELISA de TTR de ratón (Aviva Systems

20 Biology; N.º de cat.: OKIA00111; dilución 1:4000 para suero; dilución 1:10000 para CSF) para evaluar los niveles de TTR de ratón. Se usaron suero humano y CSF humano como controles positivos para TTR humana y controles negativos para TTR de ratón, y se usaron suero F1H4 y CSF F1H4 como controles negativos para TTR humana y controles positivos para TTR de ratón. Como se muestra en la **Figura 7A**, se detectó TTR humana en el suero de los ratones con *TTR* humanizado pero no en suero de ratones de tipo silvestre (F1H4). Como se muestra en la **Figura 25 7B**, no se detectó TTR de ratón en el suero de los ratones *TTR* humanizados, pero se detectó en suero de ratón de tipo silvestre. Los niveles de TTR humana y de ratón en suero se evaluaron adicionalmente en ratones con *TTR* humanizado derivados de dos clones separados de células ES de *Ttr* de ratón humanizado: 7576C-G7 y 7576A-A5. Como se muestra en la **Figura 7C**, se detectó TTR humana en el suero de ratones con *TTR* humanizado derivados del clon 30 7576A-A5.

30 La expresión de la proteína TTR humana también se evaluó en ratones con *TTR* humanizado homocigoto de 8 semanas de edad mediante transferencia Western en muestras de suero, muestras de hígado y muestras de riñón. Los resultados se muestran en las **Figuras 8-9**. Se hirvieron muestras de suero (5 µl de volumen total por pocillo) en tampón Laemlli (que contiene SDS y beta-mercaptopropano) y se resolvieron en un gel con gradiente desnaturalizante del 4 al 20 % (anticuerpo anti-TTR: 1:1000; Abcam; ab75815). Como control de carga se utilizó IgG de ratón (anti-IgG de ratón-HRP: 1:7500, Jackson ImmunoResearch). Se ensayaron los clones de *Ttr* 7576C-G7 y 7576A-A5 en tres ratones por grupo. Se ensayaron cinco ratones por grupo para controlar el ratón de tipo silvestre (F1H4). Como controles negativos y positivos se utilizaron suero de ratón y suero humano, respectivamente. Como se muestra en la **Figura 8**, la TTR humana se detectó mediante transferencia Western en ambos clones de *Ttr* de ratón humanizado.

40 40 Se hirvieron muestras de hígado y riñón (100 µg de proteína total por pocillo) en tampón Laemlli (que contiene SDS y beta-mercaptopropano) y se resolvieron en un gel con gradiente desnaturalizante del 4 al 20 % (anticuerpo anti-TTR: 1:1000; Abcam; ab75815). Como control de carga se utilizó GAPDH (anti-GAPDH: 1:2000, Santa Cruz). Se ensayaron los clones de *Ttr* 7576C-G7 y 7576A-A5 en tres ratones por grupo. Se ensayaron cinco ratones por grupo para controlar el ratón de tipo silvestre (F1H4). Como controles negativos y positivos se utilizaron suero de ratón y suero humano, respectivamente. Como se muestra en la **Figura 9**, se detectó TTR humana mediante transferencia Western en suero de ambos ratones con *TTR* humanizado heterocigoto generados a partir del clon 7576A-A5.

50 En resumen, se observó que los ratones F0 TTR Humln (*TTR*^{7576/7576}) tenían una cantidad detectable de hTTR circulante. Adicionalmente, los ratones del clon 7576C-A5 tenían cantidades detectables de hTTR en hígado y plasma.

Nuestra hipótesis es que la eliminación del casete de selección de fármacos de neomicina puede aumentar la secreción de TTR humana. Los niveles de TTR humana se midieron en muestras de plasma de muestras de sangre submandibular, no terminales, de ratones de 5 semanas homocigotos para el locus *Ttr* de ratón completamente 55 humanizado con el casete de selección de neomicina (*TTR*^{7576/7576}), ratones heterocigotos para el locus *TTR* de ratón completamente humanizado con el casete de selección de neomicina (*TTR*^{7576/WT}), ratones heterocigotos para el locus *Ttr* de ratón completamente humanizado sin el casete de selección de neomicina (*TTR*^{7577/WT}) y ratones de tipo silvestre (F1H4). Los niveles de TTR humana se analizaron con el kit ELISA de TTR humana (hTTR) AssayPro (n.º de cat.: EP3010-1; dilución 1:40000). Los niveles séricos de TTR de ratón se analizaron con el kit ELISA de TTR de ratón (mTTR) de Aviva Systems Biology (N.º de catálogo OKIA00111; dilución 1:4000). Anteriormente se determinó que el kit ELISA de TTR humana AssayPro era específico para detectar TTR humana pero no TTR de ratón, y previamente se determinó que el kit ELISA de TTR de ratón de Aviva Systems Biology era específico para detectar TTR de ratón pero no TTR humana (datos no mostrados). Como se muestra en la **Tabla 4**, la eliminación del casete de selección de neomicina dio como resultado un aumento estadísticamente significativo en los niveles de TTR humana en el suero. 60 MAID7576 se refiere al locus *TTR* humanizado con el casete de selección de neomicina. MAID7577 se refiere al locus *TTR* humanizado con el casete de selección de neomicina eliminado. También se observó una expresión mejorada 65

del ARNm de TTR humana en el hígado (datos no mostrados). Los ratones heterocigotos para hTTR y mTTR (TTR-WT^{7576/WT} y TTR-WT^{7577/WT}) tenían aumentada la hTTR circulante, posiblemente debido a una mayor estabilidad de la interacción heteromérica (p. ej., especies de TTR cruzadas).

5 **Tabla 4. Niveles circulantes de TTR en humanos y ratones.**

	TTR ^{7576/7576}	TTR ^{7576/WT}	TTR ^{7577/WT}	F1H4
mTTR, µg/ml (SD)	N.D.	207,62 (15,39)	359,9 (38,07)**	919,96 (79,73)
hTTR, µg/ml (SD)	0,61 (0,43)	28,507 (5,61)	39,93 (3,70)**	N.D.

También se midieron los niveles de TTR en suero e hígado en ratones *TTR* humanizados homocigotos de generación F2 (tres por grupo) que se generaron a partir de un clon diferente: 7576B-F10. Como se muestra en la **Figura 14** (muestra de control de sacarosa con solución salina tamponada con tris (TSS)), se detectó TTR humana en muestras de hígado en un nivel superior a 1000 ng/ml. Como se muestra en las **Figuras 15A y 15B** (muestra TSS), se detectó TTR humana en muestras de suero a un nivel de 80.000 ng/ml o superior.

En otro experimento, se recogió sangre mediante sangrados submandibulares de ratones homocigotos F2 TTR WT Humln (v1.0, hTTR^{7577/7577}, clon B-F10) a los 3 meses de edad. Los niveles de hTTR se determinaron en plasma utilizando kits ELISA específicos de especie (hTTR, Aviva, n.º de cat. OKIA00081; mTTR, Aviva, n.º de cat. OKIA00111). Como se muestra en las **Figuras 17A y 17B** y en la **Tabla 5**, hTTR se secretó en la circulación en ratones homocigotos F2 TTR WT Humln (v1.0, clon B-F10) a 52,1 +/- 10,7 µg/ml, sin niveles detectables de mTTR. Los niveles de ARNm de mTTR y hTTR en muestras de hígado de ratones de control de tipo silvestre (F1H4) y ratones WT Humln (v1.0, hTTR^{7577/7577}, clon B-F10) se muestran en la **Figura 17C**.

20 **Tabla 5. Niveles plasmáticos de hTTR y mTTR.**

	hTTR, µg/ml (SD)	mTTR, µg/ml (SD)
TTR ^{WT/WT}	N.D.	831,5 (129,9)
TTR ^{7577/7577}	52,1 (10,7)	Indetectable
Suero humano	234,5 (n.a.)	Indetectable

Ejemplo 3. Uso de ratones que comprenden un locus *TTR* humanizado para ensayar los ARN guía dirigidos a *TTR* humano *ex vivo* e *in vivo*.

25 Después se utilizaron cohortes de ratones con *TTR* humanizados de la generación F0 para ensayar los ARN guía dirigidos a *TTR* humano *ex vivo* e *in vivo*. Como prueba de concepto, primero se ensayaron ARN guía de *TTR* humano en hepatocitos primarios aislados de humanizados de ratones *TTR* humanizados de la generación F0 producidos a partir del clon 7576C-G7. Se perfundieron hígados de ratones *huTtr^{7577/7577}* con 50 ml de medio de perfusión de hígado que contenía PenStrep 1X, seguido de 50 ml de medio de digestión de hígado (HBSS, CaCl2 100 mM, HEPES 500 mM, colagenasa). Una vez digeridos los hígados, se pusieron en un medio de lavado que contenía PenStrep 1X y L-glutamina. Los hígados se desgarraron para liberar los hepatocitos del hígado mediante una suave agitación. Una vez que las células fueron liberadas, se pasaron por un filtro de malla de 70 µm y se centrifugaron a 50 g durante 4 minutos a 4 °C. Los sedimentos se lavaron 2 veces con tampón de lavado. Después, los sedimentos se resuspendieron en 20 ml de Percoll al 38-40 % y se centrifugaron a 200 g x 10 min a 4 °C. El sedimento se lavó 2 veces y se resuspendió en medio de cultivo en placas (Williams E Media, Penstrep 1X, L-glutamina 1X, FBS al 5 %). Las células se sembraron a 300.000 células por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos recubiertas de colágeno. Después de dejar que se adhirieran las células durante 6 a 18 horas, el medio de cultivo en placa se reemplazó con medio sin FBS. Los reactivos utilizados se muestran en la **Tabla 6**.

40 **Tabla 6. Reactivos para el aislamiento de hepatocitos primarios.**

Material	Número de Catálogo
Medios de perfusión hepática	Gibco [17701-038]
HBSS (1x)	Gibco [14175-079]
Medios de lavado de hepatocitos	Gibco [17704-024]
Medios Williams E	Gibco [A12176-01]
Penstrep (100x)	Gibco [15140163]
L-glutamina (200 mM)	Gibco [25030081]
Suplemento FBS	Gibco [A13450]
HEPES	Gibco [15630080]
Colágeno	Gibco [A1048301]

(continuación)

Material	Número de Catálogo
Ácido acético	Sigma [A6283]
Liberase TM	Roche [TM05401119001]
Suplementos de descongelación de hepatocitos primarios y de cultivo en placa	Gibco [CM3000]
Suplementos de mantenimiento de hepatocitos primarios	Gibco [CM4000]
Percoll	GE [17-0891-01]

- Se añadieron nanopartículas lipídicas (LNP) (que contienen ARNm de Cas9 más un ARNg de *TTR* humano (versiones 1 y 2, cada una dirigida al exón 2 de *TTR* humano)) a los hepatocitos 24 horas después del aislamiento. En síntesis, para cada pocillo, se añadieron LNP a una concentración de 500 ng en 500 µl de medio de mantenimiento de hepatocitos que contenía suero de ratón al 3 % y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C. Se lavaron las células en las placas y se añadieron a cada pocillo 500 µl de LNP incubadas en medio. Después de 48 horas, se prepararon lisados de ADN a partir de las células y se realizó una secuenciación de última generación para cada ARN guía ensayado.
- Como se muestra en la **Figura 10**, se vio edición en el gen *TTR* humanizado con ambos ARN guía en hepatocitos primarios aislados de ratones *TTR* humanizados. El ARN guía 1 de *TTR* humano tuvo una eficacia de edición del 20,4 % y el ARN guía 2 de *TTR* humano tuvo una eficacia de edición del 7,53 %. Se observaron resultados similares para un ARN guía de *TTR* humano dirigido al exón 3 (eficacia de edición del 17,37 %; datos no mostrados). La eficacia de edición se refiere al número total de inserciones o eliminaciones observadas con respecto al número total de secuencias leídas en la reacción de PCR de un conjunto de células lisadas según lo determinado por la secuenciación de última generación.
- Después, se ensayaron los ARN guía de *TTR* humano 1 y 2 *in vivo* en ratones con *TTR* humanizada. Se utilizaron ratones con *TTR* humanizado de la generación F0 (*Ttr^{h/h}*) de los números de clón 7576A-A5 y 7576C-G7. Como diana se utilizaron tres grupos de animales con LNP frescas como se muestra en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Grupos de animales para el estudio de LNP.

Grupo	Descripción
1	<i>Ttr^{h/h}</i> 1M 1F A-A5 y 2M 1F C-G7: LNP (ARNg1) a 2 mg/kg
2	<i>Ttr^{h/h}</i> 1M 1F A-A5 y 2M 1F C-G7: LNP (ARNg2) a 2 mg/kg
3	<i>Ttr^{h/h}</i> 1M A-A5 y 2M C-G7: Sacarosa en solución salina tamponada con Tris

- Las LNP se formularon con ARNg guía y ARNm de *TTR* humano que codifica Cas9 con una etiqueta NLS y sin etiqueta HA. Las LNP tenían una relación de nitrógeno a fosfato (N/P) de 4,5 y contenían lípidos catiónicos, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar 45:44:9:2. El lípido catiónico utilizado en los experimentos de LNP *in vitro* e *in vivo* descritos en el presente documento fue octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo, también denominado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo. La relación (ARN guía):(ARNm de Cas9) en cada uno fue de 1:1 en peso. Se proporcionan detalles adicionales de la formulación de LNP en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Formulaciones de LNP de *TTR* humano.

ARN guía de <i>TTR</i> humano	ARN (mg/ml)	Encapsulación	Promedio Z (nm)	PDI	Número prom. (nm)
1	0,46	96 %	95,22	0,053	77,51
2	0,61	97 %	94,91	0,016	76,77

- Los ratones se pesaron antes de la inyección y las LNP (que contienen ARNm de Cas9 más un ARNg de *TTR* humano) se prepararon para dosificar a 2 mg/kg diluyendo en sacarosa con solución salina tamponada con tris de modo que el volumen de suministro fuera de 200 µl por ratón. El suministro fue intravenoso mediante inyección en la vena de la cola. Después de 8-14 días, los ratones fueron sacrificados y se recogió suero sanguíneo junto con tejidos hepáticos. Los tejidos se procesaron en lisados de ADN que luego se analizaron mediante secuenciación de última generación (NGS).

- El análisis de química sérica para las enzimas hepáticas ALT, AST, triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL, ácidos grasos no esterificados (NEFA) y albúmina no mostraron diferencias estadísticas entre los diversos grupos de tratamiento. Véase las **Figuras 11A-11H**. Se observaron resultados similares para un ARN guía de *TTR* humano dirigido al exón 3 (datos no mostrados).

La NGS mostró una edición significativa en el hígado para el ARNg 1 de *TTR* humano (promedio 42,8 %) y el ARNg 2 de *TTR* humano (promedio 36,0 %). Véase la **Figura 12**. La eficacia de edición se refiere al número total de inserciones

o eliminaciones observadas con respecto al número total de secuencias leídas en la reacción de PCR de un conjunto de células lisadas. Se observaron niveles estadísticamente significativos mínimos o nulos de edición de genes en otros tejidos (datos no mostrados).

5 Despues, se ensayó el ARN 1 guía de *TTR* humano *in vivo* en ratones con *TTR* humanizado homocigoto de la generación F2 del clon número 7576B-F10. Los animales se pesaron antes de la dosificación para calcular la dosis y luego se supervisaron 24 horas después de la dosis para determinar su bienestar. Los animales recibieron dosis intravenosas de 1 mg/kg, 0,3 mg/kg y 0,1 mg/kg con LNP formuladas con ARN guía 1 de *TTR* y ARNm que codifica Cas9 como se ha descrito anteriormente. Como control se utilizó sacarosa en solución salina tamponada con tris. Se ensayaron tres ratones por grupo. En la necropsia (8 días después de la dosis), se recogieron hígado y sangre (para obtener suero) para su análisis. El porcentaje de edición del locus *TTR* humanizado observado en el hígado fue del 50,7 % a una dosis de 1 mg/kg de la LNP formulada con ARN guía 1 de *TTR* y ARNm que codifica Cas9, del 13,0 % a una dosis de 0,3 mg/kg y del 2,3 % a una dosis de 0,1 mg/kg, observándose menos del 0,1 % de edición en los ratones de control. Después se midieron los niveles de TTR humana en lisados de hígado y suero de los ratones que recibieron las dosis. Los hígados se lisaron en RIPA e inhibidores de proteasa a 100 mg/ml. Se utilizó un kit ELISA de TTR humana (Aviva Systems Biology; n.º de cat.: OKIA00081; dilución 1:100 para lisados hepáticos; dilución 1:5000 o 1:10000 para suero) para evaluar los niveles de TTR humana. Como se muestra en la **Figura 14**, se midió un nivel de más de 1000 ng/ml de TTR humana en lisados hepáticos de animales de control y estos niveles disminuyeron en más de un 50 % en animales que recibieron 1 mg/kg de LNP formulada con ARN guía 1 de *TTR* humana y ARNm que codifica Cas9. Como se muestra en las **Figuras 15A y 15B**, la TTR humana se midió a niveles de 80.000 ng/ml o más en suero de animales de control, y los niveles de TTR humana se redujeron en un 66 % en animales que recibieron 1 mg/kg de la LNP formulada con ARN guía 1 de *TTR* humano y ARNm que codifica Cas9.

25 Despues, se ensayaron tres ARN guía de *TTR* humanos diferentes (los ARN guía 3, 4 y 5 de *TTR*) *in vivo* en ratones con *TTR* humanizado homocigoto. Las formulaciones de LNP contenían ARNm de Cas9 en una relación de 1:2 en peso con respecto al ARN guía. Las LNP contenían un lípido catiónico octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo, también denominado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo), colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar de 50:38:9:3, respectivamente, y tuvieron una relación N:P de 6.

30 En primer lugar, se evaluó la edición en el locus *TTR* humanizado. Los ratones se pesaron antes de la inyección y las LNP (que contenían ARNm de Cas9 más un ARNg de *TTR* humano) se prepararon a dosis de 1 mg/kg, 0,3 mg/kg y 0,1 mg/kg (n = 5 ratones por grupo). El suministro fue intravenoso mediante inyección en la vena de la cola. Como se ha descrito anteriormente, los ratones después se sacrificaron y se recogió suero sanguíneo junto con tejidos hepáticos. Los tejidos se procesaron en lisados de ADN que luego se analizaron mediante secuenciación de última generación (NGS). La NGS mostró una edición significativa en el hígado de cada ARNg de *TTR* humano en todas las dosis probadas de manera dependiente de la dosis. Véase la **Figura 19**. Los resultados de la edición del hígado se determinaron utilizando cebadores diseñados para amplificar la región de interés para el análisis de NGS.

35 En segundo lugar, se evaluaron los niveles séricos de TTR. Los ratones se pesaron antes de la dosificación para calcular la dosis. Los ratones recibieron una dosis intravenosa de 1 mg/kg, 0,3 mg/kg y 0,1 mg/kg (n = 5 ratones por grupo) con LNP formuladas con ARN guía 3, 4 o 5 de *TTR* humano y ARNm que codifica Cas9 como se ha descrito anteriormente. Las formulaciones de LNP contenían ARNm de Cas9 en una relación de 1:2 en peso con respecto al ARN guía. Las LNP contenían un lípido catiónico octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo, también denominado (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo), colesterol, DSPC y PEG2k-DMG en una relación molar de 50:38:9:3, respectivamente, y tuvieron una relación N:P de 6. Como control se utilizó sacarosa en solución salina tamponada con tris. Como se ha descrito anteriormente, después se recogió sangre (para suero) para su análisis. Luego se midieron los niveles de TTR humana en el suero de los ratones que recibieron la dosis. Los niveles de TTR en suero humano se evaluaron como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la **Figura 20**, los niveles de TTR humana se redujeron significativamente en ratones que recibieron la dosis de cada ARN guía, en todas las dosis, de manera dependiente de la dosis.

40 **Ejemplo 4. Generación de ratones que comprenden un locus *TTR* humanizado que codifica una proteína TTR químérica de ratón/humana con una secuencia señal de ratón.**

45 Nuestra hipótesis es que la secuencia señal de TTR en ratón puede mejorar la secreción de hTTR a niveles más robustos. Se construyeron plásmidos de suministro hidrodinámico (HDD) que contenían un inserto de ADNc para secuencia señal de *Ttr* de ratón (mTtr) + hTTR ("m/hTTR"). Se inyectaron construcciones HDD utilizando el vector pRG977 con los insertos de ADNc enumerados en la **Tabla 9** a través de HDD en ratones macho C57BL6, cada uno de 59 días de edad. Los ELISA se realizaron en sangre submandibular el día 4 después del HDD. Como controles negativos y positivos se incluyeron plasma F1H4 y suero humano en los ELISA, respectivamente.

Tabla 9. Resumen del experimento HDD.

Construcción de HDD	Numero de ratones	Peso; g (SD)	Inserto de ADNc
Nanoluc	8	21,5 (2,23)	Nanoluc
Proteína de Control	7	22,8 (1,40)	Proteína de Control
hTTR	8	23,4 (0,74)	Secuencia de señal de hTTR + hTTR
m/hTTR	8	22,9 (0,66)	Secuencia de señal de mTTR + hTTR

Los resultados se muestran en la **Figura 13**. El experimento HDD en ratones C57BL6 de tipo silvestre reveló que la utilización de la secuencia señal de TTR de ratón efectivamente aumentaba la secreción de hTTR en plasma en comparación con la secuencia señal humana de TTR + hTTR ("hTTR"). Esto demostró que pueden utilizarse ratones C57BL6 para predecir construcciones de TTR que darán como resultado una secreción robusta de hTTR.

Basándose en estos resultados, se generó un segundo alelo *TTR* humanizado que comprendía una eliminación de la región del locus *Ttr* de ratón desde el inicio del segundo exón hasta el codón de terminación y su reemplazo con la parte ortóloga del gen *TTR* humano pero también incluía la 3' UTR del gen *TTR* humano. Se generó un vector de 10 direcciónamiento grande que comprende un brazo de homología 5' que incluye 36 kb de secuencia cadena arriba del segundo exón del gen *Ttr* de ratón y 34,5 kb de la secuencia cadena abajo del codón de terminación de *Ttr* de ratón para reemplazar la región de aproximadamente 7,3 kb desde el inicio del segundo exón en el gen *Ttr* de ratón al codón de terminación de *Ttr* de ratón con la secuencia de *TTR* humano ortólogo de aproximadamente 6,1 kb desde el inicio del segundo exón del gen *TTR* humano hasta el extremo del último exón de *TTR* humano (exón 4, incluida la 3' UTR 15 humana) y un casete de selección de neomicina de autoeliminación (SDC Neo) flanqueado por sitios loxP. Véase la **Figura 4**. Para generar el alelo humanizado, se introdujeron componentes CRISPR/Cas9 dirigidos al locus *Ttr* de ratón en células madre embrionarias de ratón F1H4 junto con el vector de direcciónamiento grande. Se realizaron ensayos de pérdida de alelo, ensayos de ganancia de alelo y ensayos de retención que utilizan los cebadores y sondas establecidos en la **Figura 5B** y en la **Tabla 3** para confirmar la humanización del alelo *Ttr* de ratón. Las versiones con 20 el casete SDC Neo y después de la escisión del casete SDC Neo se muestran en la **Figura 4**. Después se generaron ratones F0 usando el método VELOCIMOUSE®.

En la **Figura 1A** se muestra una comparación de las secuencias de la proteína precursora de transtirretina humana y de ratón, en la **Figura 1B** se muestra una comparación de las secuencias codificantes de transtirretina humana y de ratón y en la **Figura 2** se muestra un esquema que muestra el locus *Ttr* de ratón de tipo silvestre y el locus *Ttr* de ratón humanizado final (*TTR* humanizada versión 2 con el casete SDC Neo eliminado). Las secuencias del locus *Ttr* de ratón humanizado esperado con el casete SDC Neo y sin el casete SDC Neo se exponen en las SEQ ID NOS: 16 y 17, respectivamente. MAID7655 se refiere al locus *TTR* humanizado (manteniendo la secuencia señal del ratón) con el casete de selección de neomicina. MAID7656 se refiere al locus *TTR* humanizado (manteniendo la secuencia señal del ratón) con el casete de selección de neomicina eliminando. La proteína precursora de transtirretina esperada codificada por el locus *Ttr* de ratón humanizado (una proteína TTR químérica de ratón/humana) se expone en la SEQ ID NO: 2.

Un kit ELISA de TTR humana (Aviva Systems Biology; n.º de cat.: OKIA00081; después se utilizó una dilución 1:2000) 35 para evaluar los niveles de TTR humana en plasma sanguíneo en diferentes versiones de ratones con TTR humanizada con edades entre 1 y 3 meses. Los ratones incluían un ratón de control de tipo silvestre y ratones con diversas combinaciones de alelos de tipo silvestre, MAID7577, MAID7655 y MAID7656. MAID7577 se refiere al locus *TTR* humanizado con el casete de selección de neomicina eliminado. MAID7655 se refiere al locus *TTR* humanizado (manteniendo la secuencia señal del ratón) con el casete de selección de neomicina. MAID7656 se refiere al locus *TTR* humanizado (manteniendo la secuencia señal del ratón) con el casete de selección de neomicina eliminando. Los 40 datos se resumen en la **Figura 16** y la **Tabla 10**. Como se muestra en la **Figura 16**, los ratones hTTR^{7577/7577} (clon B-F10) tenían ~55 µg/ml de hTTR circulante, que es significativo pero inferior a los niveles fisiológicos en ratones de tipo silvestre o en suero humano. Los ratones con TTR humanizada con la secuencia señal de TTR de ratón (hTTR^{7655/7655}, hTTR^{7655/7656} y hTTR^{7656/7656}) no tuvieron mayores niveles de TTR secretada en comparación con ratones con TTR 45 humanizada con la secuencia señal de TTR humana (hTTR^{7577/7577}).

Tabla 10. Niveles de TTR en plasma.

Cepa	Descripción	hTTR, µg/ml (SD)	mTTR, µg/ml (SD)
F1H4	Ratón de control de tipo silvestre	N.D.	920 (79,7)
hTTR ^{7577/7577} V1.0	Locus de TTR humanizada, casete eliminado	54,41 (14,36)	N.D.
hTTR ^{7655/7655} V2.0	Locus de TTR humanizada con secuencia señal de TTR de ratón, casete eliminado	37,42 (2,461)	N.D.

(continuación)

Cepa	Descripción	hTTR, µg/ml (SD)	mTTR, µg/ml (SD)
hTTR ^{7656/7656} V2.0	Locus de TTR humanizada con secuencia señal de TTR de ratón, casete eliminado	34.88 (n.a.)	N.D.
hTTR ^{7655/7656} V2.0	Locus de TTR humanizada con secuencia señal de TTR de ratón, casete eliminado en un alelo pero presente en otro	33,86 (2,827)	N.D.
hTT 7656/WT V2.0	Locus de TTR humanizada heterocigoto con secuencia señal de TTR de ratón, casete eliminado	18,36 (1,233)	57,50 (4,264)
Suero humano	Control de suero humano	234.5 (n.a.)	N.D.

Un kit ELISA de TTR humana (Aviva Systems Biology; n.º de cat.: OKIA00081; después se utilizó una dilución 1:2000) para evaluar los niveles de TTR humana en plasma sanguíneo en diferentes versiones de ratones con TTR humanizada con edades entre 2 y 3 meses en otro experimento. Los ratones incluían un ratón de control de tipo silvestre (etiquetado como F1H4) y ratones homocigotos para los alelos MAID7577 o MAID7656. MAID7577 se refiere al locus TTR humanizado con el casete de selección de neomicina eliminado. MAID7656 se refiere al locus TTR humanizado (manteniendo la secuencia señal del ratón) con el casete de selección de neomicina eliminando. Los resultados se muestran en la **Figura 18** y la **Tabla 11**. Como se muestra en la **Figura 18**, los ratones hTTR^{7577/7577}

- 5 hTTR v1 tenían ~55 µg/ml de hTTR circulante, que es significativo pero inferior a los niveles fisiológicos en ratones de tipo silvestre o en suero humano. Los ratones con TTR humanizada con la secuencia señal de TTR de ratón (hTTR^{7656/7656}; hTTRv2) tenían niveles aumentados de TTR secretada en comparación con ratones TTR humanizados con la secuencia señal de TTR humana (hTTR^{7577/7577}).
- 10

15

Tabla 11. Niveles plasmáticos de hTTR.

Cepa de TTR	hTTR, µg/ml (SD)
hTTR v2	88,45 (1,465)
F1H4	Indetectable

REIVINDICACIONES

1. Un roedor que comprende en su genoma un locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente que comprende una secuencia de *TTR* humano que comprende tanto una secuencia codificante como una secuencia no codificante de *TTR*,
- 5 en donde el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende un promotor de *Ttr* endógeno, en donde la secuencia de *TTR* humano está unida operativamente al promotor de *Ttr* endógeno,
- 10 en donde el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende una región 3' no traducida de *TTR* humano, en donde la región 5' no traducida de *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente, y
en donde:
- 15 (I) la secuencia codificante de *Ttr* entera del locus *Ttr* endógeno se ha eliminado y reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente y la región del locus *Ttr* endógeno desde el codón de inicio de *Ttr* al codón de terminación de *Ttr* se ha eliminado y reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente; o
- 20 (II) el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente codifica una proteína precursora de transtiretina que comprende un péptido señal, la región del locus *Ttr* endógeno que codifica el péptido señal no se ha eliminado y reemplazado con la correspondiente secuencia de *TTR* humano, el primer exón del locus *Ttr* endógeno no se ha eliminado y reemplazado con la correspondiente secuencia de *TTR* humano, y la región del locus *Ttr* endógeno desde el inicio del segundo exón de *Ttr* al codón de terminación de *Ttr* se ha eliminado y reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente.
- 25 2. El roedor de la reivindicación 1, en donde la región del locus *Ttr* endógeno desde el codón de inicio de *Ttr* al codón de terminación de *Ttr* se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TTR* humano que comprende la secuencia de *TTR* humano correspondiente y una región 3' no traducida de *TTR* humano y
- 30 en donde la región 5' no traducida de *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente, y
en donde el promotor de *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente.
- 35 3. El roedor de la reivindicación 2, en donde:
- 35 (i) la secuencia de *TTR* humano en el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 18;
- 40 (ii) el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente codifica una proteína que comprende una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1;
- (iii) el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende una secuencia codificante que comprende una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 90; o
- (iv) el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 14 o 15.
- 45 4. El roedor de la reivindicación 1, en donde la región del locus *Ttr* endógeno desde el segundo exón de *Ttr* al codón de terminación de *Ttr* se ha eliminado y reemplazado con una secuencia de *TTR* humano que comprende la secuencia de *TTR* humano correspondiente y una región 3' no traducida de *TTR* humano y
- 50 en donde el primer exón y el primer intrón del locus *Ttr* endógeno no se han eliminado y reemplazado con la correspondiente secuencia de *TTR* humano, y
en donde la región 5' no traducida de *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente, y
en donde el promotor de *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR* humano correspondiente.
- 55 5. El roedor de la reivindicación 4, en donde:
- 60 (i) la secuencia de *TTR* humano en el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 19;
- (ii) el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente codifica una proteína que comprende una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2;
- (iii) el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende una secuencia codificante que comprende una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 91; o
- (iv) el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende una secuencia al menos un 90 %, 95 %, 96 %,

97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 16 o 17.

6. El roedor de cualquier reivindicación anterior, en donde el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente no comprende un casete de selección ni un gen indicador.
- 5 7. El roedor de cualquier reivindicación anterior, en donde el roedor es homocigoto para el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente.
- 10 8. El roedor de cualquier reivindicación anterior, en donde el roedor es una rata o un ratón.
- 10 9. El roedor de la reivindicación 8, en donde el roedor es un ratón.
- 15 10. Un método para evaluar la actividad de un reactivo dirigido a TTR humana, que comprende evaluar la actividad del reactivo dirigido a TTR humana en el roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, al que se ha administrado el reactivo dirigido a TTR humana.
- 20 11. El método de la reivindicación 10, en donde la administración comprende: (1) suministro mediado por virus adenoasociados (AAV), opcionalmente en donde al roedor se le ha administrado el reactivo dirigido a TTR humana mediante suministro mediado por AAV8; (2) suministro mediado por nanopartículas lipídicas (LNP), opcionalmente en donde la dosis de LNP está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg; o (3) suministro hidrodinámico (HDD).
- 25 12. El método de la reivindicación 10 u 11, en donde la actividad del reactivo dirigido a TTR humana se evalúa en un hígado aislado del roedor, opcionalmente, en donde el método comprende además evaluar la actividad del reactivo dirigido a TTR humana en un órgano o tejido aislado distinto del hígado.
- 30 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde el reactivo dirigido a TTR humana es un agente de edición del genoma, y la evaluación comprende evaluar la modificación del locus *Ttr* modificado genéticamente, opcionalmente en donde la evaluación comprende medir la frecuencia de inserciones o eliminaciones dentro del locus *Ttr* modificado genéticamente.
- 35 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en donde la evaluación comprende medir la expresión de un ARN mensajero de *Ttr* codificado por el locus *Ttr* modificado genéticamente o medir la expresión de una proteína TTR codificada por el locus *Ttr* modificado genéticamente, opcionalmente en donde medir la expresión de la proteína TTR comprende medir los niveles séricos de la proteína TTR en el roedor.
- 40 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en donde el reactivo dirigido a TTR humana comprende un agente nucleasa diseñado para establecer como diana una región de un gen *TTR* humano.
- 45 16. El método de la reivindicación 15, en donde el agente nucleasa comprende una proteína Cas y un ARN guía diseñado para el direccionamiento a una secuencia diana de ARN guía en el gen *TTR* humano y, opcionalmente, en donde la proteína Cas es una proteína Cas9.
17. El método de la reivindicación 15 o 16, en donde el reactivo dirigido a TTR humana comprende además un ácido nucleico donante exógeno, en donde el ácido nucleico donante exógeno está diseñado para recombinarse con el gen *TTR* humano y, opcionalmente, en donde el ácido nucleico donante exógeno es un oligodesoxinucleótido monocatenario (ODNmc).
- 50 18. Un método para optimizar la actividad de un reactivo dirigido a TTR humana *in vivo*, que comprende:
- (a) realizar el método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-17 por primera vez en un primer roedor que comprende en su genoma un locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente que comprende una secuencia de *TTR* humano que comprende tanto la secuencia codificante como la secuencia no codificante de *TTR*;
- 55 (b) cambiar una variable y realizar el método de la etapa (a) una segunda vez con la variable cambiada en un segundo roedor que comprende en su genoma el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente que comprende la secuencia de *TTR* humano que comprende tanto una secuencia codificante como una secuencia no codificante de *TTR*; y
- (c) comparar la actividad del reactivo dirigido a TTR humana en la etapa (a) con la actividad del reactivo dirigido a TTR humana en la etapa (b) y seleccionar el método que dé como resultado la mayor actividad.
- 60 19. El método de la reivindicación 18, en donde:
- (I) la variable cambiada en la etapa (b) es el método de suministro o la vía de administración para introducir el reactivo dirigido a TTR humana en el roedor, opcionalmente en donde la administración comprende la administración mediada por LNP, y la variable cambiada en la etapa (II) es la formulación de LNP;
- 65 (II) la variable cambiada en la etapa (b) es la concentración o cantidad del reactivo dirigido a TTR humana

introducido en el roedor;
 (III) la variable cambiada en la etapa (b) es la forma del reactivo dirigido a TTR humana introducido en el roedor;
 (IV) la variable cambiada en la etapa (b) es el reactivo dirigido a TTR humana introducido en el roedor; o
 (V) el reactivo dirigido a TTR humana comprende una proteína Cas y un ARN guía diseñado para dirigir una
 5 secuencia diana de ARN guía en un gen *TTR* humano, y (1) la variable cambiada en la etapa (b) es la secuencia
 de ARN guía o la secuencia diana de ARN guía, (2) la proteína Cas y el ARN guía se administran cada uno en
 forma de ARN, y la variable cambiada en la etapa (b) es la relación de ARNm de Cas a ARN guía, o (3) la variable
 cambiada en la etapa (b) es modificaciones del ARN guía.

10 20. Una célula de roedor que comprende en su genoma un locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente que
 comprende una secuencia de *TTR* humano que comprende tanto una secuencia codificante como una secuencia no
 codificante de *TTR*,

15 en donde el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende un promotor de *Ttr* endógeno, en donde la
 secuencia de *TTR* humano está unida operativamente al promotor de *Ttr* endógeno,
 en donde el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente comprende una región 3' no traducida de *TTR* humano,
 en donde la región 5' no traducida de *Ttr* endógeno no se ha eliminado ni reemplazado con la secuencia de *TTR*
 humano correspondiente, y
 20 en donde:

20 (I) la secuencia codificante de *Ttr* entera del locus *Ttr* endógeno se ha eliminado y reemplazado con la
 secuencia de *TTR* humano correspondiente y la región del locus *Ttr* endógeno desde el codón de inicio de *Ttr*
 25 al codón de terminación de *Ttr* se ha eliminado y reemplazado con la secuencia de *TTR* humano
 correspondiente; o
 (II) el locus *Ttr* endógeno modificado genéticamente codifica una proteína precursora de transtirretina que
 comprende un péptido señal, la región del locus *Ttr* endógeno que codifica el péptido señal no se ha eliminado
 30 y reemplazado con la correspondiente secuencia de *TTR* humano, el primer exón del locus *Ttr* endógeno no
 se ha eliminado y reemplazado con la correspondiente secuencia de *TTR* humano, y la región del locus *Ttr*
 endógeno desde el inicio del segundo exón de *Ttr* al codón de terminación de *Ttr* se ha eliminado y reemplazado
 con la secuencia de *TTR* humano correspondiente.

21. Un método para producir el roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende:

(I)

35 (a) modificar el genoma de una célula de roedor pluripotente para que comprenda el locus *Ttr* endógeno
 genéticamente modificado;
 (b) identificar o seleccionar la célula de roedor pluripotente modificada genéticamente que comprende el locus
Ttr endógeno modificado genéticamente;
 40 (c) introducir la célula de roedor pluripotente modificada genéticamente en un embrión hospedador de roedor;
 y
 (d) implantar y gestar el embrión hospedador de roedor en una madre roedor subrogada; o

(II)

45 (a) modificar el genoma de un embrión de roedor en fase unicelular para que comprenda el locus *Ttr* endógeno
 modificado genéticamente;
 (b) seleccionar el embrión de roedor en fase unicelular modificado genéticamente que comprende el locus *Ttr*
 endógeno modificado genéticamente; y
 50 (c) implantar y gestar el embrión de roedor unicelular modificado genéticamente en una madre roedor
 subrogada.

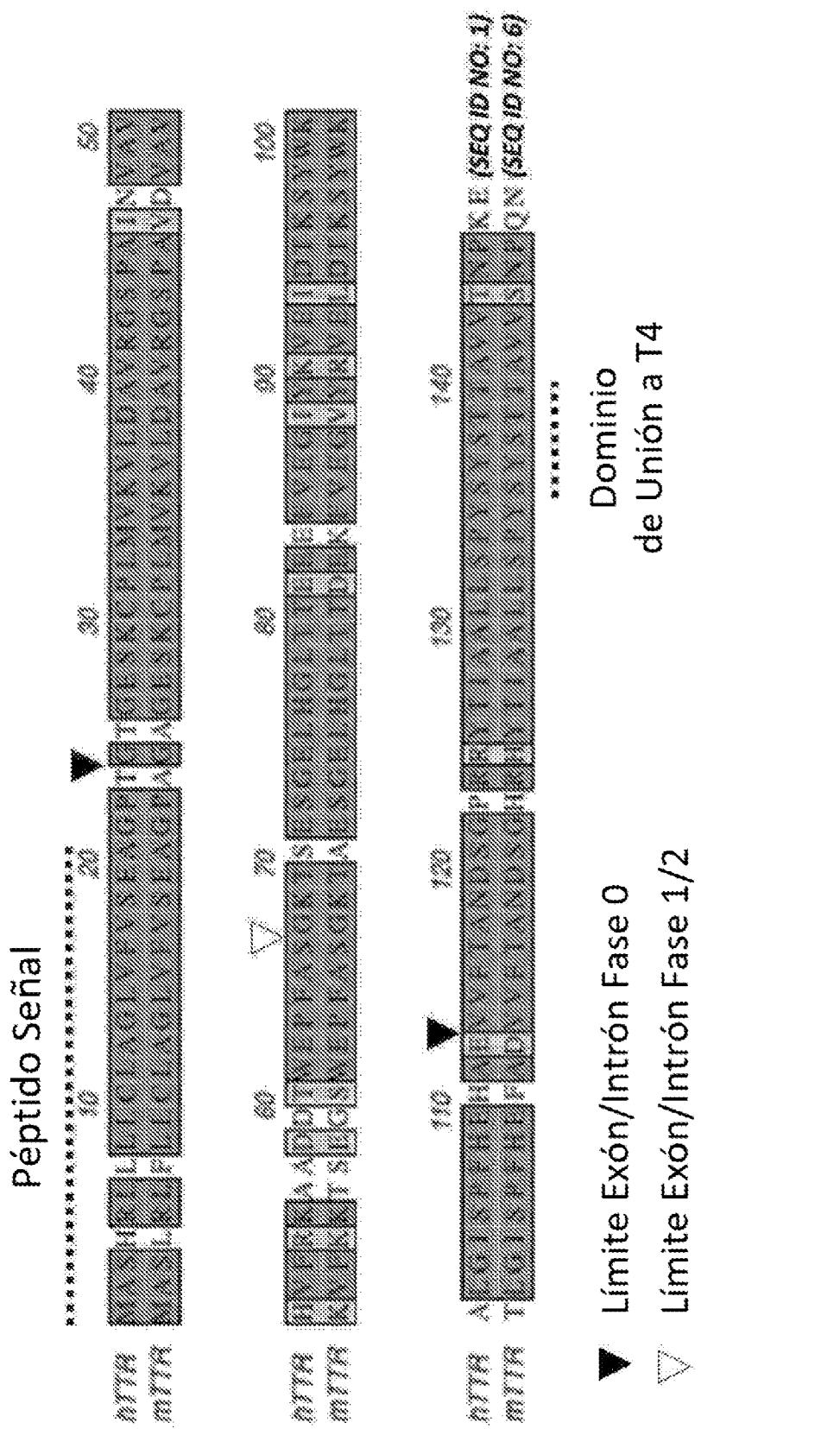


FIG. 1A

ES 2 962 277 T3

$m = \text{CDS de mTTR}$
 $h = \text{CDS de hTTR}$

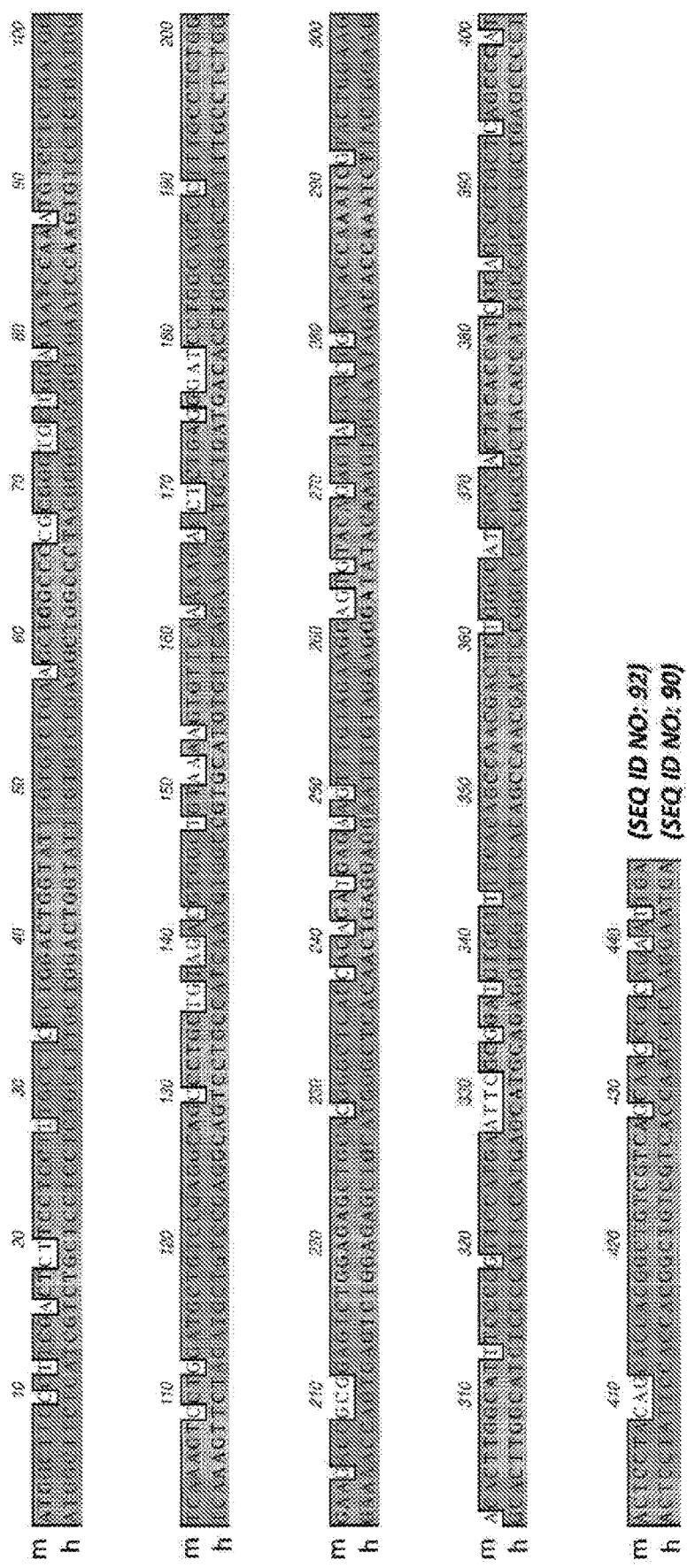


FIG. 1B

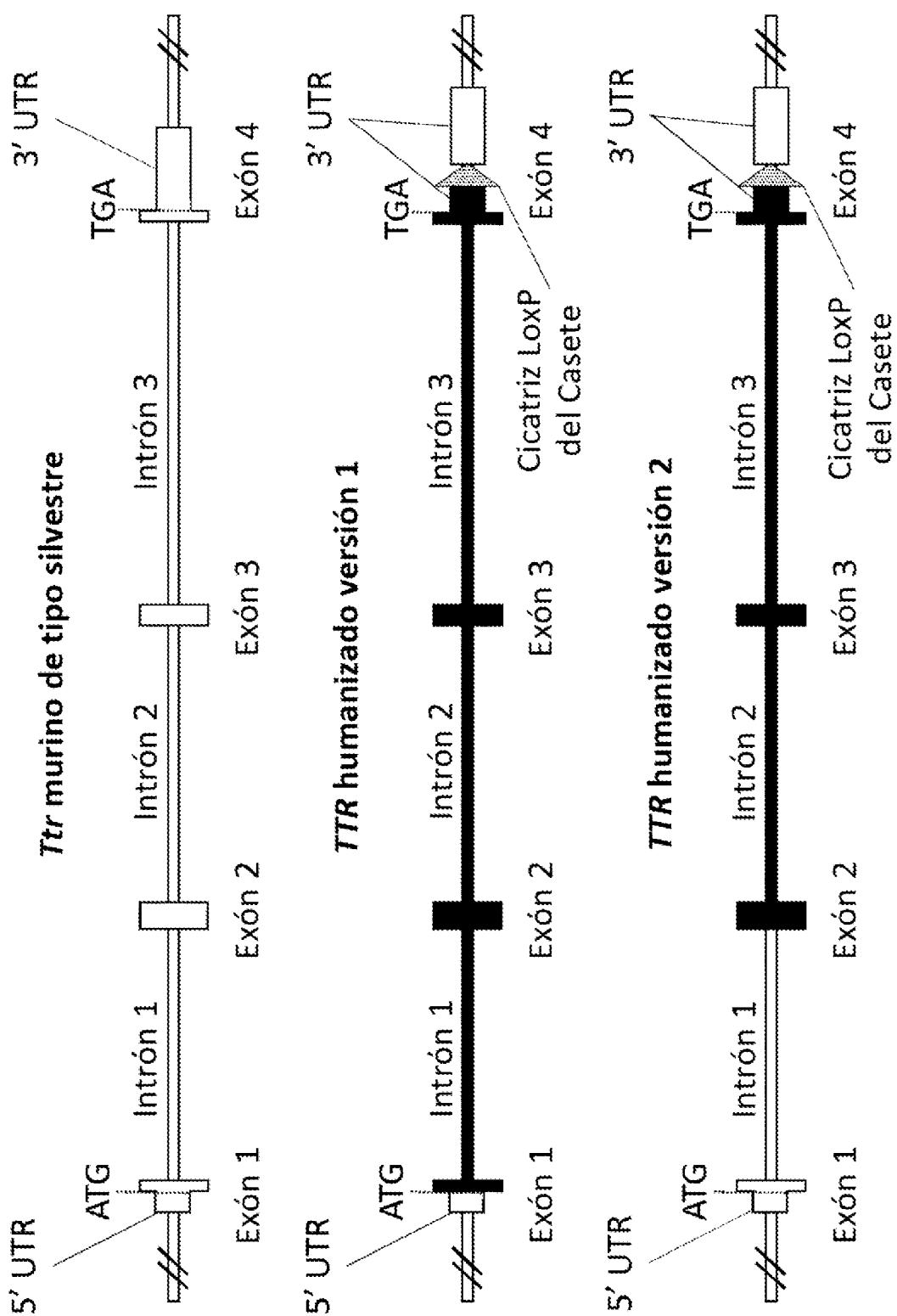


FIG. 2

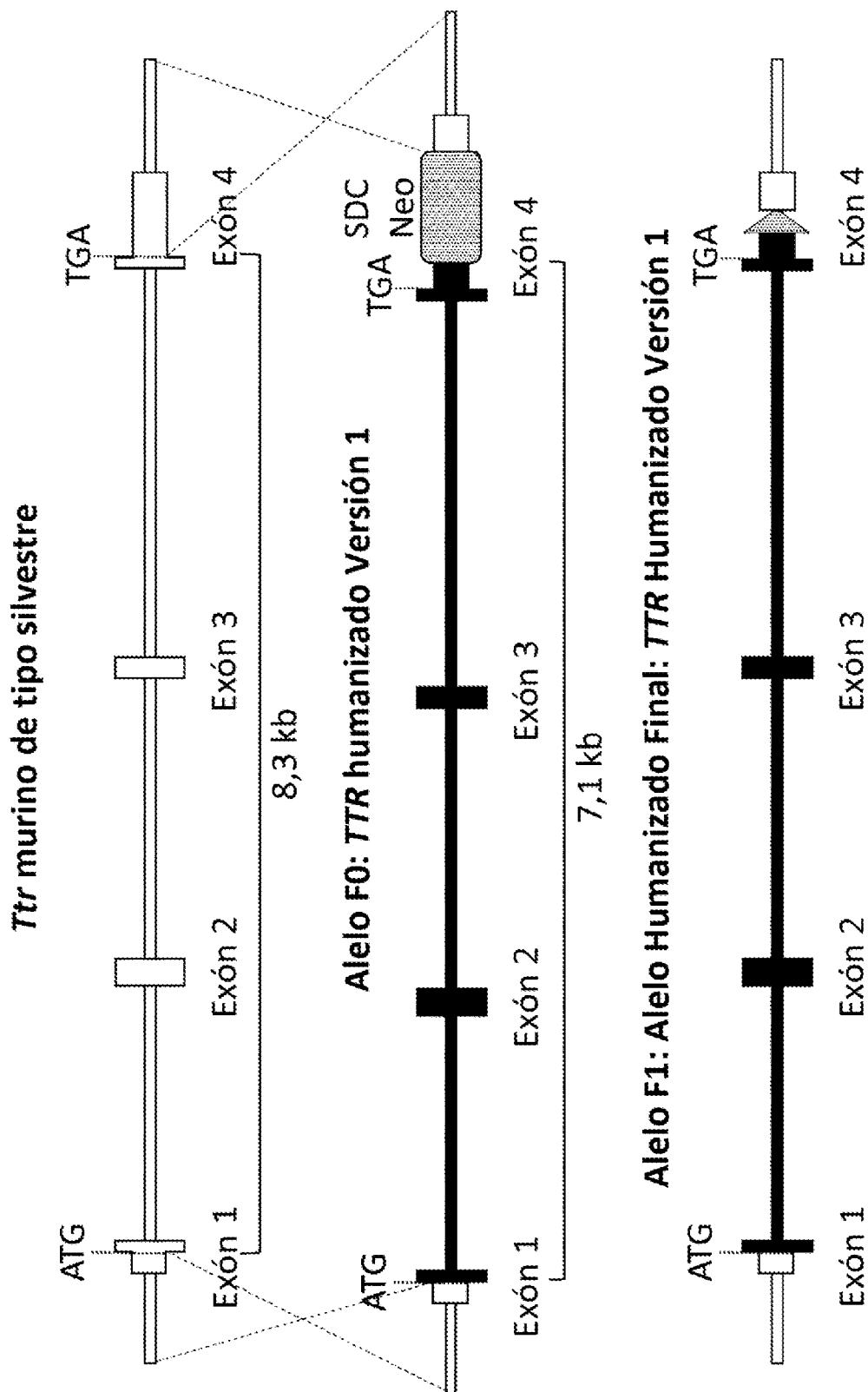


FIG. 3

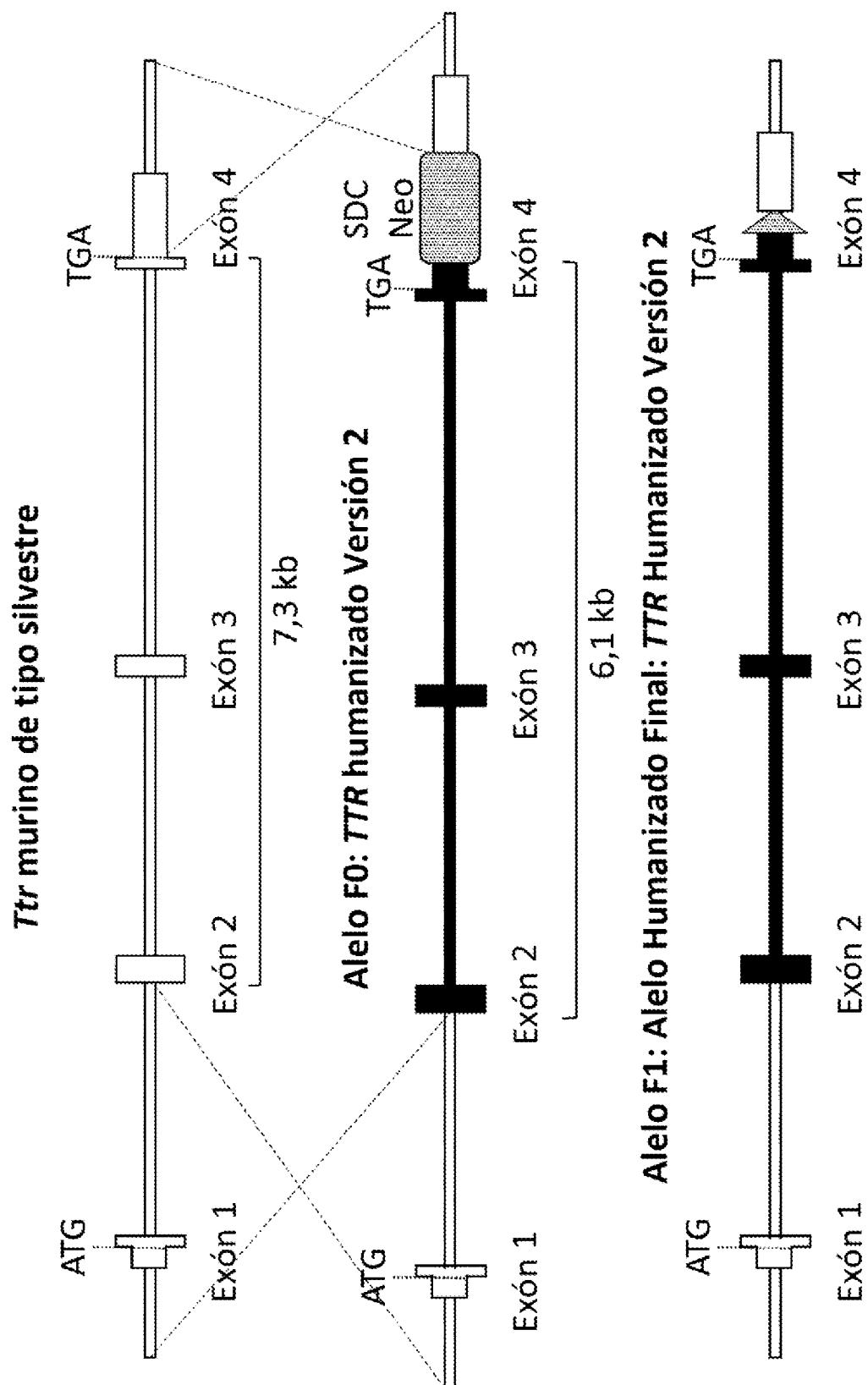


FIG. 4

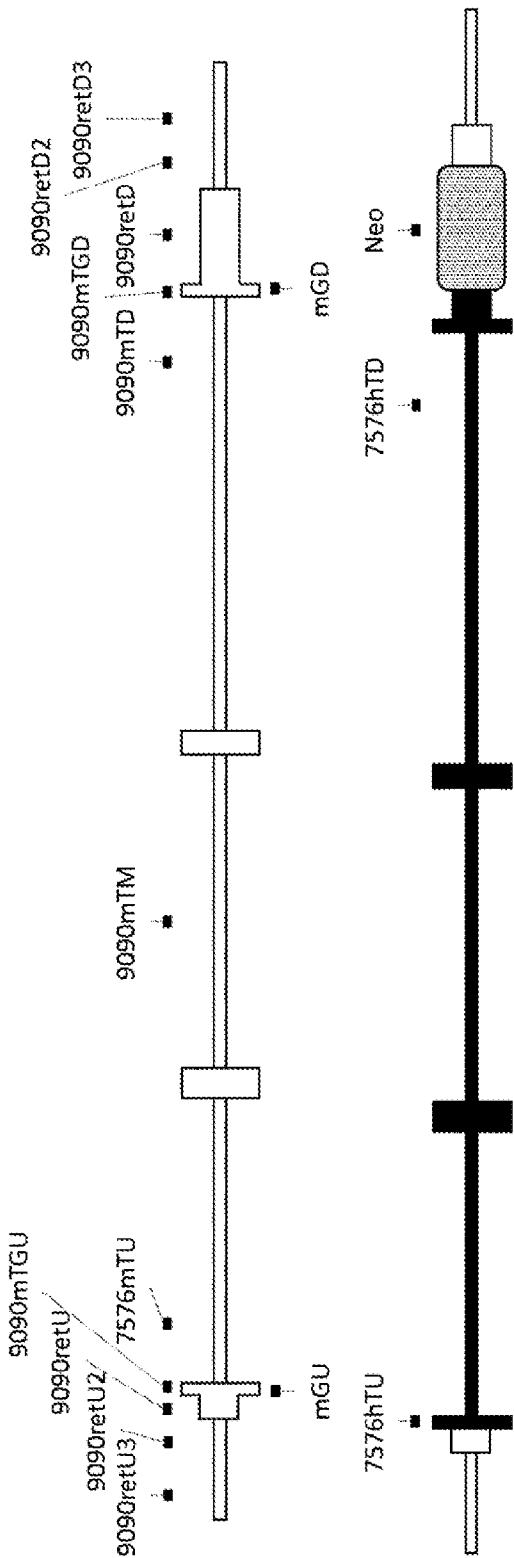


FIG. 5A

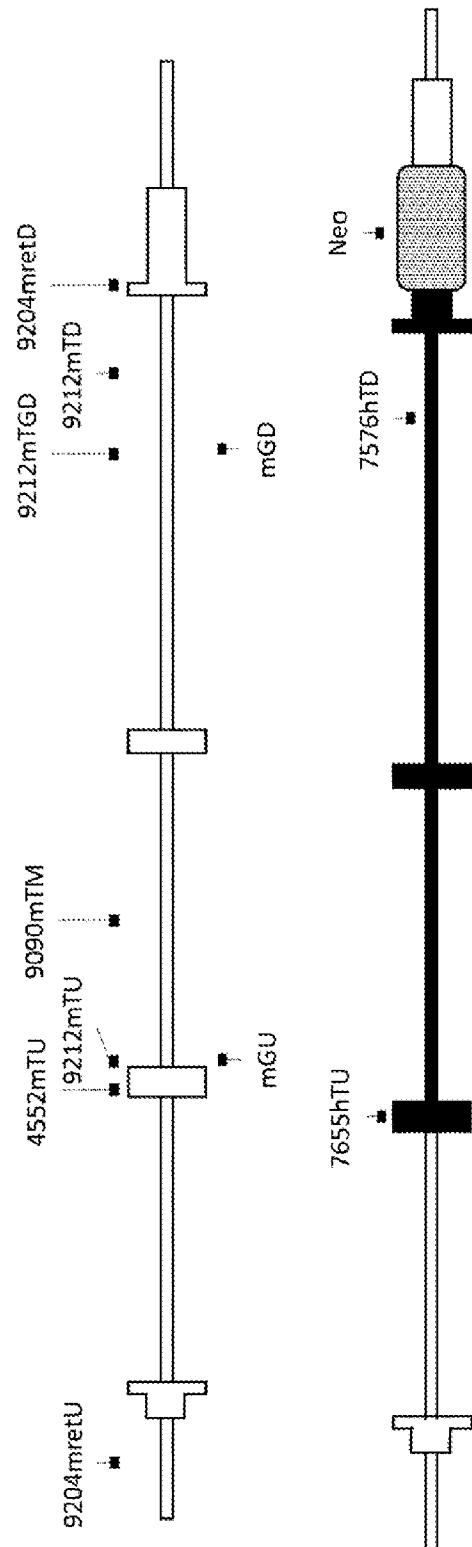


FIG. 5B

Expresión de TTR en hígado y bazo

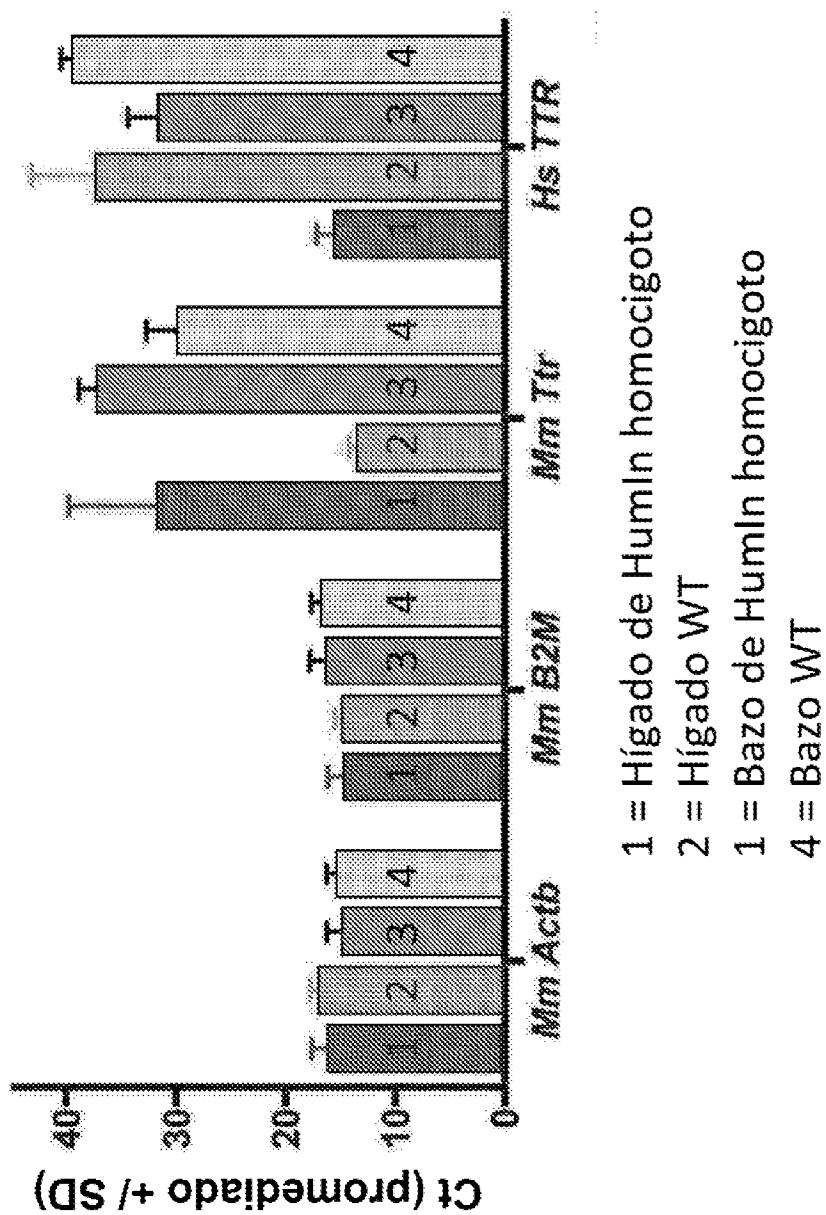
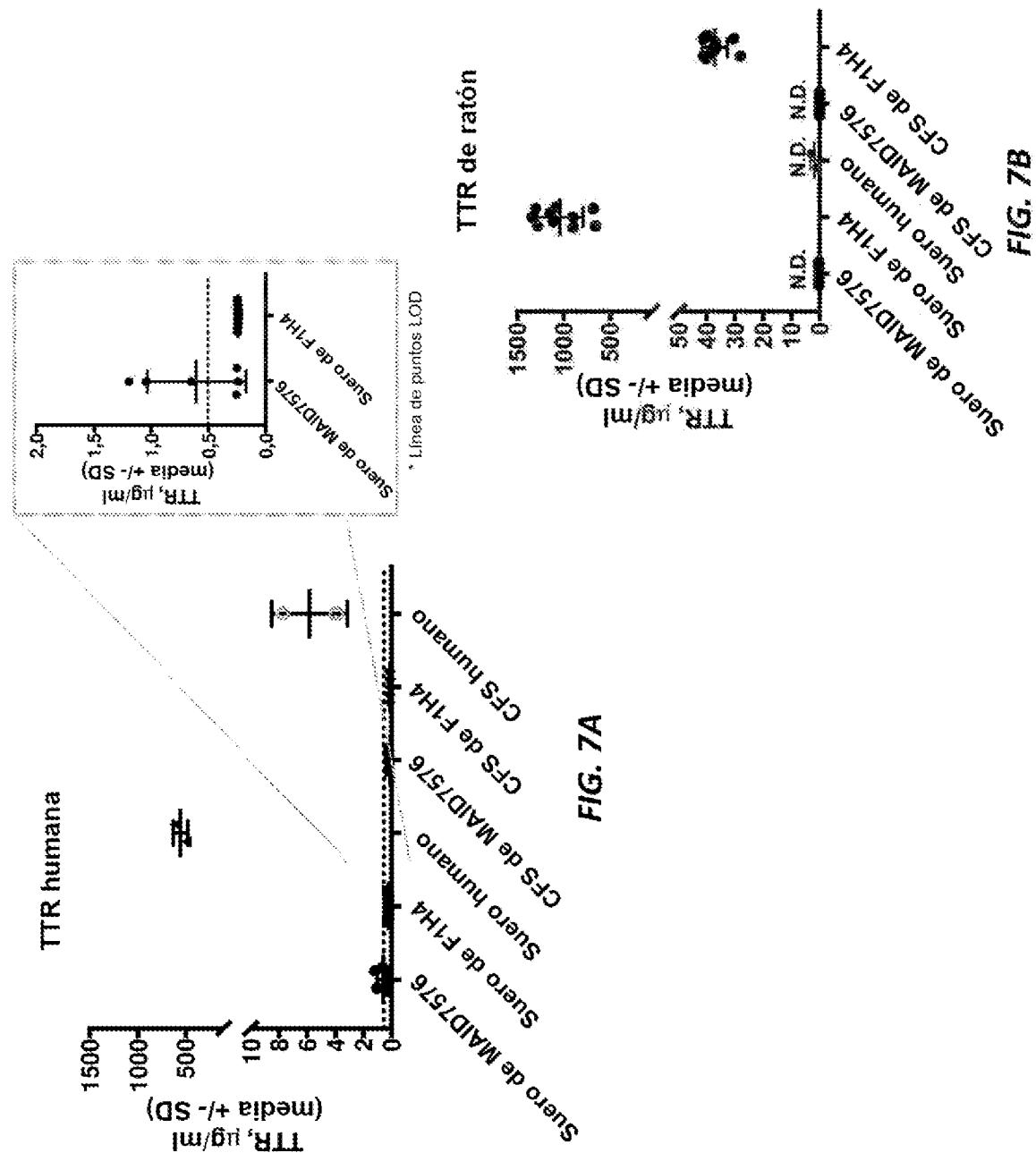


FIG. 6



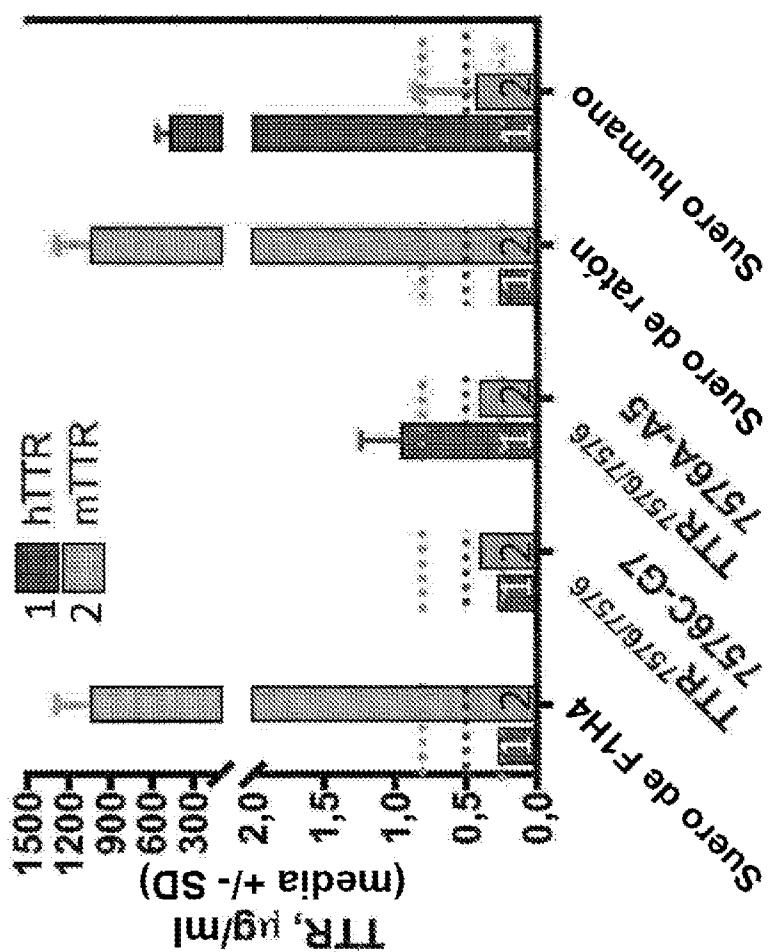


FIG. 7C

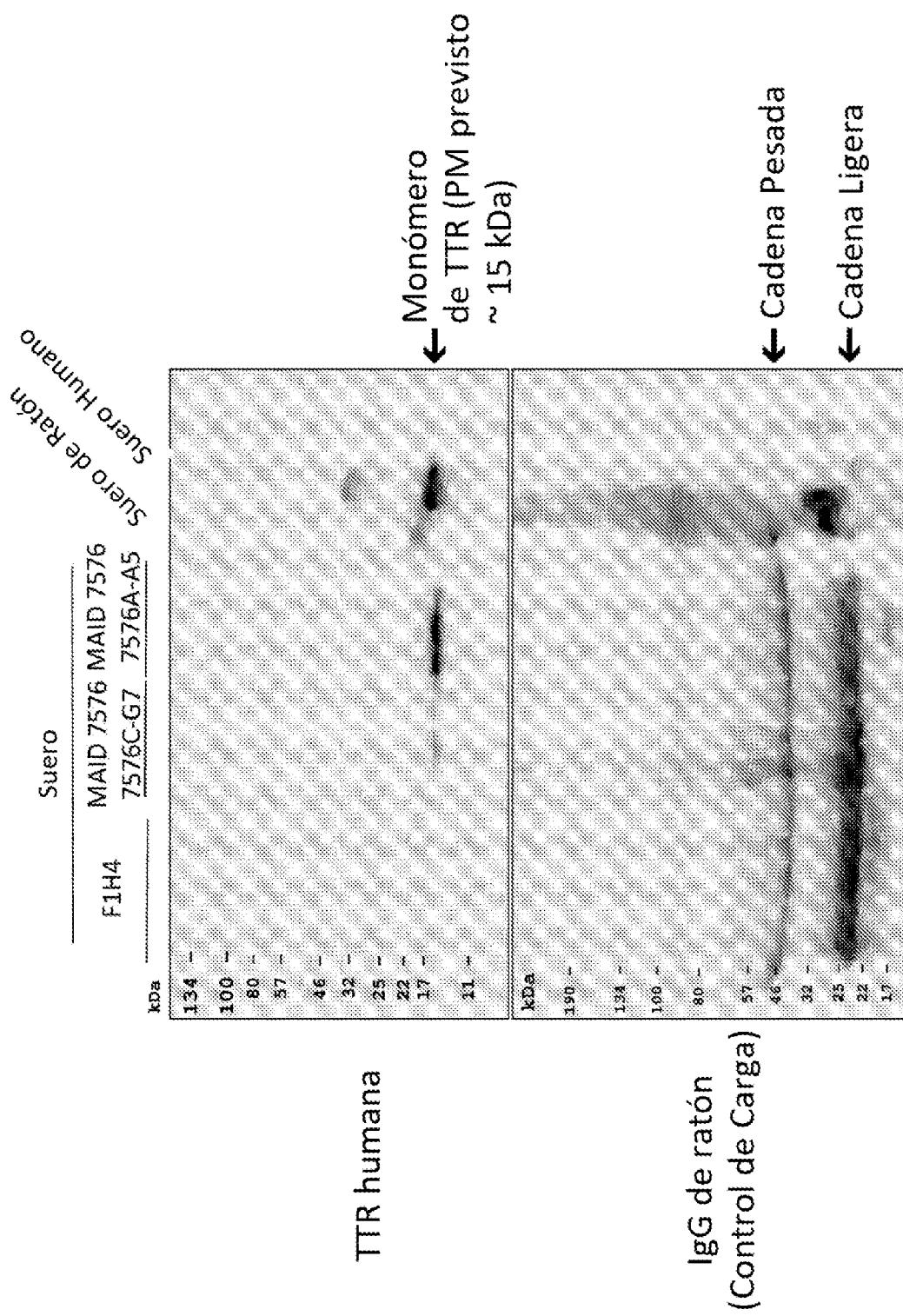


FIG. 8

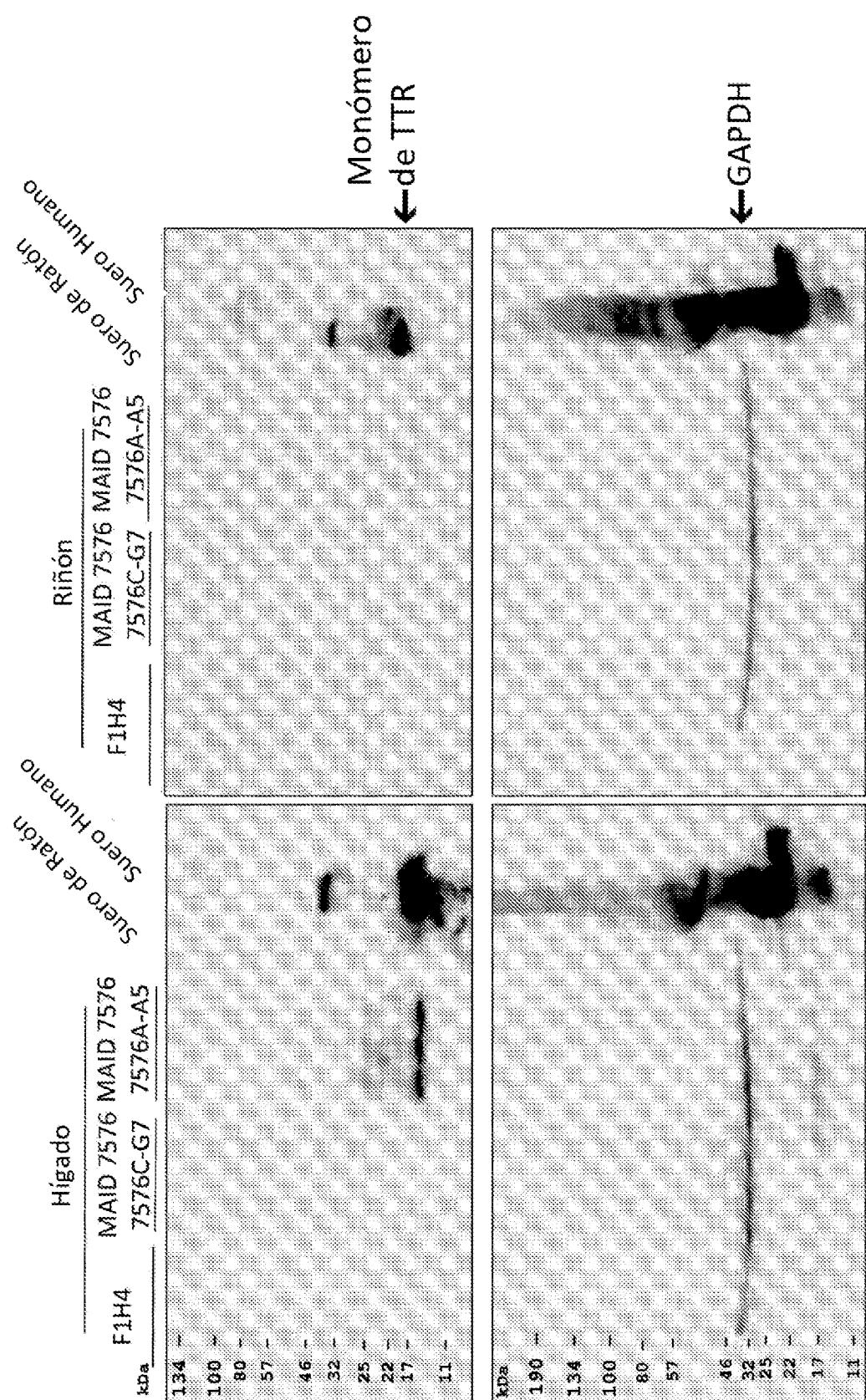
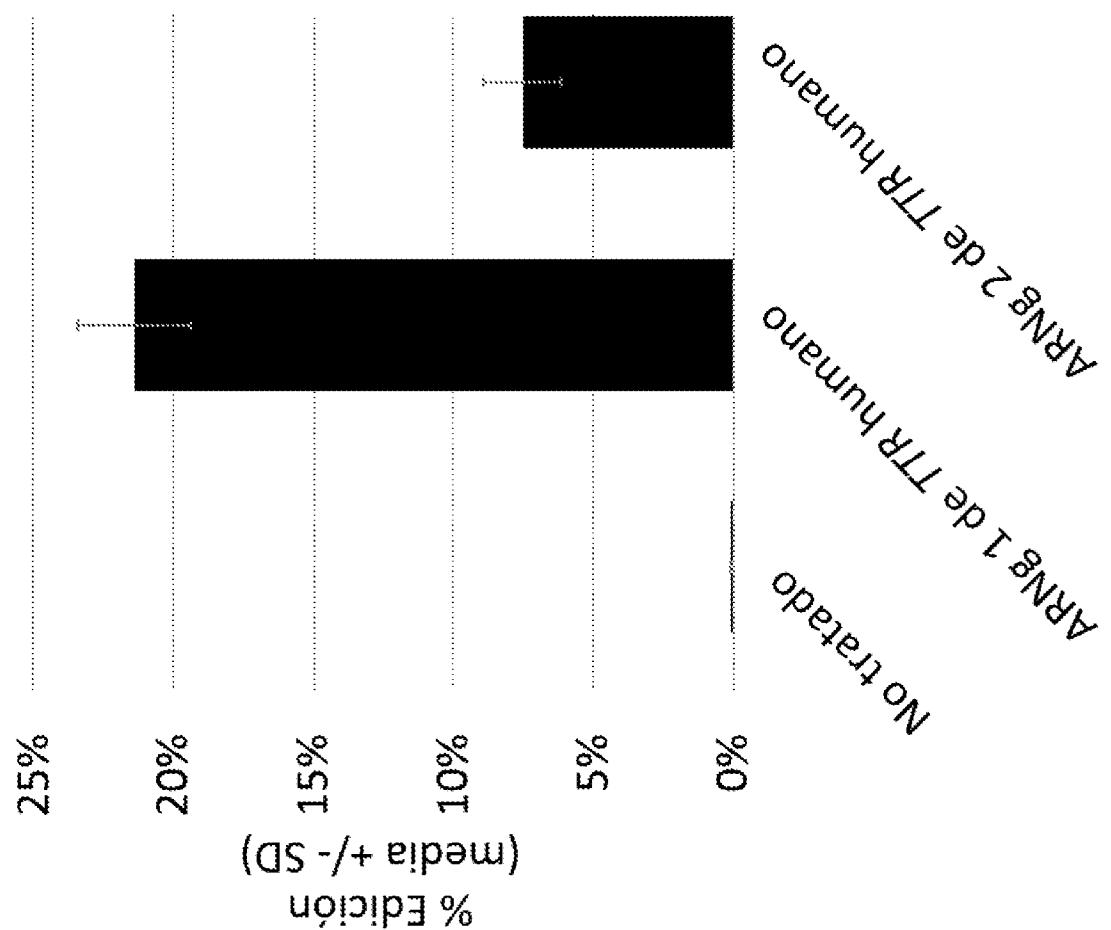


FIG. 9

FIG. 10



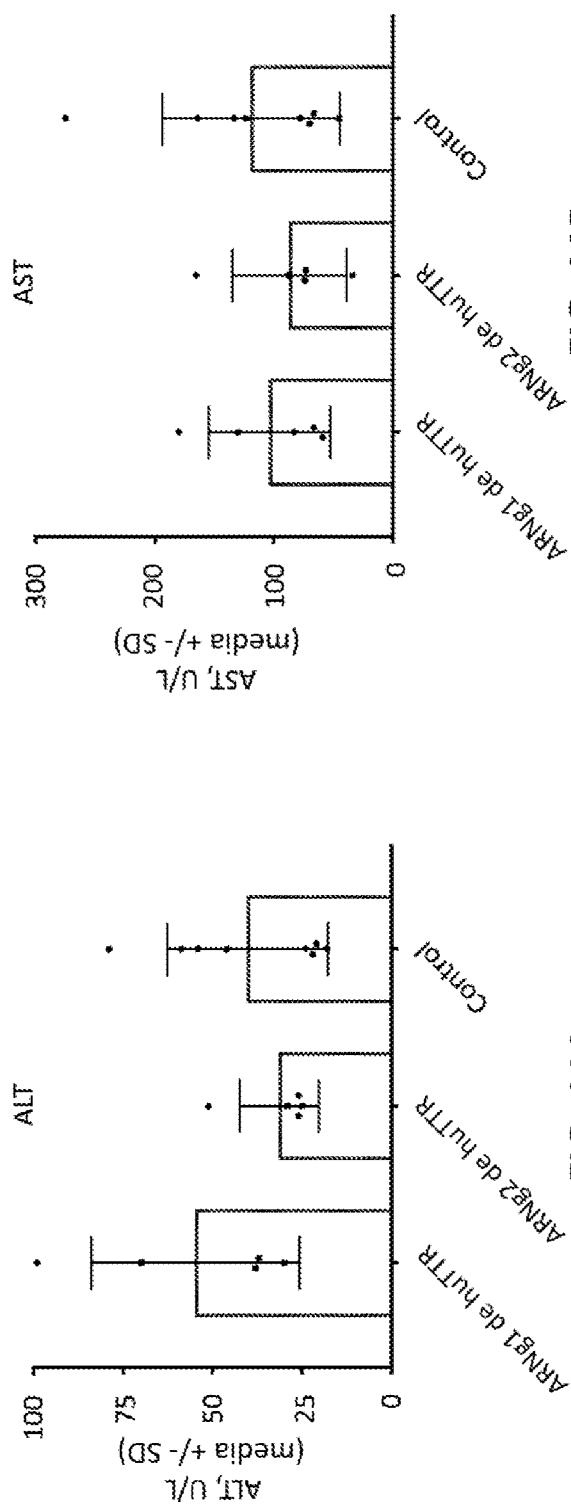


FIG. 11B

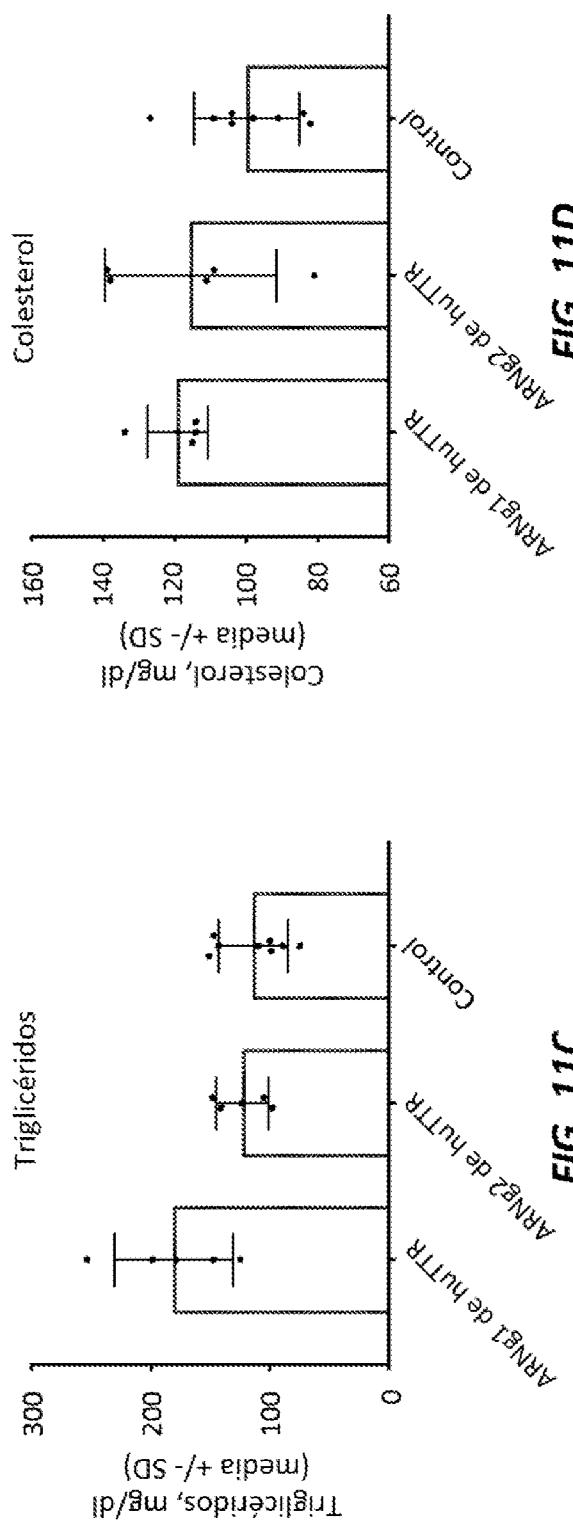
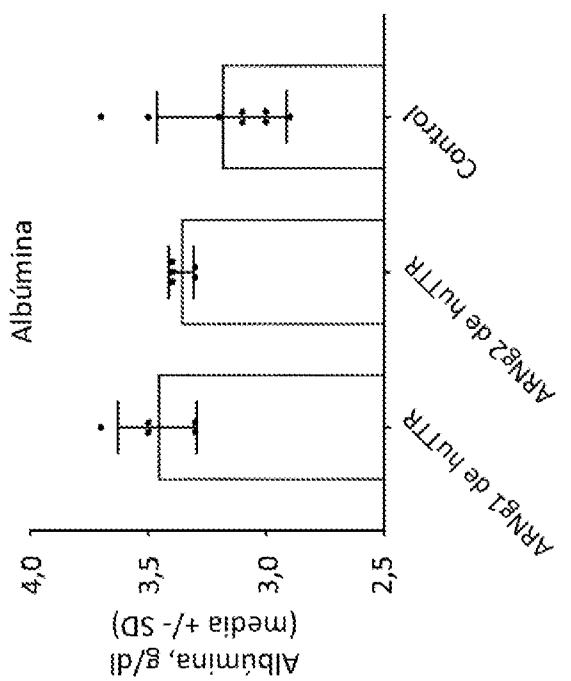
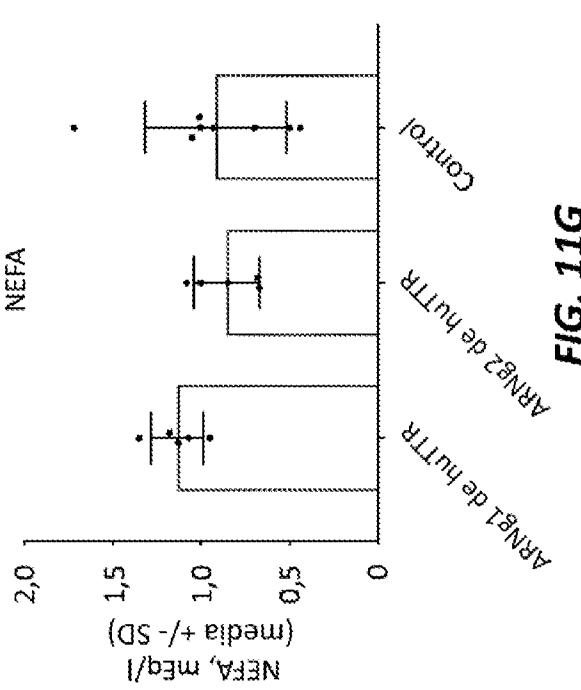
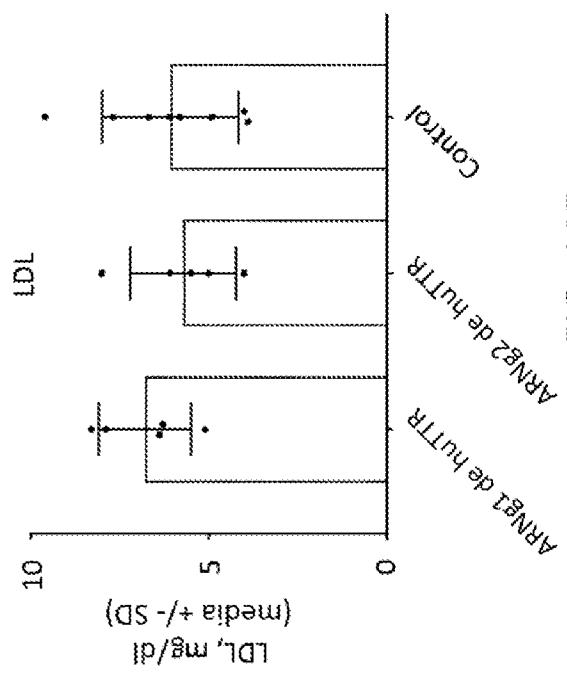
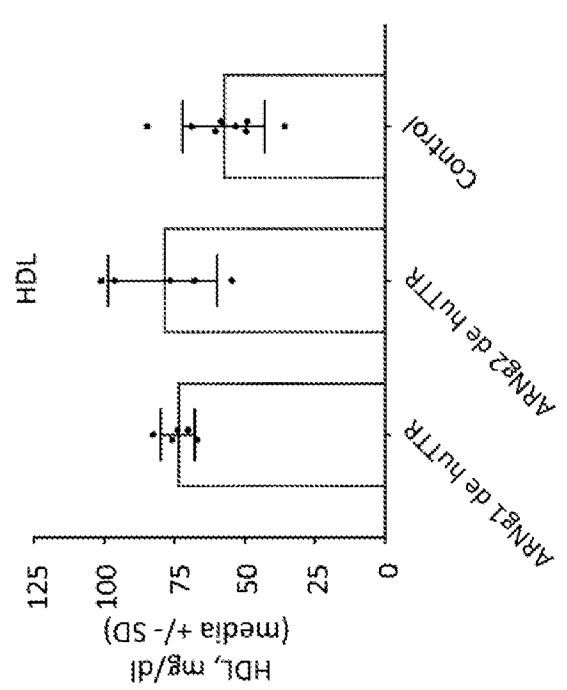
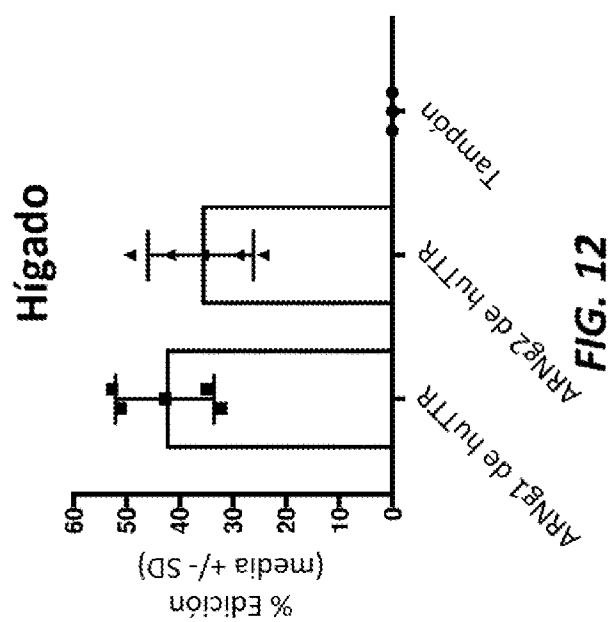
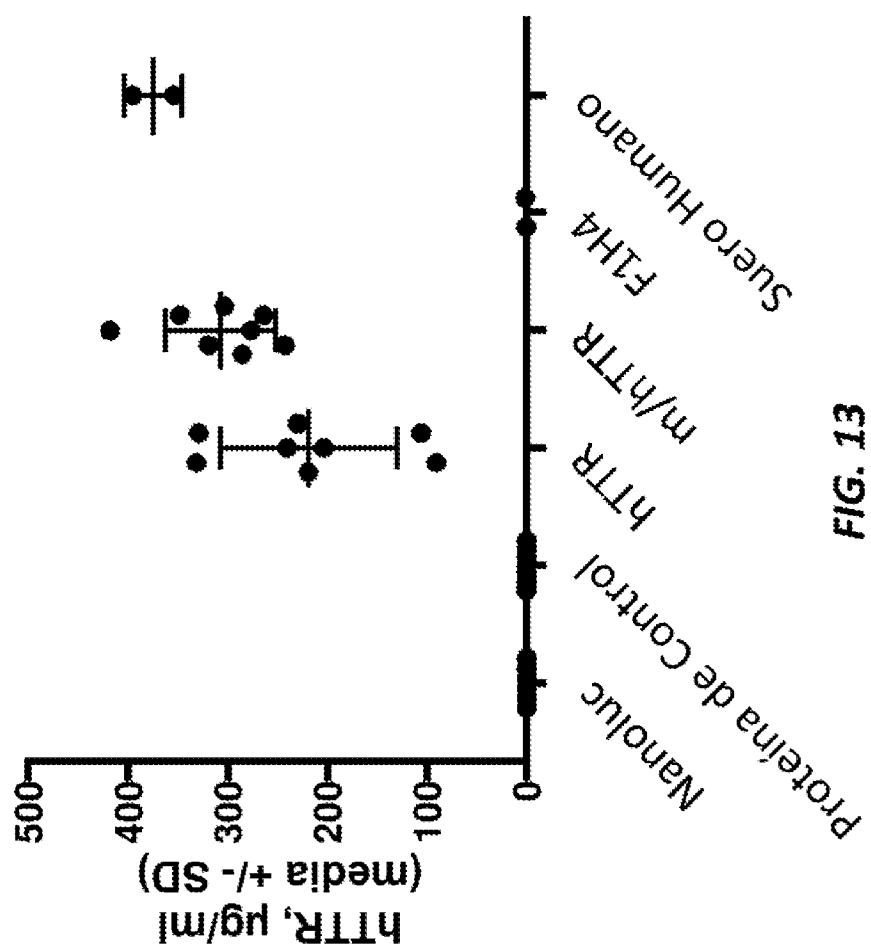
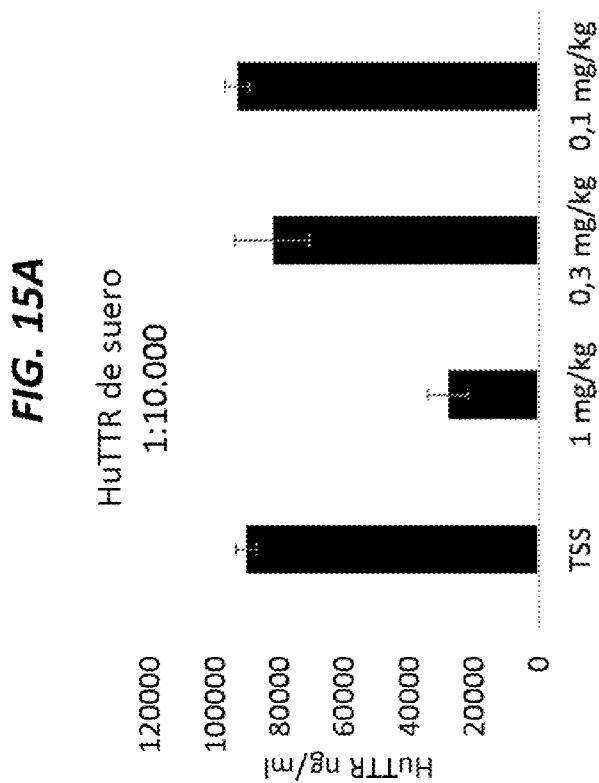
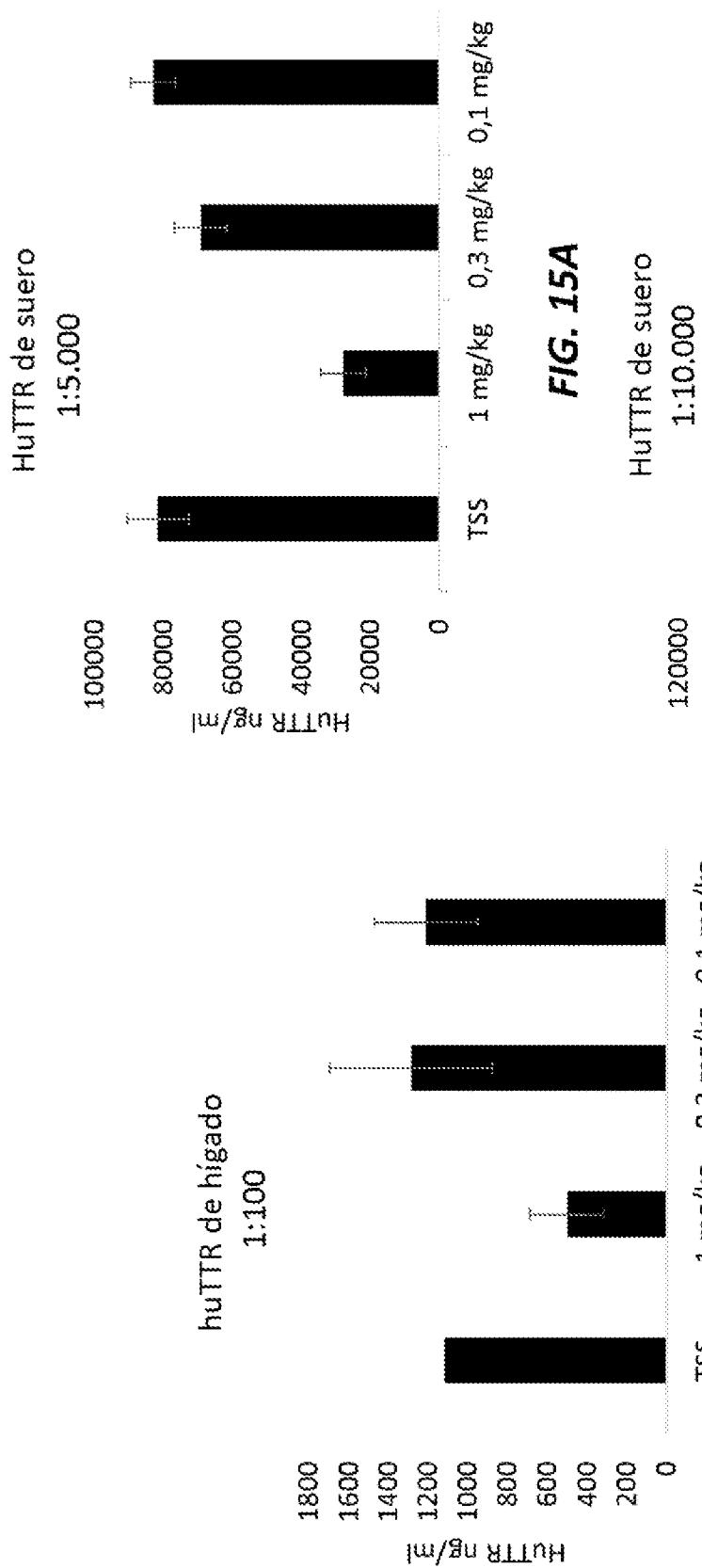


FIG. 11D







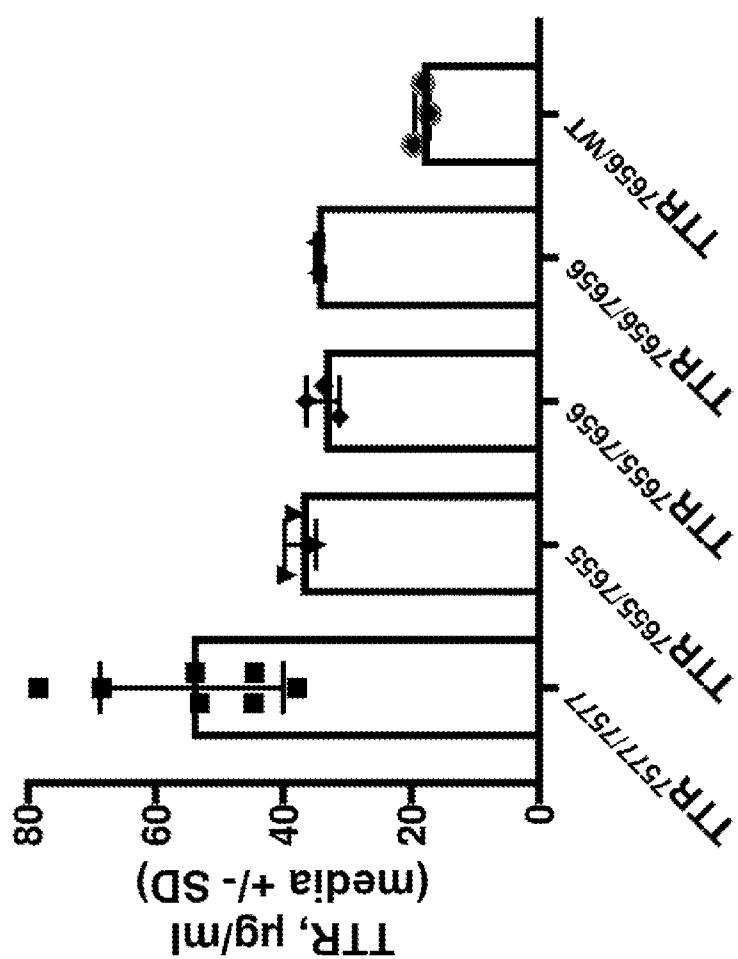


FIG. 16

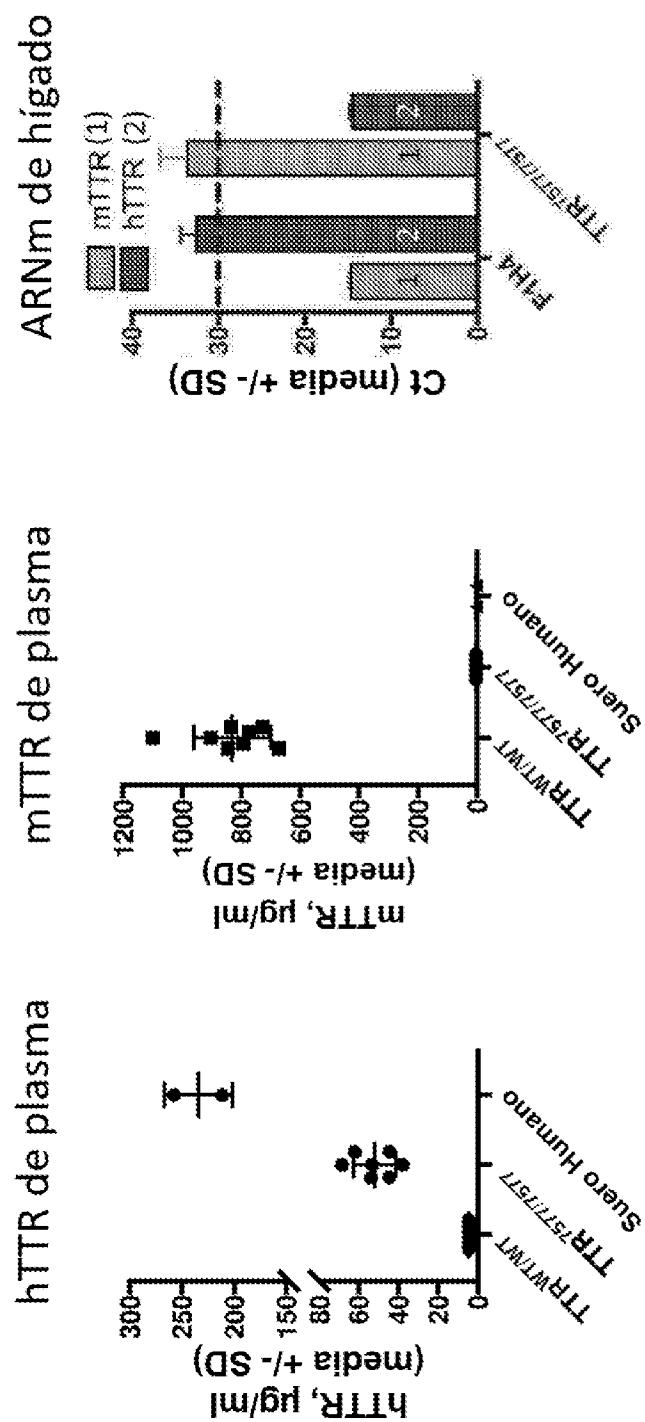


FIG. 17A
FIG. 17B

FIG. 17C

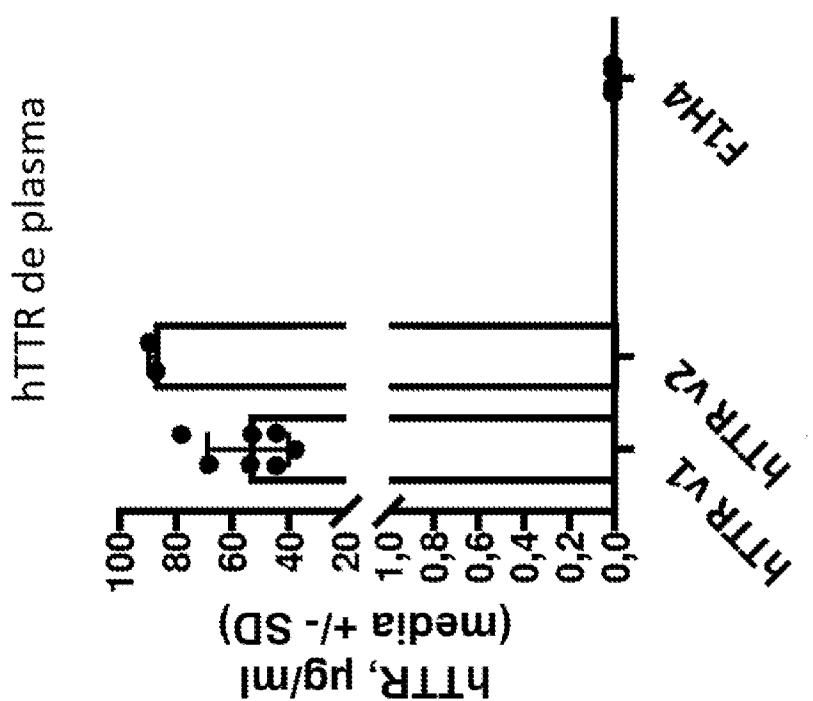


FIG. 18

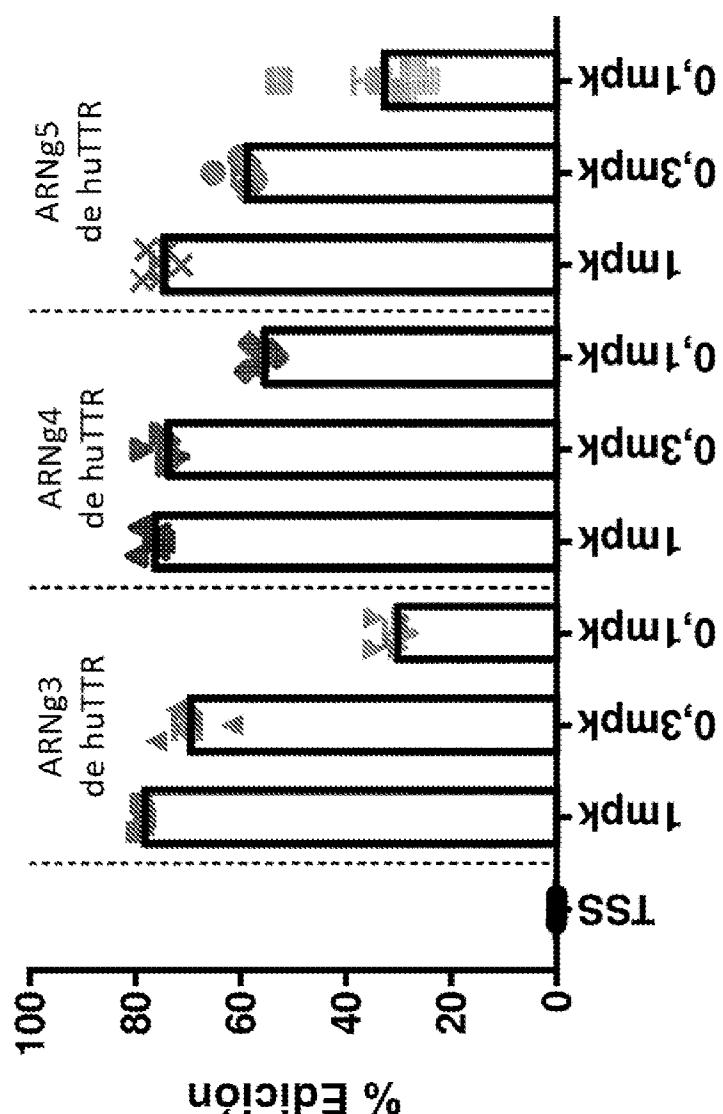


FIG. 19

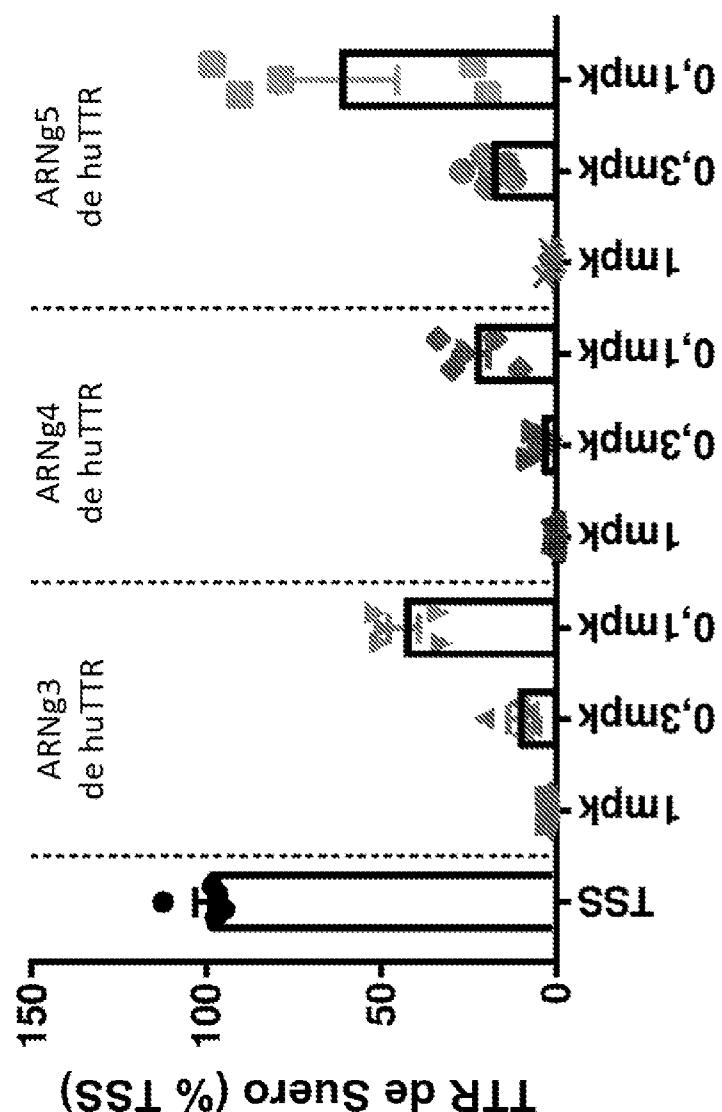


FIG. 20